



**Molekulare Charakterisierung von Mitogen-activated Protein Kinase  
(MAPK)- Komponenten aus *Echinococcus multilocularis***

**Molecular characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK)  
components from *Echinococcus multilocularis***

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Sektion Infektion und Immunität

Vorgelegt von

**Kristin Stoll**

aus

**Düsseldorf**

**Würzburg 2020**

**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Störk**

**1. Betreuer: Prof. Dr. Klaus Brehm**

**2. Betreuer: Prof. Dr. Christian Janzen**

**3. Betreuer: Prof. Dr. August Stich**

**4. Betreuer: Prof. Dr. Johannes Liese**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Der Fuchsbandwurm <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	1
1.1.1	Epidemiologie von <i>E. multilocularis</i> .....	1
1.1.2	Lebenszyklus von <i>E. multilocularis</i> .....	1
1.1.3	Parasiten-Wirt-Interaktion .....	3
1.1.4	Besondere Regenerationsfähigkeit von <i>E. multilocularis</i> .....	3
1.2	Alveoläre Echinokokkose .....	4
1.2.1	Definition, Klinik und Epidemiologie der AE .....	4
1.2.2	Diagnostik und Staging der AE .....	5
1.2.3	Therapie und Prognose der AE .....	5
1.2.4	Präventionsmaßnahmen .....	7
1.3	Ansatzpunkte für neue Therapien .....	8
1.4	MAP-Kinase-Kaskade .....	9
1.4.1	MAP-Kinase-Kaskade in Säugetieren.....	9
1.4.2	MAPK-Kaskade in <i>E. multilocularis</i> .....	12
1.5	Ziele der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Geräte .....	14
2.2	Verbrauchsmaterialien .....	15
2.3	Chemikalien, Enzyme und Lösungen .....	15
2.4	Kits .....	17
2.5	Oligonukleotide .....	17
2.6	Bioinformatische Analyse.....	18
2.7	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	19
2.7.1	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit .....	19
2.7.2	RNA-Isolierung aus <i>E. multilocularis</i> .....	19
2.7.3	Reverse Transkription von RNA in cDNA .....	20
2.7.4	Amplifizierung von DNA mittels PCR und deren Aufreinigung.....	20
2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	20
2.7.6	Restriktionsverdau und Ligation von DNA Fragmenten in Plasmide ...	21
2.7.7	Quantitative Polymerasekettenreaktion .....	21
2.8	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.8.1	Bakterienstamm und Medium .....	22

2.8.2	Transformation und Genexpression in <i>E. coli</i> .....	23
2.8.3	Plasmidisolierung von <i>E. coli</i> und Plasmidsequenzierung .....	23
2.8.4	Kolonie-PCR .....	23
2.9	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.9.1	Hefestamm und Medium .....	24
2.9.2	Yeast-two-Hybrid .....	24
2.10	Arbeiten mit <i>E. multilocularis</i> .....	25
2.10.1	Isolate und Medium .....	25
2.10.2	<i>In vivo</i> Kultivierung und Isolierung von Parasitenmaterial .....	26
2.10.3	Kultivation von Fütterzellen und <i>in vitro</i> Metacestodenkultivation .....	26
2.10.4	Axenische Kultivation .....	26
2.10.5	Kennzeichnung proliferierender Zellen mit EdU und EdU-Detektion ...	27
2.10.6	Whole Mount <i>In Situ</i> Hybridisierung .....	27
2.10.7	Konfokalmikroskopie .....	27
2.10.8	Isolierung und <i>in vitro</i> Kultivation von Primärzellen .....	28
2.10.9	Inhibitorstudien an Primärzellen und Metacestoden .....	29
2.10.10	RNAi-Studien an Primärzellen .....	30
3	Ergebnisse .....	32
3.1	Bioinformatische Analyse von MAPK-Komponenten .....	32
3.1.1	Übersicht über mutmaßliche MAPK-Komponenten in <i>E. multilocularis</i>	32
3.1.2	Mutmaßliche MAP3K in <i>E. multilocularis</i> .....	33
3.1.3	Mutmaßliche MAP2K in <i>E. multilocularis</i> .....	38
3.1.4	Mutmaßliche MAPK in <i>E. multilocularis</i> .....	41
3.2	Charakterisierung der MAP3K EmMCKK1 .....	44
3.2.1	Expression von <i>emmckk1</i> in Metacestoden von <i>E. multilocularis</i> .....	44
3.3	Interaktionsassays von <i>Echinococcus</i> -MAPK-Komponenten .....	47
3.3.1	Interaktionspartner von EmMCKK1 .....	47
3.3.2	Interaktionspartner von EmMPK3 und EmMPK4 .....	52
3.4	Einfluss selektiver und Multi-Kinaseinhibitoren auf <i>E. multilocularis</i> .....	54
3.4.1	Inhibition des ERK-Signalwegs durch selektiven Inhibitor FR180204 .	54
3.4.2	Effekte des Multikinaseinhibitors Dasatinib auf <i>E. multilocularis</i> .....	59
3.5	RNAi-Studien am ERK-Signalweg von <i>E. multilocularis</i> .....	61
3.5.1	Überprüfung der erfolgreichen Genherunterregulation mittels qPCR ..	62
3.5.2	Langzeiteffekte der Herunterregulation der Genexpression .....	63

3.5.3	Auswirkungen der RNAi auf Genexpression von <i>emmucin7429</i> .....	66
4	Diskussion .....	68
4.1	Das komplexe MAPK-Netzwerk von <i>E. multilocularis</i> .....	68
4.1.1	MAPK-Komponenten von <i>E. multilocularis</i> .....	68
4.1.2	Gliederung der MAPK-Komponenten in Signalkaskaden .....	70
4.1.3	ERK-Signaling in <i>E. multilocularis</i> .....	72
4.2	Die Bedeutung EmMKKK1-vermittelter Signalwege in <i>E. multilocularis</i> .....	75
4.2.1	Bedeutung bei Parasiten-Wirt-Interaktion .....	75
4.2.2	Bedeutung bei der Stammzellenregeneration.....	76
4.2.3	Potenzial als neuer pharmakologischer Angriffspunkt .....	76
4.3	Fazit .....	78
5	Zusammenfassung .....	79
6	Summary .....	80
7	Literaturverzeichnis.....	82
8	Abkürzungsverzeichnis.....	88
9	Anhang .....	89
9.1	Quellen für Genomvorhersagen und Proteinsequenzen.....	89
9.2	Anfragen zur Identifikation von <i>E. multilocularis</i> Homologen auf NCBI .....	89
9.3	Proteinsequenzen für phylogenetische Analyse der MAPK-Komponenten .	91
9.4	cDNA-Sequenzen von <i>Echinococcus</i> -MAPK-Komponenten .....	92
	Danksagung .....	96
	Lebenslauf.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	Eidesstattliche Erklärung .....	98

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis*

### 1.1.1 Epidemiologie von *E. multilocularis*

Der zur Gattung der Zysten formenden Cestoden (= Echinokokken) gehörende Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*) ist der Erreger der alveolären Echinokokkose (AE) und ist vornehmlich in der nördlichen Hemisphäre von Nordamerika und Europa über die Türkei bis nach Zentralasien, Russland und China anzutreffen (siehe Abbildung 1) (Craig 2003). Die Prävalenz in Füchsen beträgt in Süddeutschland bis zu 50% (Deplazes et al. 2017).

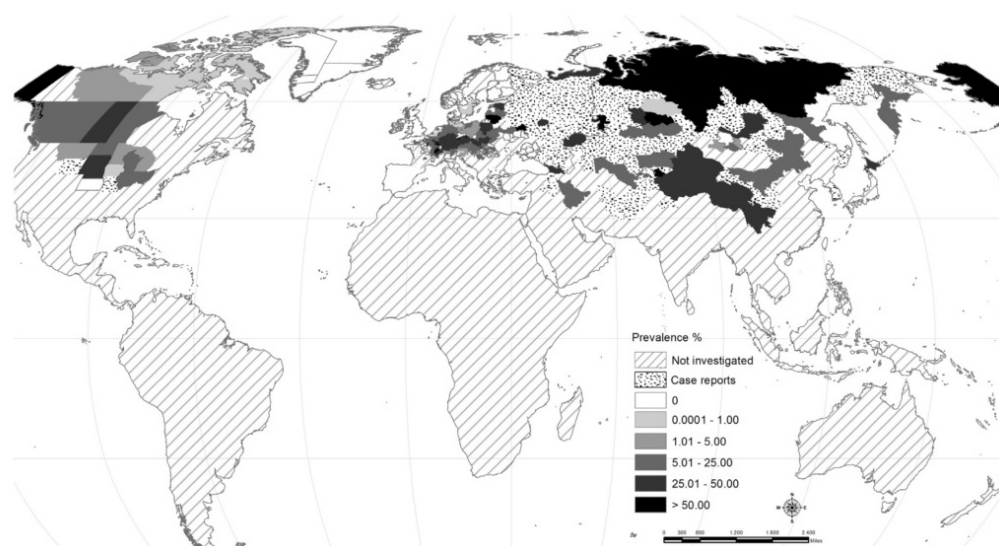


Abbildung 1 Aktuelle globale Verteilung und Prävalenz von *E. multilocularis* in wichtigsten wilden Endwirten (Deplazes et al. 2017).

### 1.1.2 Lebenszyklus von *E. multilocularis*

Bei dem Lebenszyklus von *E. multilocularis* handelt es sich um einen sylvatischen Zyklus, der zwei Säugetiere als Wirte umfasst (siehe Abbildung 2). Der adulte Wurm mit einer Größe von bis zu 4,5mm bewohnt asymptomatisch den Dünndarm des sogenannten Endwirts (in Europa überwiegend Rotfüchse *Vulpes vulpes*, aber auch anderer Arten aus der Hundefamilie) und produziert in seiner graviden Proglottide (letztes Cestodensegment) Eier mit infektiösen Sechshakenlarven (Oncospheren). Proglottiden und freie Eier werden mit den Fäzes ausgeschieden, können Monate in der Umwelt überdauern und werden von sogenannten Zwischenwirten (kleinen Säugetieren, v.a. Nagern) oral aufgenommen (Craig 2003; Eckert und Deplazes 2004). In Magen und Darm des Zwischenwirts wird die Oncosphere aktiviert und schlüpft, durchdringt die Mucosa des Darms und gelangt über die Pfortader zur Leber. Hier entwickelt sich die Sechshakenlarve zum Metacestoden-Larvenstadium weiter (Brehm

2010b; Craig 2003; Koziol et al. 2016). Diese Metacestodenvesikel besitzen eine innere germinative Schicht (engl. germinal layer) zur Nährstoffaufnahme und zum Wachstum mit Glykogenspeicherzellen, Muskelzellen, Nervenzellen und undifferenzierten Stammzellen, die von einem synzytial Tegument umgeben werden. Dieses sezerniert eine äußere azelluläre Laminalschicht aus Muzinfibrillen (engl. laminal layer), die die Empfänglichkeit für die Immunantwort des Wirts reduziert. Im Laufe der Zeit werden die Vesikel durch granulomatöse Infiltration und später dichter Fibrose vom Wirtsgewebe abgeschirmt. Das Innere der Vesikel ist mit Hydratidenflüssigkeit, unter anderem aus Proteinen, Glukose und Aminosäuren, gefüllt und stellt eine Art Nährstoffreservoir des Parasiten dar (Brehm und Koziol 2017; Koziol und Brehm 2015). Nach zwei bis vier Monaten invaginieren Verdickungen der Germinalschicht in den Vesikel und bilden Brutkapseln, in denen Protoscolices (Proformen des adulten Scolex) entstehen (Brehm und Koziol 2017). Wird der vom Parasiten befallene Nager in der natürlichen Räuber-Beute-Beziehung vom Endwirt gefressen, entwickelt sich der evaginierte Protoscolex im Dünndarm seines neuen Wirts innerhalb von circa einem Monat in einen neuen adulten Wurm und der Kreislauf ist geschlossen. Auch von Menschen können die infektiösen Eier aufgenommen werden und ein Befall der Leber durch Metacestoden das gefährliche Krankheitsbild der AE verursachen (Craig 2003).

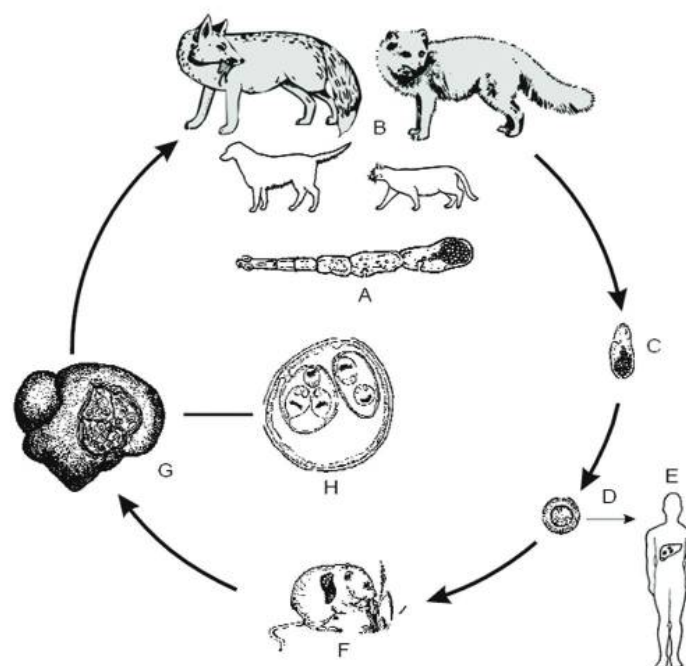


Abbildung 2 **Lebenszyklus von *E. multilocularis*** (A) Adulter Parasit (B) Füchse (links Rotfuchs, rechts arktischer Fuchs) als wichtigste Endwirte (C) Proglottide mit Eiern (D) Ei mit Oncosphere (E) Infektion eines Menschen (F) Nager mit Metacestodeninfektion (G) Leber eines Nagers mit Metacestoden (H) Metacestodenzyste mit Protoscolices (Eckert und Deplazes 2004).

### 1.1.3 Parasiten-Wirt-Interaktion

Verschiedene Aspekte weisen auf eine große Bedeutung der Interaktion mit den Wirt für den Parasiten hin: *E. multilocularis* besitzt kein eigenes Verdauungssystem und nur eine begrenzte *de novo* Biosynthesefähigkeit für Lipide, Cholesterol oder verschiedenen Aminosäuren, sodass der Parasit von der Aufnahme von Nährstoffen seines Wirts abhängig ist (Brehm und Koziol 2017; Koziol und Brehm 2015). Diese These wird durch das Vorhandensein von Genen zur Nährstoffaufnahme über Transporter im *Echinococcus*-Genom, z.B. spezielle Fettsäuretransporter und eine hohe Expression von lipidbindenden Proteinen, gestützt (Brehm und Koziol 2017; Tsai et al. 2013). Die Abhängigkeit der Metacestoden von Wirtszellen spiegelt sich auch in der *in vitro* Kultivation wieder, bei der Serum und Fütterzellen bzw. konditioniertes Medium mit reduzierenden und hypoxischen Konditionen für die erfolgreiche Kultivation unabdingbar sind (Spiliotis et al. 2004). Über evolutionär konservierte Signalwege ist prinzipiell eine Cross-Kommunikation auch zwischen verschiedenen Organismen möglich. So ist außerdem denkbar, dass der Fuchsbandwurm Wirtshormone und -zytokine wie Insulin oder Wachstumsfaktoren (z.B. Epidermale Wachstumsfaktoren (EGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF)) für Organotropismus und Wachstums- und Entwicklungsregulation nutzen kann und Hormone und Zytokine sezerniert, um zum Beispiel die Immunantwort seines Wirtes zu modifizieren (Brehm 2010b). Eine Immunantwort mit Antikörperbildung zeigt den direkten Kontakt zwischen Wirtszellen und Parasitenproteinen und sezernierte Proteasen könnten zudem eine Rolle in der Destruktion des umgebenden Wirtsgewebes und der Induktion von neuen Blutgefäßen zur besseren Akquirierung von Nährstoffen spielen (Brehm und Koziol 2017).

### 1.1.4 Besondere Regenerationsfähigkeit von *E. multilocularis*

*E. multilocularis* besitzt undifferenzierte germinativen Zellen, die als einzige Zellart im Organismus zur Mitose befähigt sind und dadurch die einzige Quelle der Zellproliferation, -differenzierung und asexuellen Vermehrung zu sein scheinen (Koziol und Brehm 2015). Wie Neoblasten der verwandten Plattwürmer besitzen sie ein großes Selbsterneuerungspotenzial, welches in enormer Entwicklungsplastizität und regenerativer Kapazität resultiert und sich in der „Unsterblichkeit“ des Metacestodengewebes bei der unendlichen Passage *in vivo* widerspiegelt (Koziol und Brehm 2015; Wagner et al. 2011).



## 1.2 Alveoläre Echinokokkose

### 1.2.1 Definition, Klinik und Epidemiologie der AE

Die AE wird von der WHO als seltene und vernachlässigte Krankheit angesehen und derzeit im ICD-10 unter den Nummern B67.5 bis B67.7 kodiert (<http://www.icd-code.de>, Stand 19.8.2018, (Siles-Lucas et al. 2018)). Bei der potenziell tödlichen Krankheit kommt es nach fünf bis 15 Jahren asymptomatischer Inkubationszeit zum chronisch progressiven Leberbefall mit Hepatomegalie, abdominellen Schmerzen und cholestatischem Ikterus (Brunetti et al. 2010; Craig 2003). In ca. 1/3 der Patienten wird die Erkrankung als Zufallsbefund entdeckt (Brunetti et al. 2010; Torgerson et al. 2008). Der Parasit infiltriert die Leber des Menschen mit alveolären, multivesikulären Strukturen (< 1mm bis 3cm Durchmesser), bildet Mikrokalzifikationen bis zu Nekrosehöhlen und präsentiert sich durch sein invasives Wachstum und der möglichen Metastasierung in Lunge und Gehirn klinisch wie ein Tumor (siehe Abbildung 3). Unbehandelt liegt die mittlere 10-Jahres-Überlebensrate bei ca. 30%, die 15-Jahres-Überlebensrate bei 0% (Craig 2003; Eckert und Deplazes 2004; Gottstein et al. 2015).

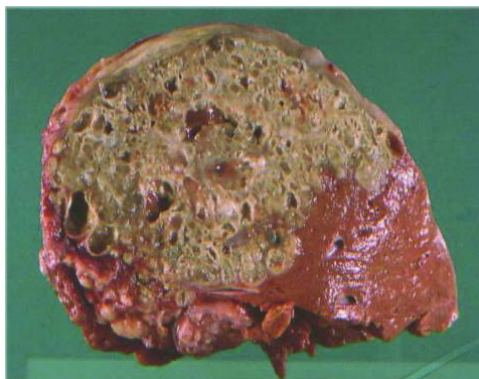


Abbildung 3: **Hepatische alveoläre Echinokokkose** in 62-jährigem schweizer Patienten (maximaler Durchmesser einer einzelnen Zyste ca. 1,5cm) (Eckert und Deplazes 2004).

In Europa wird derzeit von ca. 1600 Erkrankungen pro Jahr ausgegangen (Deplazes et al. 2017), die mittlere Inzidenzrate in Zentraleuropa liegt bei 0,03 bis 0,3/100 000 Einwohner/Jahr (Gottstein et al. 2015). Weltweit treten etwa 90% der Fälle von humaner alveolärer Echinokokkose in China auf, wo in Dörfern der Provinz Gansu bis zu 15% der Bevölkerung infiziert sein sollen (Craig 2003; Deplazes et al. 2017). Eine genaue Erfassung der Risikofaktoren einer Infektion ist aufgrund der langen Inkubationszeit schwierig, ein erhöhtes Risiko wird aber bei einer Beschäftigung in der Landwirtschaft, Jagd und Forstarbeit, Hunde- oder Katzenbesitz, sowie Wohnen auf dem Land mit Kontakt zu infizierten Tieren und kontaminierter Nahrung und Trinkwasser angenommen (Craig 2003; Eckert und Deplazes 2004; Vuitton et al. 2015).

### **1.2.2 Diagnostik und Staging der AE**

Der diagnostische Algorithmus beinhaltet primär die Bildgebung, gefolgt von einer serologischen Bestätigung (Ito und Craig 2003). Hierbei ist zunächst die Sonographie Methode der Wahl, bei der sich die AE häufig als Pseudotumor mit hyper- und hypoechogenem Gewebe, unregelmäßiger Begrenzung und Verkalkungen oder als pseudozystische zentrale Nekrose mit umgebendem hyperechogenem Ring darstellt (Brunetti et al. 2010). Auch Magnetresonanztomographie und Computertomographie können hinzugezogen werden, um die Diagnosestellung in unklaren Fällen zu erleichtern (Eckert und Deplazes 2004). Serologische Verfahren umfassen Immunodiagnostik mit ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) auf Antigene der EM10-Proteinfamilie mit einer Sensitivität von 90-100% und bestätigende Immunoblot-Tests mit hoher Spezifität (Brunetti et al. 2010; Ito und Craig 2003). Die Sicherung der Diagnose ist unter anderem durch histologische Beurteilung von chirurgischem oder bioptischem Material, eventuell unterstützt von Immunhistologie, ELISA oder PCR (Polymerasekettenreaktion), zu erreichen (Eckert und Deplazes 2004). Auf Basis der Bildgebung wird die AE anhand des WHO-IWGE-Klassifikationssystem in verschiedene Stadien eingeteilt. Hierbei umfassen die Kategorien die Ausdehnung in der Leber (P), die Infiltration von Nachbarorganen (N), sowie das Vorkommen von Metastasen (M) (Brunetti et al. 2010).

### **1.2.3 Therapie und Prognose der AE**

Die Behandlungsoptionen der AE sind noch immer begrenzt und beinhalten die radikale Chirurgie als einzige kurative Therapieoption. Die Voraussetzung bildet eine R0-Resektion, also die vollständige Entfernung des parasitären Materials ohne Verbleib mikroskopischer Reste im gesunden Gewebe. Hierfür muss die hepatische Läsion lokal begrenzt sein und bei der Resektion sollte ein makroskopischer Sicherheitsabstand zur Läsion von zwei Zentimetern eingehalten werden können. Operationsrisiken umfassen unter anderem die Verletzung großer Gefäße und bakterielle Infektionen. Zur Rezidivsenkung ist eine postoperative Medikation mit Benzimidazolen für mindestens zwei Jahre unverzichtbar (Brunetti et al. 2010; Buttenschoen et al. 2009).

Da eine inkomplette Resektion keinen Vorteil gegenüber der konservativen Behandlung bringt, sind chirurgische Verfahren in diesem Fall nur eine Option für nicht anders kontrollierbare Komplikationen. Nur ein Beispiel wäre die Entfernung nekrotischen Materials zur Reduktion des Risikos einer bakteriellen Superinfektion mit

konsekutiver Sepsisgefahr (Buttenschoen et al. 2009). Bei lokalen Komplikationen wie Leberabszessen, Gallengangsobstruktionen, Venenthrombosen oder Blutungen aus Ösophagusvarizen sind endoskopische und perkutane Interventionen eine Alternative zur herkömmlichen offenen Chirurgie. Die Durchführung wird allerdings nur empfohlen, wenn keine Kontraindikationen einer postinterventionellen Benzimidazolgabe bestehen. Lebertransplantationen können bei Patienten mit schwerer Leberinsuffizienz oder Leberversagen eine *ultima ratio* darstellen. Die Voraussetzungen hierfür sind die fehlende Möglichkeit einer radikalen Operation, das Fehlen extrahepatischer Foci und die Durchführbarkeit einer konsekutiven Immunsuppression und Benzimidazoltherapie (Brunetti et al. 2010).

Zur pharmakologischen Behandlung der AE sind seit 1970 bis heute nur Albendazol als Mittel der ersten Wahl (da besser bioverfügbar, effizienter, weniger UAWs) und Mebendazol zugelassen, die als postoperativ verpflichtendes Add-On oder alleinige medikamentöse Therapie bei Inoperabilität eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um Benzimidazole, heterozyklische aromatische organische Moleküle, die eine große therapeutische Aktivität mit antimikrobieller und antiinflammatorischer Wirkung aufweisen. Ihr Potenzial liegt in der Inhibition Mikrotubuli-vermittelter Zellprozesse durch die Interferenz mit dem Auf- und Abbau von Mikrotubuli-Polymeren aus Tubulinen. Die derzeitigen Dosisempfehlungen liegen bei 10-15mg/kg\*d in zwei Dosen für Albendazol und 40-50mg/kg\*d in drei Dosen für Mebendazol, stets oral zu fettigen Mahlzeiten eingenommen (Brunetti et al. 2010; Siles-Lucas et al. 2018). Aufgrund ihrer primär parasitostatischen Wirkung und daraus folgender Rezidivgefahr bei Therapieunterbrechung sind die Medikamente – auch nach inkompletter Resektion – lebenslang einzunehmen. Weitere Probleme dieser Behandlung ergeben sich aus der geringen Bioverfügbarkeit aufgrund schlechter Absorption und schneller Metabolisierung und daraus folgend erschwerten therapeutischem Drug Monitoring und geringer Effektivität bei multivesikulären Zysten (Siles-Lucas et al. 2018). Da Tubuline zwischen Mensch und Parasit evolutionär gut konserviert sind und über 90% identische Aminosäurereste besitzen, führt eine Behandlung mit Benzimidazolen durch unerwünschten Angriff auf menschliches Tubulin vor allem bei Langzeitanwendung zu verschiedenen Nebenwirkungen (Koziol und Brehm 2015; Siles-Lucas et al. 2018). Hier wurde in der Literatur unter anderem gastrointestinale Symptome, Hepatotoxizität mit Erhöhung der Lebertransaminasen, sowie eine potenziell knochenmarkssuppressive Wirkung mit konsekutiver Thrombozytopenie

und Lymphozytopenie beschrieben (Junghanss et al. 2008; Siles-Lucas et al. 2018). Das Auftreten von Nebenwirkungen wird bei Mebendazol bei 5-40%, bei Albendazol bei 3-5% der therapierten Patienten beobachtet (Siles-Lucas et al. 2018). Eine engmaschige Überwachung der Pharmakotherapie mit Reduktion der Dosis, Wechsel zwischen den Substanzen oder eventuellem Abbruch der Therapie bei nicht tolerierbaren Nebenwirkungen sind unabdingbar (Brunetti et al. 2010). Vorsicht ist bei vorbestehender reduzierter Knochenmarkfunktion, chronischen Lebererkrankungen und bei Gefahr der Ruptur einer Zyste geboten. Da eine teratogene Wirkung von Albendazol in Tierexperimenten beobachtet wurde, ist die Behandlung von Schwangeren und Kindern unter sechs Jahren nur nach klarer Risiko-Nutzen-Abwägung indiziert (Bradley und Horton 2001).

Für die Prognose scheinen das Alter bei Infektion und Eintreten von Symptomen, die Größe und Zustand der Zysten, sowie eine frühe Diagnosestellung und frühes Einsetzen der Therapie entscheidend zu sein (Siles-Lucas et al. 2018). Es empfiehlt sich eine multidisziplinäre Therapie in speziellen Behandlungszentren mit regelmäßiger Evaluation von Therapie und Nebenwirkungen (Torgerson et al. 2008).

#### **1.2.4 Präventionsmaßnahmen**

Ein bis zu vierfacher Anstieg der Fuchspopulationen nach Einführung von Tollwutimpfungen, die zunehmende Urbanisation von infizierten Füchsen und die steigende Prävalenzrate von *E. multilocularis* in Füchsen auf 35-65% in Zentraleuropa lassen mit einiger Latenz einen Anstieg der Inzidenzzahlen erwarten, wie es bereits in der Schweiz beobachtet worden ist (Romig et al. 2006; Schweiger et al. 2007; Vuitton et al. 2015). So hat sich aufgrund steigender Umweltkontamination bereits ein „domestic cycle“ mit Hunden und anderen Haustieren als Endwirten etabliert und sich sogar Primaten in europäischen Zoos mit den Eiern infiziert (Gottstein et al. 2015). Globalisierungsprozesse tragen zur Ausweitung der endemischen Gebiete nach Nord-, Ost- und Westeuropa bei (Deplazes et al. 2017; Hegglin und Deplazes 2013). Da die alleinige Behandlung von erkrankten Menschen keine Auswirkungen auf die Verbreitung der Krankheit hat, sind zur Kontrolle und Eindämmung der AE langfristige, auf lokale Gegebenheiten angepasste Strategien notwendig. Diese umfassen zum Einen die gesellschaftliche Aufklärung und Anleitung zu individuellen Hygienemaßnahmen, Kontaktvermeidung zu potenziell infizierten Tieren und regelmäßigen Entwurmung von domestizierten Hunden mit Kontakt zu wilden Nagern, zum Anderen einen direkten Eingriff in den Lebenszyklus des Parasiten durch eine

Reduktion der Umweltkontamination mit infektiösen Eiern durch Kontrolle von End- und Zwischenwirtpopulationen und der Parasitenlast der Endwirte durch regelmäßige Endwurmung mittels Praziquantel-Ködern (Craig et al. 2017; Hegglin und Deplazes 2013; Moro und Schantz 2009).

### 1.3 Ansatzpunkte für neue Therapien

Noch immer konnte aufgrund der lediglich parasitostatischen Wirkung von Benzimidazolen, ihren teils schwerwiegenden Nebenwirkungen und dem Fehlen von Alternativen bei Therapieversagen keine zufriedenstellende Therapie der AE etabliert werden. Daher sind vor dem Hintergrund des zu erwartenden Anstiegs der Inzidenzzahlen neue chemotherapeutische Ansatzpunkte dringend nötig (Brehm 2014; Siles-Lucas et al. 2018; Vuitton et al. 2015). Für die zielführende Suche wurden hierfür in letzter Zeit vielversprechende Voraussetzungen geschaffen: *E. multilocularis* kann durch serielle intraperitoneale Passage in Labortieren – idealerweise Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) – über Jahre in einem *in vivo* Kultursystem erhalten werden (Spiliotis und Brehm 2009) und in Kombination mit Kokulturmethode konnte *in vitro* ein Zellkultursystem etabliert werden, das gezielte Studien zu Parasitenentwicklung, Wirt-Parasiten-Interaktion und pharmakologischen Aspekten erlaubt (Brehm und Koziol 2017). Die Aufklärung des *E. multilocularis* Genoms (Tsai et al. 2013) kann diese Studien unterstützen und ermöglicht die Identifikation neuer potenziell medikamentös angreifbarer Proteine mittels bioinformatischer Ansätze (Siles-Lucas et al. 2018). Verfügbare Expressionsdaten befähigen zur Erstellung stammzellspezifischer Transkriptomprofile und die Etablierung eines axenischen (wirtszellfreien) Kultursystems von Metacestoden und Primärzellen erlaubt Screenings spezifischer pharmakologischer Inhibitoren und funktionelle Studien an Genen und Signalwegen, zum Beispiel anhand spezifischer Herunterregulation einzelner messenger RNA (mRNA) mittels RNA-Interferenz (RNAi) (Koziol und Brehm 2015; Spiliotis und Brehm 2009). Auch eine *in vivo* Testung von vielversprechenden Substanzen an Labortieren ist denkbar (Brehm 2014).

Proteinkinasen bilden einen solchen potenziellen neuen pharmakologischen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antiparasitärer Chemotherapeutika, da sie unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulation des zellulären Wachstums und Proliferation besitzen und daher als wichtige Vermittler externer Signale in

Stammzellen angenommen werden können (Brehm 2014). Ihre Bedeutung unterstreichen *Echinococcus*-Genomdaten, die 255 proteinkinasekodierende Gene listen, von denen ca. 60% in Metacestoden exprimiert werden und daher als Zielstruktur bei der Behandlung an AE erkrankter Menschen in Frage kommen könnten (Brehm 2014; Tsai et al. 2013). Proteinkinasen binden nicht nur das entsprechende Substrat, sondern besitzen auch eine ATP (Adenosintriphosphat) -bindende Tasche. Über diese kann mit kleinmolekularen Substanzen wie beispielsweise ATP-kompetitiven Inhibitoren eine leichte Hemmung und Modifikation der Enzymaktivität erreicht werden (Brehm und Koziol 2017). Signalkaskaden spielen auch in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle, da sie durch Dysregulationen der Zellwachstumskontrolle zu Neoplasien führen können. Daher ist ihre Biochemie besonders gut untersucht und bereits viele Medikamente mit entsprechenden Ansatzpunkten im klinischen Einsatz. Diese hätten bei antiparasitärer Wirkung ein großes Potenzial in der Therapie der AE, da die präklinische Phase umgangen werden könnte (Brehm 2014). Auch wenn diese speziell für humane Kinasen entwickelt wurden und daher oft eine geringere Affinität zu parasitären Enzymen aufweisen, lassen sie sich aufgrund ihrer verfügbaren biochemischen Daten zumindest als Ausgangspunkt für die Entwicklung ähnlicher Substanzen mit selektivem Effekt gegen den Parasiten nutzen (Brehm und Koziol 2017). Aufgrund von vielfältigen Homologien zwischen Cestodenkinomen kann außerdem erwartet werden, dass neue Therapieansätze auf weitere weltweit bedeutsame humanitäre Parasitenerkrankungen (Erreger: *Echinococcus granulosus*, *Taenia solium*) übertragbar sind, für die noch kein Kultursystem etabliert werden konnte (Brehm 2014).

## **1.4 MAP-Kinase-Kaskade**

### **1.4.1 MAP-Kinase-Kaskade in Säugetieren**

Solche Proteinkinasen stellen unter anderem Vertreter von Mitogen-activated Proteinkinase (MAPK) -Kaskaden dar. Sie sind Komponenten eines interaktiven Netzwerks, das Zellen die koordinierte und spezifische Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli und ihre integrierte Funktion im Organismus ermöglicht. Über Steuerung von zellulären Prozessen wie Genexpression, Zellmetabolismus oder Zellzyklus und Apoptose vermitteln sie unter anderem die Reaktion auf Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und Stress und können daher als Schlüsselregulatoren von Zelldifferenzierung, -proliferation und -tod angesehen werden. Sie agieren meist

sequenziell in dreistufigen Kaskaden und sind als eine der am weitesten verbreiteten Mechanismen eukaryotischer Zellregulation evolutionär konserviert (Krishna und Narang 2008; Pearson et al. 2001).

Aktiviert ein extrazellulärer Initiator seinen spezifischen Zelloberflächenrezeptor, zum Beispiel Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-gekoppelte Rezeptoren, so kann dieser entweder direkt oder über Interaktion mit kleinen GTPasen (kleine G-Proteine) der Ras-/Rho-Familie MAPK-Kinase-Kinasen (MAP3K, Serin-Threonin-Kinasen) phosphorylieren und somit aktivieren. Diese können wiederum downstream MAPK-Kinasen (MAP2K) phosphorylieren und aktivieren. Hierbei handelt es sich um dualspezifische Enzyme, die konsekutiv ihre Substrate (MAPK) an Threonin- und Tyrosinstellen von konservierten Dreipeptid-TXY-Motiven phosphorylieren. In Zytosol und Nukleus phosphorylieren diese aktivierten MAPK unter anderem Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Zytoskelettproteine, präferenziell an Serin- und Threoninstellen die von Prolin gefolgt werden, und führen so zu Veränderungen in Proteinfunktionen und Genexpression als biologische Antwort auf den initialen Stimulus (Krishna und Narang 2008; Morrison 2012). Spezielle Dockingstellen sorgen für Selektivität der verschiedenen MAPK-Komponenten (Yang et al. 2013). Durch Interaktion mit Gerüstproteinen, Komplexbildung, überlappender Substratspezifität und Zusammenspiel verschiedener Signalwege wird eine Signaldiversifizierung und -modifizierung erreicht. Des Weiteren übernehmen Phosphatasen über Feedbackmechanismen eine wichtige Aufgabe in der Herunterregulierung der Kinasen (Krishna und Narang 2008; Pearson et al. 2001).

MAPK-Kaskaden werden nach ihrer jeweiligen MAPK-Komponente benannt, von denen die Signalwege der „extracellular-signal-regulated kinases“ ERK, „Jun amino-terminal kinases“ JNK und „stress-activated protein kinases“ p38/SAP-Kinasen am besten untersucht sind (Krishna und Narang 2008).

ERK reagiert primär auf Wachstumsfaktoren und Mitogene, die Zellproliferation und -differenzierung induzieren. Für diese Gruppe charakteristisch ist das TEY-Motiv und es sind über 150 Substrate von ERK bekannt. Raf, MEK1 und MEK2 sind nur einige Komponenten der entsprechenden Signalkaskade. Sowohl die JNK-, als auch die p38-Kaskade werden als Reaktion auf extrazellulären Stress wie UV-Schäden, Ionisierung, DNA-schädigende Agenten oder inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  aktiviert und führen unter anderem zu Inflammation und Apoptose. Der Effekt auf die Genexpression wird bei JNK – vermittelt über je nach Stimulus spezifische MAP3K wie MEKK1 und die MAP2K MKK4 und MKK7 – durch Transkriptionsfaktoren und nukleäre Hormonrezeptoren erzielt. In der Aktivierungsdomäne besitzen sie ein TPY-Motiv. Die p38-Kinasen sind durch ihr TGY-Motiv gekennzeichnet und können auch durch Wachstumsfaktoren oder Insulin aktiviert werden und zu Zelldifferenzierung und Zellzyklusregeneration führen. Kleinmolekulare GTP-Bindeproteine wie Ras, viele MAP3K und die MAP2K MKK3 und MKK6 sind ebenfalls in den Signalweg involviert (siehe Abbildung 4) (Krishna und Narang 2008; Morrison 2012).

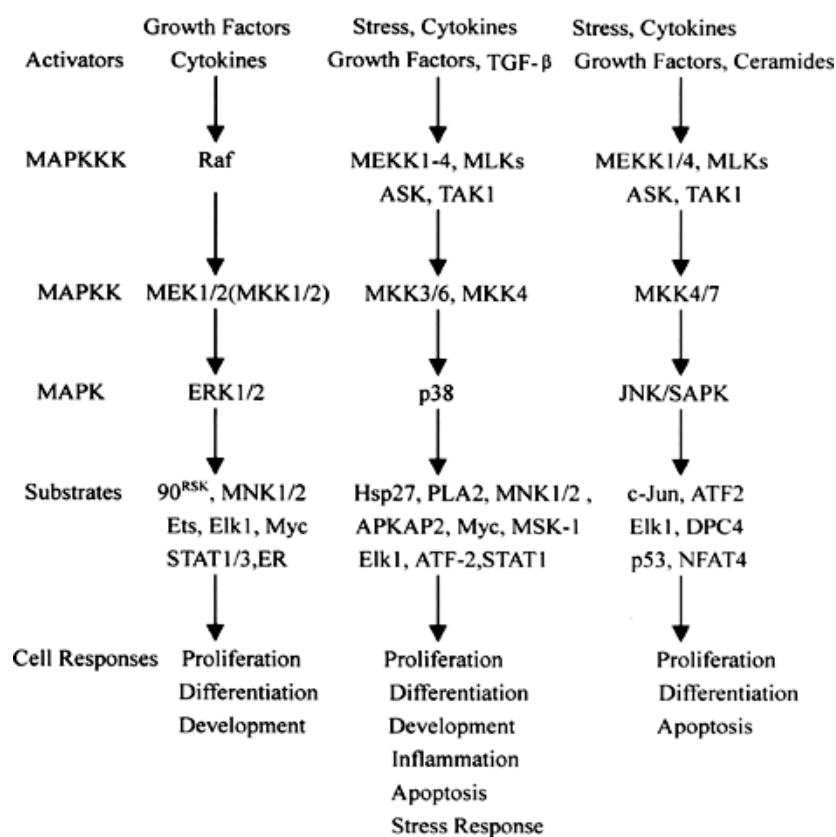


Abbildung 4 Wichtigste MAP-Kinase-Kaskaden in Säugetierzellen (Zhang und Liu 2002)



#### 1.4.2 MAPK-Kaskade in *E. multilocularis*

Als evolutionär konserviertes Signalsystem werden MAPK-Komponenten auch in *E. multilocularis* exprimiert und könnten dem Parasiten als Vermittler dienen, um Wachstumsfaktoren des Wirts für seine eigene Wachstums- und Entwicklungsregulation zu nutzen (Brehm und Koziol 2017; Tsai et al. 2013). Darüber hinaus deuten Studien auf die Beteiligung dieser Signalmodule an der enormen Regenerationsfähigkeit und der Achsenformation in Planarien hin (Tasaki et al. 2011a; Tejada-Romero et al. 2015). Dies alles macht das Netzwerk der MAPK-Komponenten in Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten der AE interessant (Brehm 2014). Vor diesem Hintergrund konnte bereits ein komplettes MAPK-Signalmodul aus der ERK-ähnlichen MAPK EmMPK1 (Spiliotis et al. 2006), der MAP2K EmMKK2 (Gelmedin et al. 2010), der MAP3K EmRaf und der GTPase EmRas (Spiliotis et al. 2005) aufgeklärt werden. Auch konnte gezeigt werden, dass EmMPK1 durch Wirtsserum und humanes EGF aktiviert wird (Spiliotis et al. 2006). Somit liegt die Vermutung nahe, dass parasitäre EGF-Rezeptoren tatsächlich mit Wachstumsfaktoren des Wirts interagieren können (Brehm und Koziol 2017). Als weitere MAPK-Komponenten wurden die p38-ähnliche MAPK EmMPK2 (Gelmedin et al. 2008), die MKK3/6-ähnliche MAP2K EmMKK1 (Gelmedin et al. 2010) und die GTPase EmRal beschrieben (Spiliotis et al. 2005), wobei die zugehörigen Interaktionspartner bis dato unbekannt sind (Brehm und Koziol 2017). Genomische Informationen lassen aber auf mindestens eine weitere MAPK der JNK-Familie, drei weitere MAP2K und viele weitere MAP3K und GTPasen schließen, sodass hier viel Bedarf für weitere Forschung besteht (Tsai et al. 2013).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die AE, verursacht vom Metacestodenlarvenstadium des Fuchsbandwurms *E. multilocularis*, ist eine weit verbreitete, potenziell tödlich verlaufende Zoonose, der es an adäquaten Behandlungsmöglichkeiten fehlt. Auf der Suche nach neuen molekularen Zielstrukturen zur Behandlung wurde bereits das Potenzial intrazellulärer Signalkaskaden erkannt und beschrieben (Brehm 2014). Solche Signalsysteme stellen unter anderem MAPK-Module dar. Diese scheinen durch die Integration externer Wachstumsstimuli entscheidend an der Parasiten-Wirt-Interaktion beteiligt zu sein (Spiliotis et al. 2006), eine essentiellen Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung von Stammzellen spielen (Tasaki et al. 2011a) und sich als evolutionär konservierte Strukturen besonders für die Entwicklung von Chemotherapeutika eignen, da sie biochemisch in der Tumorthherapie bereits gut untersucht sind (Brehm 2014). Auch wenn bereits eine vollständige MAPK-Signalkaskade in *E. multilocularis* entschlüsselt werden konnte, ist immer noch wenig über die spezifischen Funktionen von MAPK-Komponenten in *E. multilocularis* und weitere Interaktionspartner bekannt (Brehm und Koziol 2017).

In Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Genom- und Transkriptomanalysen und *in vitro* Kultivierungsmethoden weitere MAPK-Komponenten in *E. multilocularis* charakterisiert. Dabei wurden folgende Fragen adressiert:

- 1) Welche MAPK-Komponenten sind im *Echinococcus*-Genom kodiert und wie sehen ihre Expressionsmuster aus?
- 2) In welcher Beziehung stehen die einzelnen MAPK-Komponenten zueinander?
- 3) Welchen Einfluss haben Herunterregulation und Inhibition verschiedener MAPK-Komponenten auf Proliferation und Differenzierung des Parasiten?
- 4) Inwieweit führen die gewonnenen Ergebnisse zum besseren Verständnis der Parasiten-Wirt-Interaktion und dem Selbsterneuerungspotenzial und welches Potenzial liefern diese Erkenntnisse in Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten der AE?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Abzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Blotschüttler	Edmund Bühler, Tübingen
Bunsenbrenner	Schütt, Göttingen
Digitalkamera	Olympus Life Science Europa, Hamburg
Elektroporationsgerät GenePulser Xcell	BioRad Laboratories, München
Geldokumentationsanlage ChemiDoc MP	BioRad Laboratories, München
Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories, München
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubator Heraeus	Thermo Electron, Langenselbold
Inkubator Binder	Binder, Tuttlingen
Inkubator CO <sub>2</sub> Air Jacketed	Nuaire, Plymouth, USA
Konfokalmikroskop TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop Leica IRB	Leica Microsystems, Wetzlar
Microplate Reader TecanReader Infinite F200 pro/Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Neubauer-Zählkammer 0,1mm; 0,0025mm <sup>2</sup>	A. Hartenstein, Würzburg
pH-Meter Lab850	Schott Instruments, Weilheim
Pipetten 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
qPCR StepOnePlus	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Schüttelinkubator G24	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Schüttelinkubator TH38	A. Hartenstein, Würzburg
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage 1.2	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Sicherheitswerkbank NU – 437 – 400 E	Nuaire, Plymouth, USA
Spannungsgerät Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer U-2000	Hitachi, New York, USA
Spektrometer Nanodrop 1000/Software	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Thermocycler T-Gradient, Trio Heated Lid und Trio-ThermoblockTM	Biometra, Göttingen
Thermomixer Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
UV-Lichtteil MO220	Intas, Göttingen
Waage	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Waage ABT 120-5DM	Kern & Sohn, Bahlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Mikrowelle MWS 1820 Duo	Bauknecht, Stuttgart
Vakuumpumpe	ILMVAC, Ilmenau
Vortex Mixer L46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge SpeedVac Plus SC110A	Savant, New York, USA
Zentrifuge Tischzentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-well-, 96-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
24-well-Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvetten	BTX, Holliston, USA
Gaze	A. Hartenstein, Würzburg
Kanülen	Braun Melsungen AG, Melsungen
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulose Membran Whatman Protran BA85	GE Healthcare, München
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter): 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpasteurpipetten 1,5ml	VWR, Leuven, Belgien
Reaktionsgefäße: 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Stangenpipetten: 5ml, 10ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Röhrchen: 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterilfilter EasyStrainer 40µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen: 25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)	Sigma-Aldrich, München
4,6-Diamidin-2-Phenylindol-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Adeninhemisulfat	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alpha-Dig-AP	Roche, Basel, Schweiz
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Bacto-Agar; -Trpytone; -Yeast	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Bathocuproindisulfonsäure	Sigma-Aldrich, München
Blocking Reagent	Roche, Basel, Schweiz
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	AppliChem, Darmstadt
BSA 100x Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
CHAPS	Sigma-Aldrich, München
Control-Dig-RNA	Roche, Basel, Schweiz
Cut Smart Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Denhardt's solution 50x concentrate	Sigma-Aldrich, München
Diethyldicarbonat (DEPC)	AppliChem, Darmstadt
Dig Mix 10x	Roche, Basel, Schweiz
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DNA Ligase T4 & DNA Ligase-Puffer T4	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNase RQ1	Promega, Mannheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roth, Heidelberg
Dropout -Trp/-Leu; -Trp/-Leu/-Ade/-His	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco by life technologies, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco by life technologies, Darmstadt
5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäure-Anhydrid	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco by life technologies, Darmstadt
Fluoprep	Sigma-Aldrich, München
Fluoreszein-Tyramid	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich, München
FR180204	Sigma-Aldrich, München
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glutathion	Sigma-Aldrich, München
H <sub>2</sub> O RNase frei	Qiagen, Hilden
HCl	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, München
Hepes	Sigma-Aldrich, München
Hot Start Fire 5x	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Imidazol	Sigma-Aldrich, München
Kaliumhydrogenphosphat; -chlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München
KOD Hot Start & KOD Hot Start 10x Puffer	Novagen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Ladepuffer Gel Loading 6x Dye Blue/Purple	New England Biolabs, Frankfurt am Main
L-Cystein	Sigma-Aldrich, München
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Novagen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Hohenbrunn
Midori Green (Gel / PCR)	Nippon Genetics, Düren
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg
Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Polyethylen Glycol, 3015-3685M (PEG 3350)	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Fermentas by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Quick Load Ladder 1kbp, 2log-DNA, 50bp	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Resazurin	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsenzyme Nde1, BamH1-HF, EcoR1-HF, Nco1-HF	New England Biolabs, Frankfurt am Main

RNA Polymerase T7 & T7 Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNAse out	AppliChem, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Schaf-Serum	Sigma-Aldrich, München
Smart Ladder	Eurogentec, Köln
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Thermo-Pol-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Torula RNA	Sigma-Aldrich, München
Trehalose	Sigma-Aldrich, München
Triethanolamine (TEA)	Sigma-Aldrich, München
Tris, Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trizol	Invitrogen, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% (w/v)/ PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom, Berlin
Tween-20%	Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid	AppliChem, Darmstadt
Yeast nitrogen base without aminoacid	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

## 2.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Click-it EDU Alexa Fluor 555 Imaging Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DirectZol RNA MiniPrep	ZymoResearch, Freiburg
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Machery Nagel, Weilmünster
NucleoSpin® Plasmid Kit	Machery Nagel, Weilmünster
PureLink RNA mini Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
QIAEX II Gel Extraction Kit (150)	Qiagen, Hilden
RNA Clean & Concentrator Kit	ZymoResearch, Freiburg
SuperScript IV First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

## 2.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
AD up	AGATGGTGCACGATGCACAG
BD up	TTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGTC
CD3RT	ATCCTCTTGAAAGGATCCTGCAGGT <sub>26</sub> V
elp forward	TGATGAAAGTGAAGCCAAGGAAGCTTGGAG
elp reverse	TTCGTCTGGAGCGTCTCATTCTTAGAG
Erk2 dw YH	GATGATGAATTCTCTAGCTCAAAAACCTCGT CTA
Erk2 up YH	GATGAAGGATCCCTACGCGGACTGCTGTGC TC

Grb2-dw-YH	GATGAACATATGGAGGCCGATGCAAAGCAC G
Grb2-up-YH	GATGATGGATCCCTAATTGGGCATAATGGGT GGTAG
Muzin_Dw2	GCTACTAACAGCCCATACATTTG
Muzin_Up1	TGGTCTTCTCAGCGGTG
pJET 1.2 forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET 1.2 reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
qPCR_Erk1_dw	GACCAGTTGAAGATGATTCTTG
qPCR_Erk1_up	CAAATGGGAAGAGTTGCTG
qPCR_Erk2_dw	GCTAATGTTATACACCGTGATTTG
qPCR_Erk2_up	ACATACTCTGTCAGCATACCG
qPCR_Mekk1_dw2	TAGCCCTGGTCACTCTCGTAG
qPCR_Mekk1_up2	GAACGCAGCAGAAAGTGTTG
siRNA Erk1	GUUGCAUCCUAGCCGAGAUGUAU
siRNA Erk2	AAUACAUCAUCCGCUAAUGU
siRNA GFP	ACAUGAAGCAGCACGACUUCUUC
siRNA Mekk1	AUGUUUACAAUUGCGUCAACUGA
Sonde_Mekk1_dw	AACCGCTGGAAAACTG
Sonde_Mekk1_up	TGTCGTAATTCGTGAGAGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGGC

## 2.6 Bioinformatische Analyse

Für einen ersten Überblick über MAP3K, MAP2K und MAPK im *Echinococcus*-Genom wurde bei GeneDB unter dem Stichwort „mitogen activated protein kinase kinase kinase“, „dual specificity mitogen activated protein“ und „mitogen activated protein kinase“ nach potenziellen MAPK-Komponenten von *E. multilocularis* gesucht und entsprechende kodierende Sequenzen (CDS)- und Aminosäure (AS)- Sequenzen von WormbaseParasite (<https://parasite.wormbase.org>, Version WBPS9 (WS258)) entnommen. Weitere potenzielle MAPK-Komponenten wurden über BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), BLASTp und reziproken BLAST dieser Sequenzen gegen das *Echinococcus*-Genom (Sanger Institute) bei BioEdit (Hall 1999), sowie BLASTp und reziproken BLAST von MAPK-Komponenten verschiedener Organismen (siehe Anhang 9.2) gegen das *Echinococcus*-Genom bei NCBI gesucht. Die AS-Sequenzen potenzieller MAPK-Komponenten in *E. multilocularis* wurden mittels SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (Letunic et al. 2015; Schultz et al. 1998) einer Domänenanalysen unterzogen. Mittels BLASTp der gesamten gefundenen *Echinococcus*-Proteinsequenzen und der ermittelten Kinasedomänen gegen die Swissprot Datenbank bei NCBI – organismusunabhängig und unter der Eingrenzung „Homo sapiens“ – wurden Homologien zu vollständigen Proteinen und

Kinasedomänen anderer Organismen analysiert. Für phylogenetische Analysen der MAP3K, MAP2K und MAPK wurden die AS-Sequenzen der jeweiligen möglichen Vertreter dieser Gruppe von *E. multilocularis* mit den AS-Sequenzen der entsprechenden First Hits des gesamten Proteins, sowie der Kinasedomäne der Swissprot Datenbank bei NCBI mit Hilfe von MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar 2004a; Edgar 2004b) alignet. Dieses Alignment wurde dann zur Erstellung phylogenetischer Analysen bei MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al. 2016; Kumar et al. 1994) mittels der Neighbour-Joining-Methode verwendet (Saitou und Nei 1987). Molekulargewichte wurden mittels EsPASy (Expert Protein Analysis System) (Artimo et al. 2012) berechnet. Zur Analyse der Genexpression wurden Transkriptom-Datensets von M. Herz verwendet (Herz 2019). Die Inkubation von Metacestoden mit dem Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor Hydroxyurea (HU) oder spezifischen Polo-like-Kinase 1 Inhibitor BI2536 hat in Studien zur Depletion von Stammzellen geführt (Koziol und Brehm 2015; Schubert et al. 2014). Die in den Datensets ebenfalls enthaltenen Vergleiche des Transkriptoms von Metacestoden aus Kontrollbedingungen mit Metacestoden nach Inkubation mit HU oder BI2536 anhand der Maximum-Likelihood-Methode wurden für die Analyse der Stammzellspezifität verwendet (Herz 2019).

## **2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

### **2.7.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und -reinheit**

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit dem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260nm in 2µl Probe photometrisch gemessen und ihre Reinheit auf der Basis des Verhältnisses von 260nm/240nm für Protein- und 260nm/230nm für Salz-Verunreinigungen bestimmt.

### **2.7.2 RNA-Isolierung aus *E. multilocularis***

Zur Ribonuklease (RNA)-Isolierung wurden entsprechende Zellen aus *Echinococcus*-Zellkulturen resuspendiert und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 200g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 500µl Trizol aufgenommen und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C eingefroren. RNA-Isolierung und DNase-Behandlung wurde mittels des DirectZol RNA MiniPrep von Zymo Research nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die isolierte RNA bei Bedarf im Anschluss mit dem RNA Clean & Concentrator Kit von ZymoResearch ebenfalls nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.



### 2.7.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Bei der reversen Transkription wurden 250ng RNA mit dem SuperScript IV First-Strand Synthesis System von Thermo Fisher Scientific und 1µl Oligo-dT-Primer CD3RT [50µM] nach Protokoll des Herstellers zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben.

### 2.7.4 Amplifizierung von DNA mittels PCR und deren Aufreinigung

Primer für die Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden anhand der entsprechenden CDS-Vorhersage auf WormbaseParasite (Version WBPS9 (WS258), <https://parasite.wormbase.org>) designed und bei Sigma Aldrich (Sequenzen: siehe Abschnitt 2.5) bestellt. Für eine Amplifizierung mit der Taq-Polymerase wurden 20-50µl Ansätze bestehend aus 10% 10x Puffer, 2% Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), je 1% Primer forward/reverse [50µM] und Taq DNA Polymerase und 1µl Template verwendet. Das Standardprogramm im PCR-Cycler bestand aus einer anfänglichen Denaturierungsphase bei 95°C für eine Minute und darauf folgend 30 Zyklen Denaturierung bei 95° C für 30 Sekunden, Annealing bei primerabhängigen Temperaturen zwischen 59°C bis 62°C für 30 Sekunden und Elongation bei 68°C für eine Minute pro 1 kbp. Anschließend fand eine finale Elongation für fünf Minuten bei 68°C statt. Für Amplifizierungen mit Phusion oder KOD wurden die Angaben des Herstellers befolgt und die dazu mitgelieferten Reagenzien verwendet. Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up von Machery Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet und die Probe in 15µl warmen Wasser eluiert.

### 2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zur Größenbestimmung von amplifizierten DNA-Fragmenten, sowie Auftrennung verdauter Plasmide wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Für das Gel wurde Agarose 1:100 in 1x TAE-Puffer (40mM Tris, 1mM EDTA, 0,11% Eis-Essigsäure in 1l H<sub>2</sub>O, pH 8,0) gelöst und dann bei 55°C bis zur Verwendung gelagert. Zum Agarosegel wurde 0,04µl Midori Green pro ml Gel gegeben und in horizontale Schlitten mit Ladekammern gegossen. Das nach 20 Minuten erhärtete Gel wurde in Gelelektrophoresekammern gelegt und mit 1% TAE bedeckt. 10µl Probe wurde mit 6x Ladepuffer im Verhältnis 1:6 gemischt und hiervon 10µl zum Beladen der Kammer verwendet. Des Weiteren wurde 10µl eines DNA-Ladders mit einer Skala im Bereich der zu erwartenden Bande aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde 20-30 Minuten bei 120Volt durchgeführt und im Anschluss die Banden mittels UV-Licht einer

Geldokumentationsanlage visualisiert. Fragmente enzymatisch verdauter Plasmide wurden mittels Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aus diesen eine Gelextraktion mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (150) von Qiagen anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt.

### 2.7.6 Restriktionsverdau und Ligation von DNA Fragmenten in Plasmide

Für den Restriktionsverdau wurden Restriktionsenzyme von NEB nach Angaben des Herstellers verwendet. Enzyme wurden so gewählt, dass ein Doppelverdau möglich war. Die Probe wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert und bei Bedarf eine 20-minütige Hitzeinaktivierung durchgeführt.

Zur Klonierung in pGBKT7 und pGADT7 wurden Inserts und Plasmide aus dem Restriktionsverdau mit der T4 DNA Ligase (NEB) ligiert. Die für die Ligation benötigte Menge von Vektor und Insert bei einem Ansatz von 100ng Vektor und einem Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 wurde nach folgendem Schema berechnet:

$$x = \frac{\text{Anzahl bp Vektor}}{\text{Anzahl bp Insert}}$$

$$y = \frac{100\text{ng}}{x} \times 3 = \text{Insert [ng]}$$

$$\rightarrow \text{Vektor } [\mu\text{l}] = \frac{1}{c(\text{Vektor}) \left[ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} \times 100\text{ng}$$

$$\rightarrow \text{Insert } [\mu\text{l}] = \frac{1}{c(\text{Insert}) \left[ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} \times y \text{ [ng]}$$

10µl Ligationsansatz aus 1µl Ligase, 1µl Ligase-Puffer und berechneter Menge Insert und Vektor wurden 16 Stunden bei 16°C inkubiert.

Um etwa 70ng aufgereinigtes PCR-Produkt in pJET zu klonieren wurde das CloneJET PCR Cloning Kit von Thermo Scientific nach Anleitung des Herstellers verwendet.

### 2.7.7 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die Genexpression wurde mit der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) untersucht. Hierfür wurden Primer anhand der entsprechenden CDS-Vorhersage auf WormbaseParasite designed, bei Sigma Aldrich bestellt, mit ampuwa 50µM Stock-Lösungen hergestellt und in unterschiedlichen Konzentrationen (0,2, 0,3 und 0,4µM), bei verschiedenen Temperaturen (58°C, 60°C und 62°C) und Templates-Mengen (1,0µl und 1,5µl) getestet. Für nachfolgende Versuche wurden daraus resultierend Reaktionsansätze bestehend aus 2,0µl 5x Hot Start Fire, je 0,6µl Primer forward/reverse [5µM] und 1,0µl des jeweiligen Templates bei einem Gesamtvolumen

von 10µl verwendet. Als Primer wurden Paarungen mit einer Effizienz von 90-100% laut LinRegPCR (Ruijter et al. 2009) und einer hohen Spezifität, ausgedrückt durch einen Schmelzkurvenverlauf mit nur einem Peak in der StepOneSoftware, ausgewählt. Das qPCR-Programm setzte sich aus einer Erhitzungsphase auf 105°C, einer ersten Denaturierung für 15 Minuten bei 95°C und 40 Zyklen von 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Annealing bei primerspezifischer Temperatur und 20 Sekunden Elongation bei 72°C zusammen. Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen *emelp* mit den Primern *elp forward* und *elp reverse* mitgeführt (Brehm et al. 1999). Die Annealing-Temperatur betrug 60°C. Im Falle eines Gens ohne Intron wurde die RNA in einer ersten qPCR auf genomische Verunreinigungen überprüft. Es wurden stets technische Triplikate gemessen und nur Messreihen mit einer Standardabweichung der  $C_t$ -Werte (engl. für threshold cycle) unter 0,25 Zyklen und keiner relevanten Genamplifikation in den mitgeführten Negativkontrollen mit Wasser für die nachfolgende statistische Auswertung verwendet. Bei der Auswertung wurden die mittleren  $C_t$ -Werte der Triplikate  $C$  berechnet und mithilfe von LinRegPCR die mittlere Primereffizienz  $E$  bestimmt. Die Genexpression wurde als das Verhältnis von Kontrolle zu Intervention, normalisiert auf *emelp*, mit folgender Formel berechnet (Pfaffl 2001):

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{(C_{\text{Kontrolle}} - C_{\text{Intervention}})}}{E_{\text{emelp}}^{(C_{\text{Kontrolle}} - C_{\text{Intervention}})}}$$

Die Ergebnisse wurden auf ihre Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test überprüft.

## 2.8 Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 2.8.1 Bakterienstamm und Medium

Bakterienstamm	Herkunft	Genotyp
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
Medium	Herstellung	Erläuterung
Luria Broth (LB)-Medium	Invitrogen	
LB-Agar-Platten	LB + 15g/l Bacto-Agar	
Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)-Medium	20g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5g/l NaCl, 2,5ml 1M KCl dH2O ad 990ml pH 7,0 mit NaOH	Nach Autoklavieren wurden 10ml sterilfiltriertes 1M MgCl <sub>2</sub> und 20ml sterilfiltrierte 1M Glucose zugegeben.

### 2.8.2 Transformation und Genexpression in *E. coli*

Zur Transformation wurden 50µl kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen, gelagert bei -80°C, auf Eis aufgetaut und jeweils 1µl des zu transformierenden Plasmids zugegeben. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen einer Minute langen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und danach weitere zwei Minuten auf Eis gestellt. Es wurde 250µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien im Schüttler bei 37°C und 225 rounds per minute (rpm) für eine Stunde (pGADT7-Plasmide) bzw. zwei Stunden (pGBKT7-Plasmide) inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Antibiotika-enhaltenden Agarplatten ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Für eine Plasmid-isolierung wurde LB+Antibiotika-Flüssigmedium mit den Bakterien beimpft und unter konstantem Schütteln bei 175rpm und 37°C über Nacht bebrütet. Das verwendete Antibiotikum entsprach jeweils der plasmidcodierten Antibiotikaresistenz (pGADT7: Ampicillin 50µg/ml, pGBKT7: Kanamycin 30µg/ml).

### 2.8.3 Plasmidisolierung von *E. coli* und Plasmidsequenzierung

Zur Plasmidisolierung aus Übernachtskulturen wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Machery Nagel nach Anleitung des Herstellers verwendet. Plasmide wurden von der Gesellschaft für Analyse-Technik und Consulting" (GATC in Konstanz, Germany) sequenziert. Hierfür wurde der Firma ein 10µl-Ansatz aus 400ng Plasmid, 5µl Primer forward [5µM] und 5µl Primer reverse [5µM] zugesandt.

### 2.8.4 Kolonie-PCR

Die erfolgreiche Klonierung eines amplifizierten DNA Fragments in die multiple cloning site (MCS) von *E. coli* wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierfür wurden einzelne Klone von der Agarplatte gepickt, je nach Klongröße in 30µl bis 100µl sterilem Wasser resuspendiert und zehn Minuten auf dem Blotschüttler bei 200rpm und Raumtemperatur inkubiert. Als Ansatz für die Kolonie-PCR wurden 14,2µl ampuwa, 2µl 10x Puffer, 3µl Klonwasser und je 0,2µl dNTPs, plasmidspezifische Primer T7 [50µM], Primer AD bzw. BD up [50µM] und Taq Polymerase verwendet. Das PCR-Programm setzte sich aus zwei Minuten initialer Denaturierung bei 94°C, 30 Zyklen von Denaturierung bei 94°C über 30 Sekunden, Annealing bei 50°C über 30 Sekunden und Elongation bei 72°C mit einer Dauer von einer Minute pro kpb, sowie einer terminalen Elongation von zehn Minuten bei 72°C zusammen. Bei erfolgreicher Klonierung wurden die entsprechenden Suspensionen für eine Übernachtskultur verwendet, sowie zur Klonsicherung auf Agarplatten ausgestrichen.

## 2.9 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.9.1 Hefestamm und Medium

Hefestamm	Herkunft	Genotyp
AH109	Clontech	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> -GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3, GAL2 <sub>UAS</sub> -GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ
Medium	Herstellung	Erläuterung
yeast peptone dextrose adenine (YPDA) -Medium	20 g/l Bacto-Pepton 10 g/l Hefeextrakt dH2O ad 950ml pH 5,8 mit HCl	Nach Autoklavieren wurden 50ml 40% sterilfiltrierte Glucose und 15ml sterilfiltriertes 0,2% Adenin-Hemisulfat zugegeben.
synthetic dropout – Medium (SD)	6,7 g/l Yeast Nitrogen Base without Amino Acids 20 g/l Bacto-Agar x g/l entsprechendes Drop out Supplement (DOS) dH2O ad 950ml pH 5,8 mit NaOH	Nach Autoklavieren wurden 50ml 40% sterilfiltrierte Glucose zugegeben.
SD -Leu/-Trp	+ 0,64 g/l -Leu/-Trp DOS	Nach Autoklavieren wurden 15ml 0,2% Adenin-Hemisulfat zugegeben.
SD -Leu/-Trp/-His	+ 0,6 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DOS	
SD -Leu/-Trp/-His/ -Ade	+ 0,6 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DOS	Nach Autoklavieren wurden 15ml 0,2% Adenin-Hemisulfat und sterilfiltrierte Glucose mit 3-AT der gewünschten Konzentration zugegeben.
SD -Leu/-Trp/-His + 3-AT [1mM, 3mM, 7,5mM, 15mM, 25mM]	+ 0,6 g/l -Ade/-His/-Leu/-Trp DOS	

### 2.9.2 Yeast-two-Hybrid

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Yeast-two-Hybrid (Y2H) wurde das Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid-System 3 von Clontech verwendet. Hierzu wurde YPDA-Medium mit Klonen vom Hefestamm AH109 beimpft und 16-18h bei 250rpm und 30°C im Schüttler inkubiert. Die Hefesuspension wurde fünf Minuten bei 700g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in One-Step-Puffer (40% PEG 3350, 0,2M Lithiumacetat und 0,1M 1,4-Dithiothreitol) aufgenommen und in je 100µl aliquotiert. Hierzu wurden für die Kointransformation 1µg pGADT7-Fusionsprodukts des einen und 1µg pGBKT7-Fusionsprodukts des anderen zu testenden Interaktionspartners gegeben.

Als Positivkontrolle wurde t-Antigen-pGADT7 und p53-pGBKT7 und als Negativkontrolle t-pGADT7 und lamC-pGBKT7, sowie eine Kombination des entsprechenden Interaktionspartner-Fusionsprodukts und des komplementären leeren Vektors pGADT7 bzw. pGBKT7 mitgeführt. Die Suspensionen wurden gevortext und 30 Minuten bei 45°C inkubiert. Je 35µl wurden auf SD-Leu-Trp-Platten ausplattiert und drei Tage bei 30°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation – sichtbar durch Wachstum der Hefen auf den SD-Leu-Trp-Platten - wurden drei Klone in je 100µl PBS eingegeben und für zehn Minuten auf den Blotschüttler bei 200rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 10µl des Klonwassers wurden auf SD-Leu-Trp, SD-Leu-Trp-His und SD-Leu-Trp-His-Ade getropft und drei Tage bei 30°C bebrütet. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse aufgrund Autoaktivierung der pGBKT7-Plasmide wurden die Interaktionsstudien bei Bedarf zusätzlich auf SD-Leu-Trp-His-Platten mit 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) verschiedener Konzentrationen (1mM, 3mM, 7,5mM, 15mM und 25mM) durchgeführt. Hierbei wurde die Inkubationszeit auf eine Woche verlängert. Zur besseren Diskrimination wurden fraglich positive Befunde zusätzlich ausplattiert. Wachstum auf SD-Leu-Trp-His-Platten wurde als schwache Interaktion, Wachstum auf SD-Leu-Trp-His-Platten mit 7,5mM 3-AT als mittelstarke Interaktion und Wachstum auf SD-Leu-Trp-His-Ade-Platten als starke Interaktion gewertet. Jede Kotransformation wurde in einer separaten Versuchsreihe wiederholt.

## 2.10 Arbeiten mit *E. multilocularis*

### 2.10.1 Isolate und Medium

<b>Isolat</b>	<b>Verwendung</b>
GH09	RNAi
H95	Inhibitor, RNAi
Ingrid	WMISH
J2012	WMISH, Inhibitor
RD15	Inhibitor
Suma	Inhibitor

<b>Medium</b>	<b>Erläuterung</b>
A7-Medium	50ml Kulturmedium vor Verwendung für 7 Tage mit 10 <sup>6</sup> RH- Zellen inkubiert und sterilfiltriert
A7/B4-Medium	Zu gleichen Teilen A7- und B4-Medium
B4-Medium	50ml Kulturmedium vor Verwendung für 4 Tage mit 10 <sup>7</sup> RH- Zellen inkubiert und sterilfiltriert
Undefiniertes, konditioniertes Medium (CMEM)	sterilfiltrierter Überstand von RH- Zellen
Kulturmedium	DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin, G/Streptomycin

### **2.10.2 *In vivo* Kultivierung und Isolierung von Parasitenmaterial**

Die wiederholte intraperitoneale Passage in Labortieren ist zum langfristigen Erhalt des Parasitenmaterials unverzichtbar. Hierfür wurde stark zerkleinertes Larvenmaterial drei Monate alten Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) ins Peritoneum injiziert. Nach zwei bis drei Monaten wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet, mit 70% Ethanol gründlich gewaschen und das Parasitenmaterial unter sterilen Bedingungen entnommen (Spiliotis und Brehm 2009). Zur Reinfektion wurde das Material über Nacht bei 4°C mit Levofloxacin (4µl/ml) und Penicillin G/Streptomycin (10µl/ml) inkubiert und am nächsten Tag nach mehrmaligem Waschen mit PBS zur Herstellung von Spritzen für die Reinfektion (0,3-0,5ml/Tier) der Labortiere verwendet. Für eine neue *in vitro* Kultur wurde 1ml Material in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 50ml DMEM und 10<sup>6</sup> Fütterzellen überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.10.3 Kultivierung von Fütterzellen und *in vitro* Metacestodenkultivierung**

Für die langfristige *in vitro* Kultivierung von Metacestoden ist die Kokultivierung mit Fütterzellen unverzichtbar. Hierfür wurden Rat Reuber Zellen (RH- Zellen; ATCC No.: CRL-1600) verwendet. Diese wurden in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 50ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Jede Woche wurden die Zellen trypsinisiert, in einer Neubauer Kammer gezählt und 10<sup>6</sup> Zellen in neuem Kulturmedium angesetzt (Spiliotis und Brehm 2009).

Die Metacestodenvesikel wurden in 75cm<sup>2</sup> und 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 60ml/150ml Kulturmedium und 10<sup>6</sup>/2\*10<sup>6</sup> RH- Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kokultiviert. Medium und Fütterzellen wurden wöchentlich ausgetauscht, abgestorbene Vesikel entfernt und regelmäßig ein Screening auf Mycoplasmen durchgeführt. Bei starkem Wachstum der Vesikel wurden sie auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt oder in größere Zellkulturflaschen überführt.

### **2.10.4 Axenische Kultivierung**

Die Untersuchung zelltypspezifischer Reaktionen auf veränderte Umgebungsbedingungen ist in einer Kokultivierung aufgrund möglicher Nebeneffekte auf Fütterzellen nur unzureichend möglich. Von daher wurde eine axenische, also fütterzellfreie, Kultivierungsmethode etabliert (Spiliotis und Brehm 2009). Um solche axenischen Bedingungen zu schaffen wurde das Medium abgesaugt, die Vesikel zweimal mit PBS gewaschen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Kaputte Vesikel wurden entfernt und die übrigen Vesikel abermals mehrfach mit PBS gewaschen. Zur Entfernung der RH- Zellen wurde für drei Minuten ampuwa dazugegeben und erneut

mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 100ml CMEM, sowie je 1µl L-Cystein, Bathocuproindisulfonsäure und β-Mercaptoethanol hinzugegeben und die Vesikel im Inkubator bei 37°C und nitrogener Atmosphäre bebrütet. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Medium gewechselt oder die Vesikel für Versuche verwendet. Zur Herstellung einer axenischen Kultur von Vesikeln jünger als drei Monate wurde der Inhalt der Zellkulturflasche in ein 50ml EasyStrainer gegeben und mit Saccharose auf eine Endkonzentration von 2-4% versetzt, sodass die oben schwimmenden intakten Vesikel gut von restlichen Bestandteilen getrennt werden konnten. Diese wurden mit Hilfe einer 20ml Pipette in ein neues EasyStrainer mit PBS gegeben, zweimal mit PBS gewaschen und dann wie oben beschrieben mit reduzierenden Reagenzien, CMEM und Stickstoff in einer Zellkulturflasche bei 37°C bebrütet.

#### **2.10.5 Kennzeichnung proliferierender Zellen mit EdU und EdU-Detektion**

Zur Kennzeichnung proliferierender Zellen in Metacestoden wurden entsprechende Vesikel mit 50µM 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) für fünf Stunden bei 37° bebrütet. Im Anschluss wurden die Vesikel mit PBS gewaschen und vorsichtig geöffnet, um die Hydratinflüssigkeit zu entlassen. Für eine Whole Mount *in Situ* Hybridisierung (WMISH) wurden die Vesikel dann in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, für eine EdU-Detektion mit 100% Ethanol versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die EdU-Detektion wurde mit dem Click-it EDU Alexa Fluor 555 Imaging Kit nach Anleitung des Herstellers und dem Protokoll von U.Koziol (Koziol 2014) durchgeführt. Bei einer EdU-Detektion nach WMISH wurde dabei die anfängliche Rehydrierung mit konsekutivem dreimaligem Waschen in PBS übersprungen.

#### **2.10.6 Whole Mount *In Situ* Hybridisierung**

Digoxigenin-gelabelte Sonden wurden über *in vitro* Transkription mit dem DIG RNA Labelling Mix (Roche) und einer T7-Polymerase nach Anleitung von U.Koziol (Koziol et al. 2014) hergestellt und die WMISH nach Anleitung von U. Koziol (Koziol et al. 2014) durchgeführt. Hierbei wurde ein Anti-DIG-Peroxidase-Konjugat und Fluorescein-Tyramid für die Fluoreszenzreaktion verwendet. Ausführliche Protokolle zur Herstellung der Sonden, verwendeten Substanzen und WMISH-Durchführung sind im Anhang der Dissertation von U. Koziol einsichtig (Koziol 2014).

#### **2.10.7 Konfokalmikroskopie**

Vesikel der WMISH oder Edu-Detektion wurden auf Deckgläser präpariert und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Hierzu wurden von jedem Vesikel nicht überlappende Mikroskopausschnitte fotografiert und zur Quantifizierung der EdU-markierten Zellen



und Zellen mit spezifischer Genexpression die jeweils signalpositiven Zellen mit Hilfe von ImageJ/FIJI (Schindelin et al. 2012) manuell gezählt und Kollokalisierungen detektiert. Durchgeführte Kontrollexperimente mit Sense-Proben waren stets negativ.

### **2.10.8 Isolierung und *in vitro* Kultivation von Primärzellen**

Der Begriff Primärzellen bezeichnet eine aus Metacestoden mittels spezieller Verfahren extrahierte Zellpopulation mit einem überproportional hohen Anteil an Stammzellen (Koziol et al. 2014; Spiliotis und Brehm 2009). Zur Isolation von Primärzellen für Inhibitorversuche wurden mindestens drei Monate lang kokultivierte Metacestodenvesikel für drei Tage axenisiert. Anschließend wurden die Vesikel mehrmals in PBS gewaschen, nicht mehr intakte Vesikel entfernt und zweimal für zwei Minuten mit ampuwa inkubiert. Primärzellen für RNA-Interferenz (RNAi)-Studien aus mindestens fünf Monate langer Kokultur wurden statt einer Axenisierung einer mehrmaligen Waschung und Inkubation mit ampuwa unterzogen. Die gewaschenen Vesikel wurden in einem Becherglas mit einer 10ml Pipette zerteilt und in ein 50ml EasyStrainer überführt. Um die Hydratinflüssigkeit zu entfernen wurde PBS dazugegeben, acht Minuten bei 800g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit Hilfe einer Pipette gelöst, mehrmals erneut PBS hinzugegeben und je sechs Minuten bei 600g zentrifugiert. Danach wurde das sechsfache Volumen Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben, das Pellet durch vorsichtiges Schwenken gelöst und bei 37°C unter weiterem regelmäßigem Schwenken für 30 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde durch eine Polyester Gaze mit einer Porengröße von 30µm filtriert und der Durchfluss in einem Glasbecher aufgefangen. Zurückbleibende Zellbestandteile wurden zurück ins EasyStrainer pipettiert, mit PBS auf ein Volumen von 10 bis 20ml aufgefüllt, heftig geschüttelt und abermals durch die Gaze filtriert. Dieser Schritt wurde wiederholt bis die Flüssigkeit klar blieb. Der Durchfluss wurde in ein 50ml EasyStrainer gefüllt und eine Minute bei 80g zentrifugiert bzw. bei Isolation für RNAi-Studien drei Minuten bei 50g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Schritt so lange wiederholt bis keine Kalziumkörperchen mehr im Bodensatz zurückblieben. Der Überstand wurde bei beiden Verfahren in ein neues EasyStrainer gefüllt und die Primärzellen darin für zehn Minuten bei 600g mittels Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet in 500µl PBS resuspendiert. Die Suspension wurde durch ein 40µl-Sieb gegeben, um große Zellaggregate zu verhindern und die optische Dichte im Spektrophotometer bei 600nm ( $OD_{600}$ ) gemessen. Hierzu wurden 10µl der Zellsuspension (bzw. bei  $OD_{600} > 0,3$  eine

1:3 Verdünnung der Zellsuspension in PBS) zu 990µl PBS gegeben. Die für die Zellversuche einzusetzenden Units wurden wie folgt definiert:

$$\text{OD}(600) 0,02 = \frac{1\text{unit}}{\mu\text{l}}$$

### 2.10.9 Inhibitorstudien an Primärzellen und Metacestoden

Der Einfluss von Kinaseinhibitoren auf *E. multilocularis* wurde im Rahmen von verschiedenen Studien an Primärzellen und Metacestoden untersucht. Für Versuche mit dem ERK-Inhibitors FR180204 (Ohuri et al. 2005) wurde eine 0,03M Stock-Lösung und davon ausgehend weitere Verdünnungen mit DMSO hergestellt, sodass für verschiedene finale Endkonzentrationen des Inhibitors im Kulturmedium je 4µl Inhibitorlösung/ml Medium zugegeben werden mussten. Bei dem Multikinaseinhibitor Dasatinib (Das et al. 2006) waren es 1µl Inhibitorlösung/ml Medium. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO in äquivalenter Menge verwendet. Für alle Inhibitor-Versuche wurde Parasitenmaterial aus der Kokultivation vor Versuchsbeginn axenisiert, stets in nitrogener Atmosphäre bei 37°C inkubiert und dreimal wöchentlich die Hälfte des Mediums inklusive darin gelöster Substanzen gewechselt. Die Versuche wurden als Triplikate durchgeführt.

Zur Analyse der Auswirkung dieser Inhibitoren auf Primärzellen wurde das kurzfristige Überleben der Zellen mehrmals mittels Resazurinassay analysiert. Hierzu wurden 10units/well Primärzellen der Isolate J2012 und H95 auf einer 96-well-Platte mit 100µl A7-Medium und Inhibitor/DMSO versetzt. Als Positivkontrolle wurde 1% Triton, zur Normalisierung der Messergebnisse reines A7-Medium ohne Zellen mitgeführt. Das Medium wurde während des Versuchs nicht gewechselt. Für den Assay wurde in jedes Well 100µl Resazurin-Lösung (0,02mg/ml), ein nicht zelltoxischer redoxsensitiver Farbstoff, gegeben und die Platte weitere drei Stunden bebrütet. Durch Messung der Fluoreszenz bei 540nm (Referenz 595nm) im Microplate Readers konnte die Vitalität der Zellen analysiert werden. Für die statistische Auswertung wurden die technischen Replikate gemittelt und eine Basislinienkorrektur anhand Medium-Fluoreszenz durchgeführt. Diese korrigierten Mittelwerte wurden auf Signifikanz mittels ANOVA one way bei GraphPadPrism überprüft.

Zur Erfassung von langfristigen Auswirkungen des Inhibitors FR180204 auf Primärzellen wurden zusätzlich in 24-well-Platten je 100units/well Primärzellen mit 1ml Medium und FR180204 bzw. DMSO versetzt und die Entwicklung der Primärzellen mikroskopisch beobachtet und photographisch festgehalten.

Für Inhibitorstudien von Dasatinib an Metacestoden wurden je fünf Vesikel in ein Well einer 12-well-Platte mit 2ml A7 Medium und Inhibitor/DMSO inkubiert und ihre Entwicklung lichtmikroskopisch beurteilt. Um die Auswirkungen des Inhibitors FR180204 auf Metacestodenvesikel zu beobachten wurden unter drei Monate in Ko-Kultur befindliche Vesikel mit dem Inhibitor inkubiert, ihre Entwicklung lichtmikroskopisch beurteilt und der Anteil von Stammzellen untersucht. Hierfür wurden je vier Vesikel/well in eine 24-well-Platte mit 500µl A7 Medium transferiert und Inhibitor/DMSO, sowie je 0,5µl L-Cystein, Bathocuproindisulfonsäure und  $\beta$ -Mercaptoethanol pro well hinzugefügt. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums mit reduzierenden Reagenzien und Inhibitor/DMSO gewechselt und die Entwicklung mit der Mikroskopkamera dokumentiert. Nach neun Tagen wurden proliferierende Zellen mit EdU markiert und ihr Anteil konfokalmikroskopisch analysiert (siehe 2.10.5 und 2.10.7).

#### **2.10.10 RNAi-Studien an Primärzellen**

RNAi-Studien wurden an Primärzellen durchgeführt, um spezifische Funktionen bestimmter Gene in *E. multilocularis* zu untersuchen. Als Medium wurde anfangs A7-, später A7/B4-Medium verwendet. 500units/well isolierter Primärzellen wurden in 6-well-Platten mit Medium über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mittels einer 10ml Pipette mehrfach resuspendiert, je 1000 units Zellen mit 5ml Medium zusammengelegt und für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die nun geformten Aggregate wurden mit einer 10ml Pipette in ein 50ml Falcon-Tube überführt und für zwei Minuten bei 80g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Medium mit Endkonzentration 1unit/µl resuspendiert und je nach benötigter Zellzahl 400-600µl der Suspension in 2ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Das gleiche Volumen an PBS wurde zugefügt und für eine Minute bei 100g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500µl PBS und 500µl Elektroporationspuffer (EB, Herstellung im Addendum zu (Spiliotis et al. 2010)) aufgenommen, wieder eine Minute bei 100g zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. (Dieser Schritt wurde im Verlauf aus dem Protokoll entfernt). Pro 100units wurden 1µl entsprechender small interfering RNA (siRNA) [100µM] zu 176µl EB gegeben und damit das Pellet resuspendiert. Für die Reagenzienkontrolle wurde anfangs PBS, später ampuwa verwendet, sowie eine Kontrolle mit GFP-siRNA (0,5µl siRNA in 176,5µl EB) mitgeführt (Spiliotis et al. 2010). Pro Elektroporation wurden 90µl (mit 50units Zellen) in 1mm Küvette gegeben und für 0,6msec bei 200V elektroporiert,

mittels Plastikpasteurpipette in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht länger als 30 Minuten im EB verweilten. Im Anschluss wurden die Aggregate eine Minute bei 100g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 600µl Medium resuspendiert und je 300µl in 24-well-Platten mit Stickstoff bei 37°C inkubiert. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und die Entwicklung der Zellen lichtmikroskopisch beobachtet und fotografisch festgehalten. Alle Versuche wurden als Quadruplikate angesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde aus den Primärzellen je eines Wells RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und der Gen-Knockdown mittels qPCR nachgewiesen. Nach zwei, drei und vier Wochen wurden Fotos jedes gesamten Wells gemacht und auf den Fotoaufnahmen der Durchmesser der jeweils fünf größten sichtbaren Vesikel manuell gemessen. Einzelne Outlier mit einem Größenunterschied zum Mittelwert der Gruppe von über 2,5 Standardabweichungen wurden aus der Analyse genommen, um Normalverteilung zu erreichen. Unterschiede in der Vesikelgröße wurden mittels one-way ANOVA auf ihre Signifikanz überprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bioinformatische Analyse von MAPK-Komponenten

##### 3.1.1 Übersicht über mutmaßliche MAPK-Komponenten in *E. multilocularis*

Bis dato sind nur wenige MAPK-Komponenten in *E. multilocularis* beschrieben. Hierzu zählen die MAP3K EmRaf (Spiliotis et al. 2005), die MAP2K EmMKK1 und EmMKK2 (Gelmedin et al. 2010) und die MAPK EmMPK1 (Spiliotis et al. 2006) und EmMPK2 (Gelmedin et al. 2008). Um weitere potenzielle Komponenten von MAPK-Signalwegen in *E. multilocularis* zu identifizieren wurde zunächst mittels BLAST und reziproker BLAST-Analysen von bereits bekannten *Echinococcus*-MAPK-Komponenten und MAPK-Komponenten verschiedener Organismen nach MAP3K, MAP2K und MAPK kodierenden Genen im Genom von *E. multilocularis* gesucht (siehe Methoden 2.6 und Anhang 9.2). Die vollständigen AS-Sequenzen und die Sequenzen der Kinasedomänen wurden im Anschluss Sequenzvergleichen, phylogenetischen Analysen und Expressionsanalysen unterzogen. So konnten mit zehn weiteren potenziellen MAP3K, drei weiteren potenziellen MAP2K und vier weitere potenzieller MAPK diverse Gene gefunden werden, die mutmaßlich Proteinkinasen aller drei Kaskadeebenen in MAPK-Signalwegen kodieren (siehe Tabelle 1).

Proteinbez.	Gennummer	Publikation	Klassifikation
<b>MAP3K</b>			
EmMKKK1	EmuJ_000389600		
EmMKKK2	EmuJ_000341400		
EmMKKK3	EmuJ_000436900		
EmMKKK4	EmuJ_000469200		
EmMKKK5	EmuJ_000623200		
EmMKKK6	EmuJ_000679000		
EmMKKK7	EmuJ_000679500		
EmMKKK8	EmuJ_000918100		
EmMKKK9	EmuJ_001201700		
EmMKKK10	EmuJ_001202000		
EmRaf	EmuJ_001079900	(Spiliotis et al. 2005)	
<b>MAP2K</b>			
EmMKK1	EmuJ_000121500	(Gelmedin et al. 2010)	
EmMKK2	EmuJ_000514400	(Gelmedin et al. 2010)	
EmMKK3	EmuJ_000123600		
EmMKK4	EmuJ_000221400		
EmMKK5	EmuJ_001114500		

Proteinbez.	Gennummer	Publikation	Klassifikation
<b>MAPK</b>			
EmMPK1	EmuJ_000803700	(Spiliotis et al. 2006)	ERK
EmMPK2	EmuJ_000144900	(Gelmedin et al. 2008)	p38
EmMPK3	EmuJ_000174000		JNK
EmMPK4	EmuJ_000891000		ERK
EmMPK5	EmuJ_000676200		
EmSSY	EmuJ_000139200		

Tabelle 1 Übersicht über mutmaßliche MAPK-Komponenten in *E. multilocularis* mit Proteinbezeichnung in vorliegender Arbeit, Gennummern und ggf. Publikationsort und Klassifikation.

### 3.1.2 Mutmaßliche MAP3K in *E. multilocularis*

Vergleiche zwischen den Kinasedomänen der verschiedenen MAP3K von *E. multilocularis* untereinander zeigen eine hohe Übereinstimmung der AS-Sequenzen (siehe Abbildung 5).

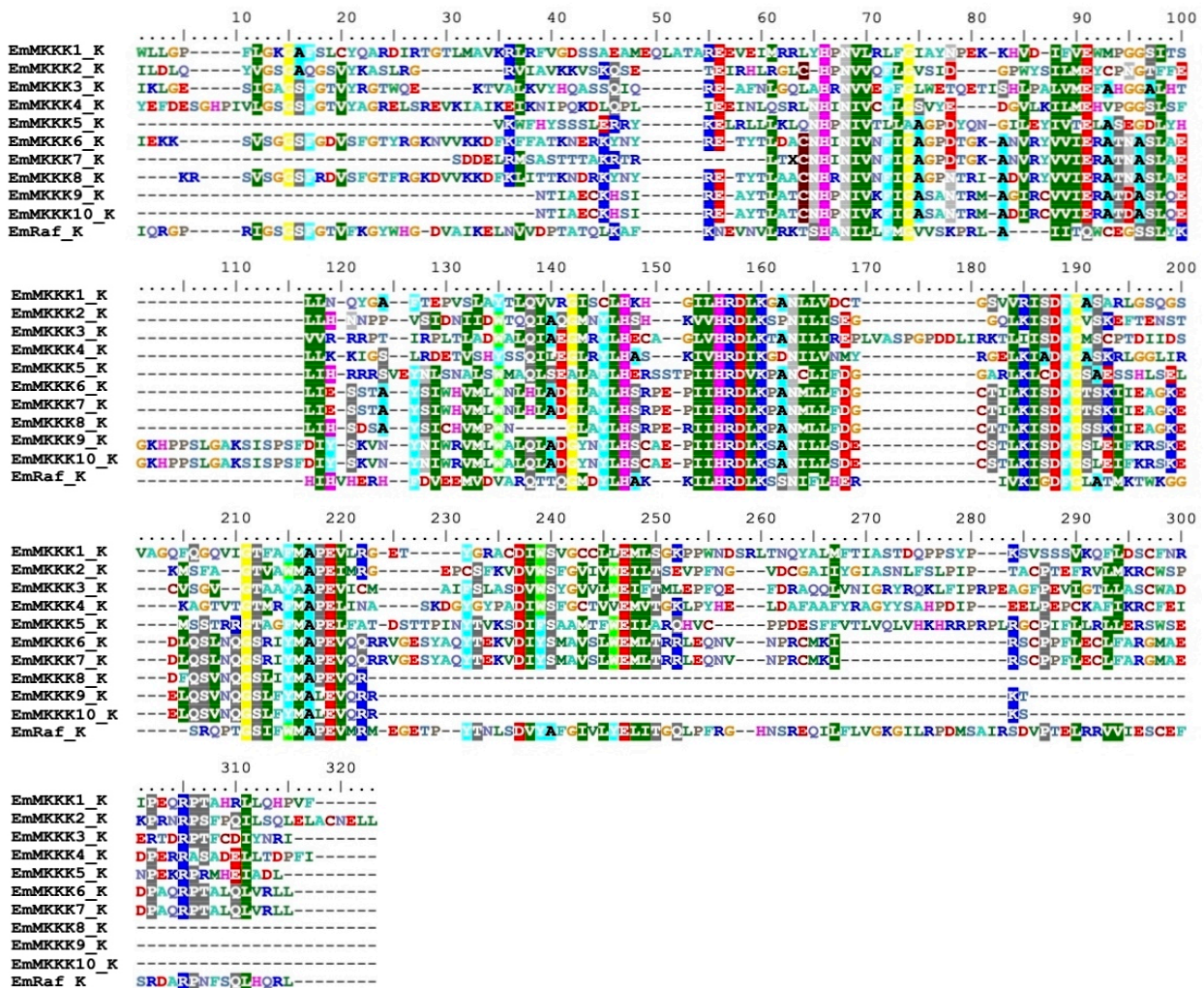


Abbildung 5 Sequenzvergleich der MAP3K-Kinasedomänen von MAP3K von *E. multilocularis*. Das Alignment der entsprechenden Sequenzen wurde mittels MUSCLE (Edgar 2004a; Edgar 2004b) erstellt.

Vergleiche der gesamten MAP3K-Proteinsequenz, sowie der Kinasedomänen mit MAP3K anderer Organismen zeigen Übereinstimmungen von 32% bis 63%, insbesondere im Bereich der Domäne (siehe Tabelle 2). Die sechs *Echinococcus*-MAP3K EmM3K5-10 zeigen hierbei höchste Homologien zu der humanen M3K7. Die Proteinkinase EmM3K1 besitzt 51% identische AS-Stellen mit der HsM3K1 und scheint als vollständiges Protein von allen MAP3K daher am stärksten evolutionär konserviert zu sein.

Bezeichn.	First Hit Human			First Hit		
	Accession	Bezeichn.	Hom.	Accession	Bezeichn.	Hom.
<b>A: Kinasedomäne</b>						
EmM3K1	Q13233.4	HsM3K1	52%	Q13233.4	HsM3K1	52%
EmM3K2	Q12852.2	HsM3K12	56%	Q12852.2	HsM3K12	56%
EmM3K3	Q16584.1	HsM3K11	38%	Q16584.1	<u>HsM3K11</u>	38%
EmM3K4	Q99683.1	<u>HsM3K5</u>	56%	Q99683.1	<u>HsM3K5</u>	56%
EmM3K5	O43318.1	HsM3K7	36%	Q9V3Q6.1	<u>DmM3K7</u>	36%
EmM3K6	O43318.1	HsM3K7	35%	Q62073.1	MmM3K7	35%
EmM3K7	O43318.1	HsM3K7	35%	Q5RFL3.1	<u>PaM3K7</u>	35%
EmM3K8	O43318.1	HsM3K7	35%	A2VDU3.1	<u>BtM3K7</u>	39%
EmM3K9	O43318.1	HsM3K7	36%	P83104.1	<u>DmM3K7L</u>	32%
EmM3K10	O43318.1	HsM3K7	36%	Q9V3Q6.1	<u>DmM3K7</u>	32%
EmRaf *	P15056.4	HsBRAF	63%	P10533.1	<u>ArRMIL</u>	63%
<b>B: vollständige Proteinsequenz</b>						
EmM3K1	Q13233.4	HsM3K1	51%	Q13233.4	HsM3K1	51%
EmM3K2	Q12852.2	HsM3K12	49%	Q12852.2	HsM3K12	49%
EmM3K3	Q16584.1	HsM3K11	34%	Q7T2V3.1	<u>XIM3K10</u>	35%
EmM3K4	Q6ZN16.2	<u>HsM3K15</u>	35%	Q6ZN16.2	<u>HsM3K15</u>	35%
EmM3K5	O43318.1	HsM3K7	35%	Q9V3Q6.1	<u>DmM3K7</u>	36%
EmM3K6	O43318.1	HsM3K7	35%	Q62073.1	MmM3K7	35%
EmM3K7	O43318.1	HsM3K7	36%	A2VDU3.1	<u>BtM3K7</u>	36%
EmM3K8	O43318.1	HsM3K7	39%	Q62073.1	<u>MmM3K7</u>	39%
EmM3K9	O43318.1	HsM3K7	36%	P83104.1	<u>DmM3K7L</u>	32%
EmM3K10	O43318.1	HsM3K7	36%	Q9V3Q6.1	<u>DmM3K7</u>	32%
EmRaf *	P15056.4	HsBRAF	42%	P15056.4	<u>HsBRAF</u>	42%

Tabelle 2 Übersicht über potenzielle MAP3K von *E. multilocularis* mit homologen Proteinen bzw. Kinasedomänen anderer Organismen. A: BLAST-Analysen der Kinasedomäne, B: BLAST-Analyse der vollständigen Proteinsequenz. Homologe Proteine wurden über reziproke BLAST gefunden. Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Proteinnamen von *E. multilocularis*, sowie der erste menschliche und der erste organismusunabhängige Treffer in der Swiss-Prot Datenbank bei NCBI. \*(Spiliotis et al. 2005). Ar: Avian retrovirus, Hom: Homologien. Bt: *Bos taurus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Pa: *Pongo abelii*, Xi: *Xenopus laevis*. Mit Unterstrich gekennzeichnet sind sich bei Kinasedomäne und gesamten Protein unterscheidene First Hits.

Zur weiteren Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse der *Echinococcus*-MAP3K untereinander und zu MAP3K anderer Organismen (siehe 9.3) wurden die entsprechenden vollständigen Proteinsequenzen und Sequenzen der Kinasedomänen phylogenetischer Analysen mittels Neighbour-Joining-Methode (Saitou und Nei 1987) bei MEGA7 (Kumar et al. 2016; Kumar et al. 1994) unterzogen (siehe Abbildung 6). Hierbei wird noch einmal deutlich, dass *E. multilocularis* hoch konservierte Proteinkinasen wie EmMKK1 oder EMMKK4 besitzt, deren Homologien zu entsprechenden Proteinkinasen anderer Organismen höher sind als zu anderen *Echinococcus*-MAP3K. Dem entgegen stellen sich die MAP3K7-ähnlichen MAP3K EmMKKK6-10, die in der Analyse eine eigene Gruppe darstellen und größere phylogenetische Distanz zu Proteinkinasen anderer Organismen aufweisen.

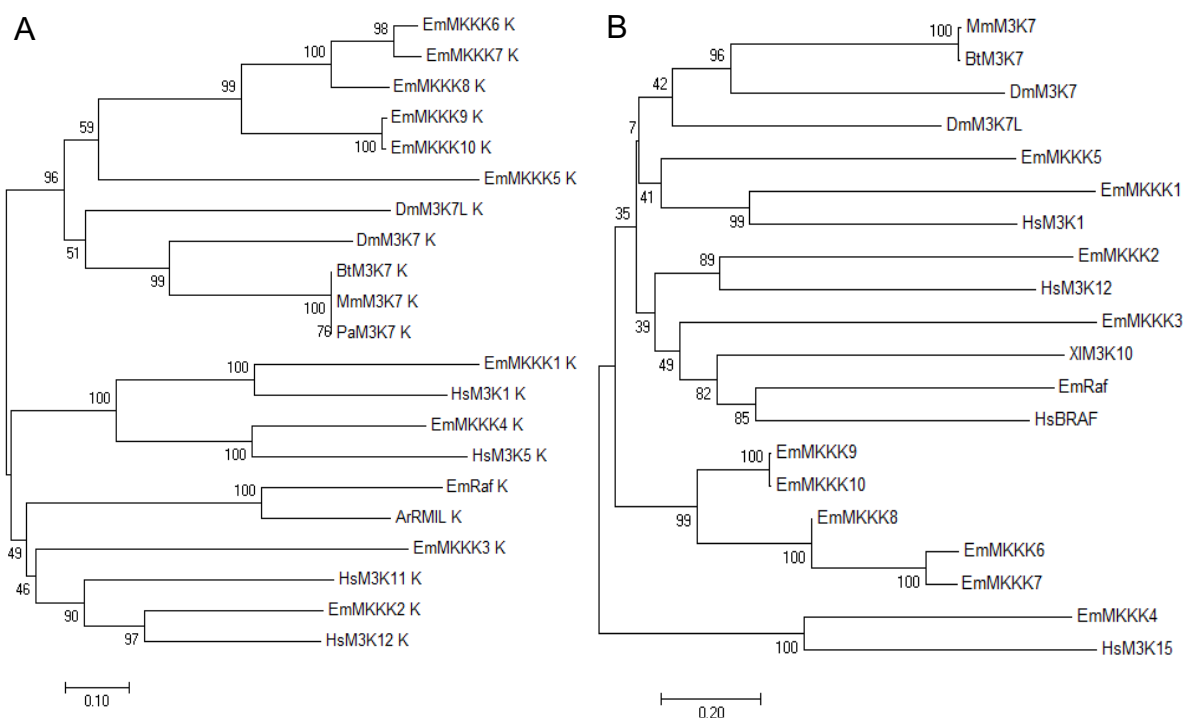


Abbildung 6 **Phylogenetische Analyse von MAP3K**: A: der Kinasedomänen, B: vollständige Proteinsequenzen. AS-Sequenzen von *E. multilocularis* MAP3K und entsprechender First Hits in der Swissprot Datenbank bei NCBI wurden mit Hilfe von MUSCLE (Edgar 2004a; Edgar 2004b) alignet und damit phylogenetische Analysen mittels Neighbour-Joining-Methode (Saitou und Nei 1987) bei MEGA7 (Kumar et al. 2016; Kumar et al. 1994) erstellt. Die Astlängen zeigen die evolutionäre Distanz an, die Nummern repräsentieren die Bootstrap-Werte. Ar: *Avion retrovirus*, Bt: *Bos taurus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Pa: *Pongo abelii* XI: *Xenopus laevis*



Domänenanalysen mit SMART (Letunic et al. 2015; Schultz et al. 1998) zeigen, dass alle MAP3K eine Serin/Threonin-Kinasedomäne besitzen (siehe Abbildung 7). Hierbei fällt auf, dass alle Sequenzen der MAP3K7-ähnlichen MAP3K in *E. multilocularis* unter 502 Aminosäuren besitzen und teilweise nur aus einer einzelnen Kinasedomäne bestehen, wohingegen *emmkk1*, *emmkk3* und *emmkk4* für Proteine mit über 1400 Aminosäuren kodieren.

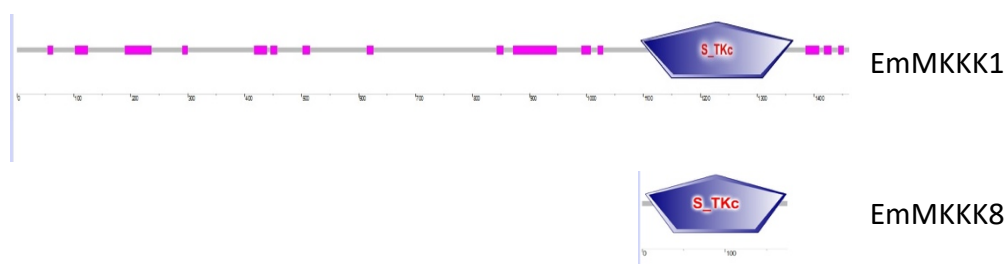


Abbildung 7 **Domänen von EmMKKK1 und EmMKKK8** Domänenanalysen wurden mit SMART (Letunic et al. 2015; Schultz et al. 1998) durchgeführt und zeigen das Vorhandensein von Serin/Threonin-Kinasedomänen.

Genexpressionsanalysen zeigen, dass neun der im *Echinococcus*-Genom kodierten MAP3K sowohl im Metacestoden-, als auch im Protoscolex-Larvenstadium exprimiert werden (siehe Abbildung 8).

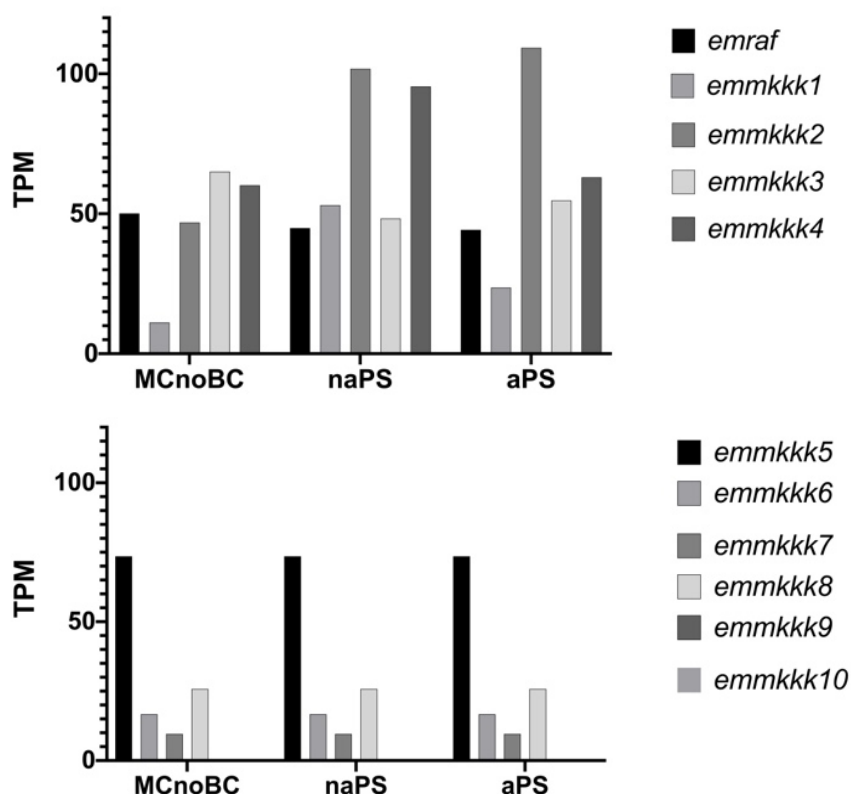
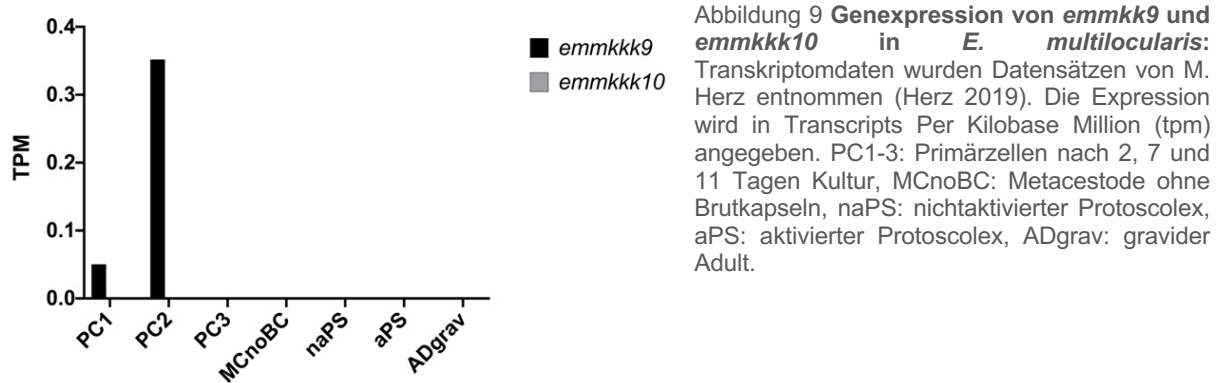


Abbildung 8 **Genexpression von MAP3K in *E. multilocularis***: Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird in Transcripts Per Kilobase Million (tpm) angegeben. MCnoBC: Metacestode ohne Brutkapseln, naPS: nichtaktivierter Protoscolex, aPS: aktivierter Protoscolex

Da in diesen Stadien keine Expression von *emmkkk9* und *emmkkk10* detektiert werden konnte, wurde zur abschließenden Beurteilung ihrer Expression eine differenziertere Transkriptomanalyse verschiedener Zellpopulationen vorgenommen (siehe Abbildung 9). Auch hier wird keine Expression von *emmkkk10* quantifizierbar und es zeigt sich eine ausgesprochen geringe Expression von *emmkkk9* (Herz 2019).



Des Weiteren proklamieren Transkriptomanalysen eine vermehrte Expression der MAP3K *emmkkk1* in Stammzellen und Progeny, da eine Behandlung von Metacestoden mit HU zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression um 54% und eine Behandlung von Metacestoden mit Bi2536 zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression um 23% führt (siehe Abbildung 10) (Herz 2019).

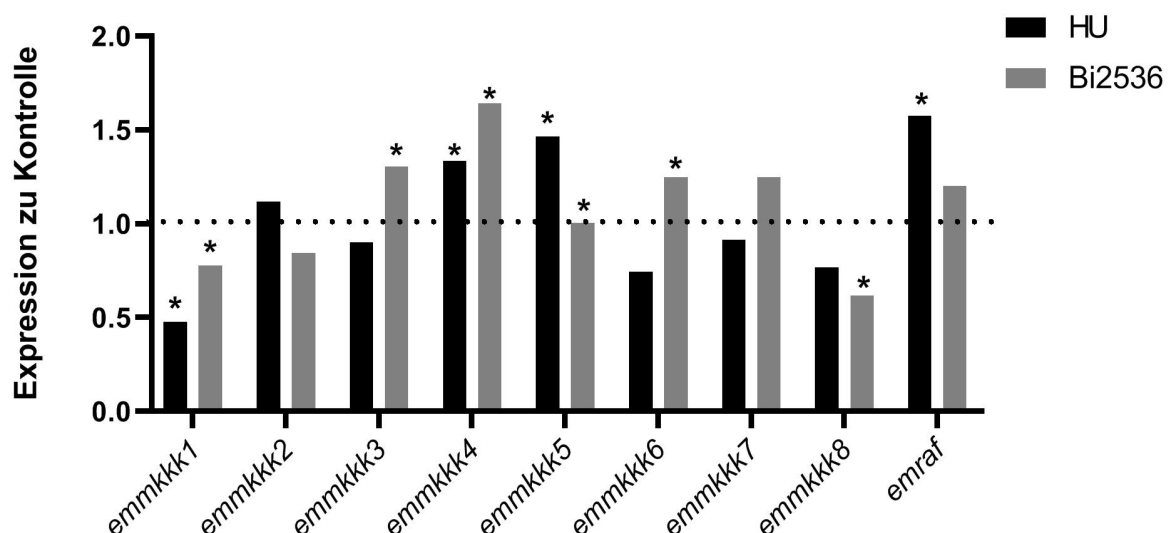


Abbildung 10 Genexpression von MAP3K in Metacestoden nach Behandlung mit HU und Bi2536. Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Signifikanzniveau (\*) < 0,05.

### 3.1.3 Mutmaßliche MAP2K in *E. multilocularis*

Wie schon bei den MAP3K weisen auch unter den mutmaßlichen *Echinococcus*-MAP2K einzelne, wie EmMKK2 und EmMKK3 Homologien von über 50% zu Proteinkinasen anderer Organismen auf und unterstützen die These der evolutionären Konservierung dieser Signalkaskademodule (siehe Tabelle 3). Auch die einzelnen MAP2K von *E. multilocularis* untereinander weisen im Bereich der Kinasedomäne eine große Ähnlichkeit der Sequenz auf (siehe Abbildung 11).

Bezeichn.	First Hit Human			First Hit		
	Accession	Bezeichn.	Hom.	Accession	Bezeichn.	Hom.
<b>A: Kinasedomäne</b>						
EmMKK1 *	P52564.1	HsMP2K6	46%	Q9DGE0.2	<u>DrMP2K6</u>	46%
EmMKK2 *	Q02750.2	HsMP2K1	52%	Q91447.1	ScMP2K1	52%
EmMKK3	O14733.2	HsMP2K7	52%	O14733.2	HsMP2K7	52%
EmMKK4	P45985.1	<u>HsMP2K4</u>	33%	P47809.2	<u>MmMP2K4</u>	33%
EmMKK5	P45985.1	HsMP2K4	55%	P47809.2	<u>MmMP2K4</u>	55%
<b>B: vollständige Proteinsequenz</b>						
EmMKK1 *	P52564.1	HsMP2K6	42%	Q5E9X2.1	<u>BtMP2K6</u>	42%
EmMKK2 *	Q02750.2	HsMP2K1	50%	Q91447.1	ScMP2K1	50%
EmMKK3	O14733.2	HsMP2K7	46%	O14733.2	HsMP2K7	46%
EmMKK4	P52564.1	<u>HsMP2K6</u>	31%	Q5E9X2.1	<u>BtMP2K6</u>	30%
EmMKK5	P45985.1	HsMP2K4	52%	Q07192.1	<u>XIMP2K2</u>	53%

Tabelle 3 Übersicht über potenzielle MAP2K von *E. multilocularis* mit homologen Proteinen anderer Organismen. A: BLAST-Analysen der Kinasedomäne, B: BLAST-Analyse der vollständigen Proteinsequenz. Homologe Proteine wurden über reziproke BLAST gefunden. Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Proteinennamen von *E. multilocularis*, sowie der erste menschliche und der erste organismusunabhängige Treffer in der Swiss-Prot Datenbank bei NCBI. \*(Gelmedin et al. 2010). Homologien. *Bt*: *Bos taurus*, *Dr*: *Danio reseo*, *Hs*: *Homo sapiens*, *Mm*: *Mus musculus*, *Sc*: *Serinus canaria*, *Xl*: *Xenopus laevis*. Mit Unterstrich gekennzeichnet sind sich bei Kinasedomäne und gesamten Protein unterscheidende First Hits.

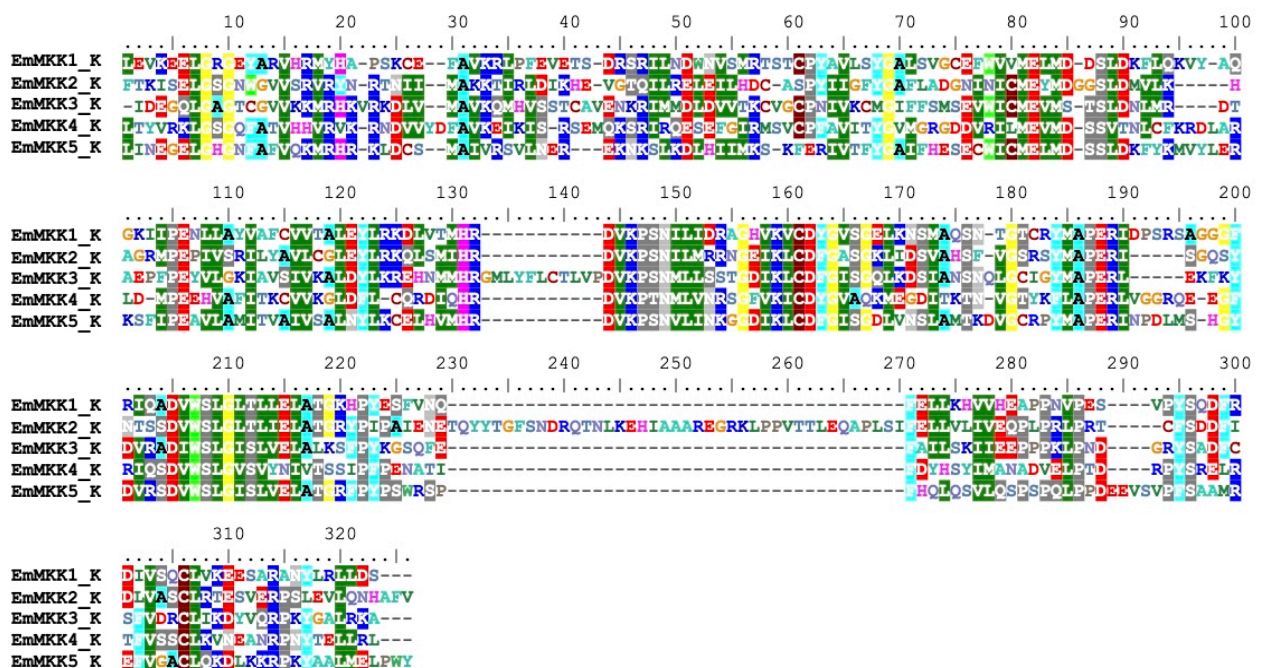


Abbildung 11 Sequenzvergleich der MAP2K-Kinasedomänen von MAP3K von *E. multilocularis*. Das Alignment der entsprechenden Sequenzen wurde mittels MUSCLE (Edgar 2004a; Edgar 2004b) erstellt.

Phylogenetische Analysen zeigen ebenfalls die besondere Nähe dieser MAP2K zu den entsprechenden MAPK-Komponenten anderer Organismen (siehe Abbildung 12).

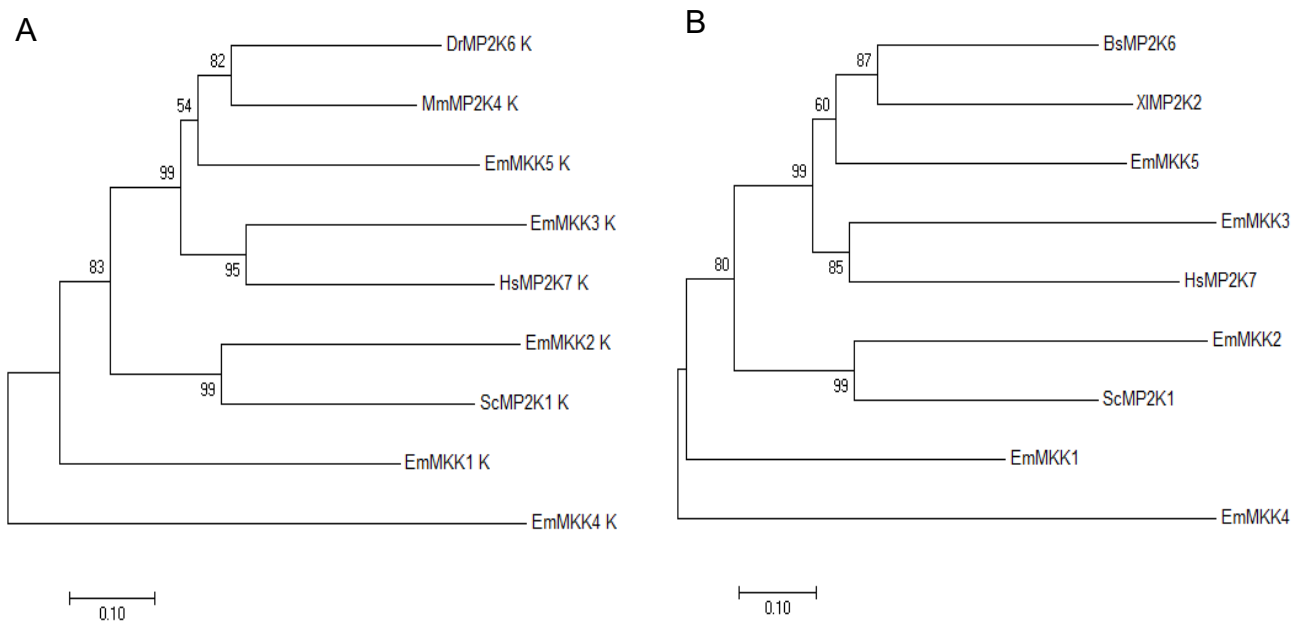


Abbildung 12 **Phylogenetische Analyse von MAP2K** A: der Kinasedomänen, B: vollständige Proteinsequenzen. AS-Sequenzen von *E. multilocularis* MAP2K und entsprechender First Hits in der Swissprot Datenbank bei NCBI wurden mit Hilfe von MUSCLE (Edgar 2004a; Edgar 2004b) alignet. Dieses Alignment wurde dann zur Erstellung phylogenetischer Analysen mittels Neighbour-Joining-Methode (Saitou und Nei 1987) bei MEGA7 (Kumar et al. 2016; Kumar et al. 1994) verwendet. Die Astlängen zeigen die evolutionäre Distanz an, die Nummern repräsentieren die Bootstrap-Werte. *Bt*: *Bos taurus*, *Dr*: *Danio rerio*, *Hs*: *Homo sapiens*, *Mm*: *Mus musculus*, *Sc*: *Serinus canaria*, *Xl*: *Xenopus laevis*.

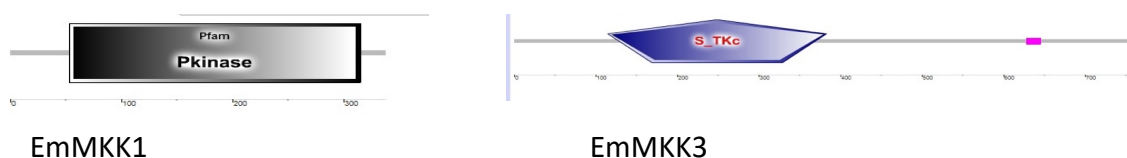


Abbildung 13 **Domänen von EmMKK1 und EmMKK3**: Domänenanalysen wurden mit SMART (Letunic et al. 2015; Schultz et al. 1998) durchgeführt und zeigen das Vorhandensein von Proteinkinase- bzw. Serin/Threonin-Kinasedomänen.

Domänenanalysen zeigen, dass es sich bei allen gefunden MAP2K um Proteinkinasen handelt, da EmMKK1 eine Proteinkinasedomäne und EmMKK2 bis EmMKK5 Serin/Threonin-Kinasedomänen aufweisen (siehe Abbildung 13).

Zur Verifizierung der potenziellen MAP2K von *E. multilocularis* wurden auch diese Genexpressionsanalysen unterzogen und es zeigt sich, dass alle fünf *Echinococcus*-MAP2K in Metacestoden und Protoscolices exprimiert werden (siehe Abbildung 14) (Herz 2019).

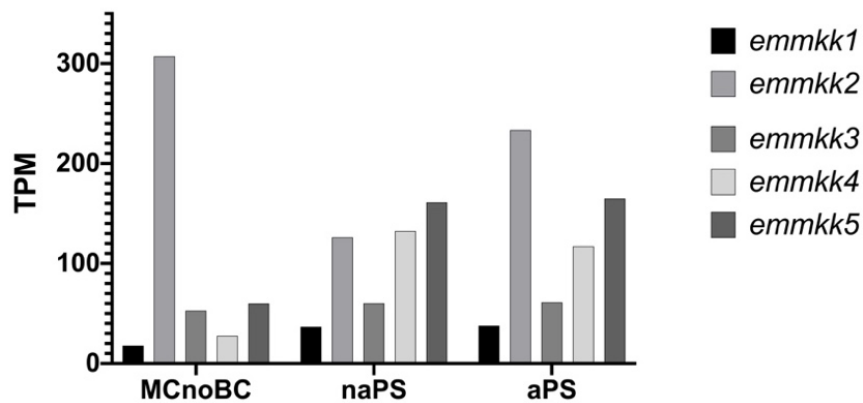


Abbildung 14 **Genexpression von MAP2K in *E. multilocularis***: Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird in Transcripts Per Kilobase Million (tpm) angegeben. MCnoBC: Metacestode ohne Brutkapseln, naPS: nichtaktivierter Protoscolex, aPS: aktivierter Protoscolex

Auch hier scheint eine MAP2K, *emmkk1*, in besonderem Maße in Stammzellen und Progeny exprimiert zu sein. Eine HU-Behandlung von Metacestoden reduziert die Genexpression im Vergleich zu Kontrollen signifikant um 39%, BI2536 signifikant um 26% (siehe Abbildung 15) (Herz 2019).

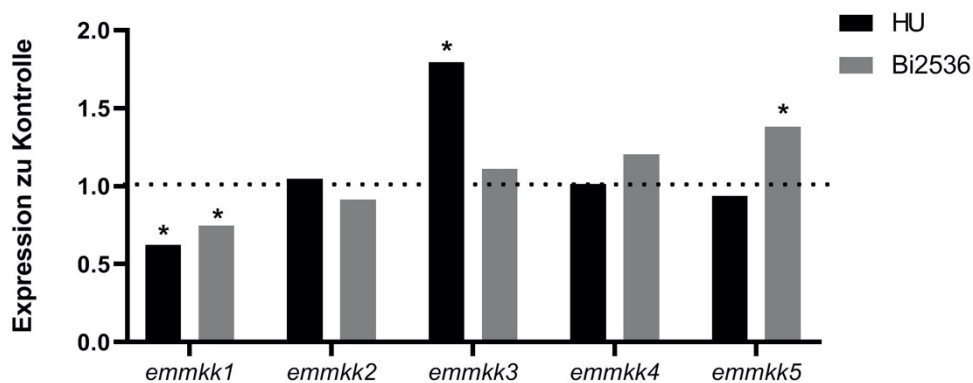


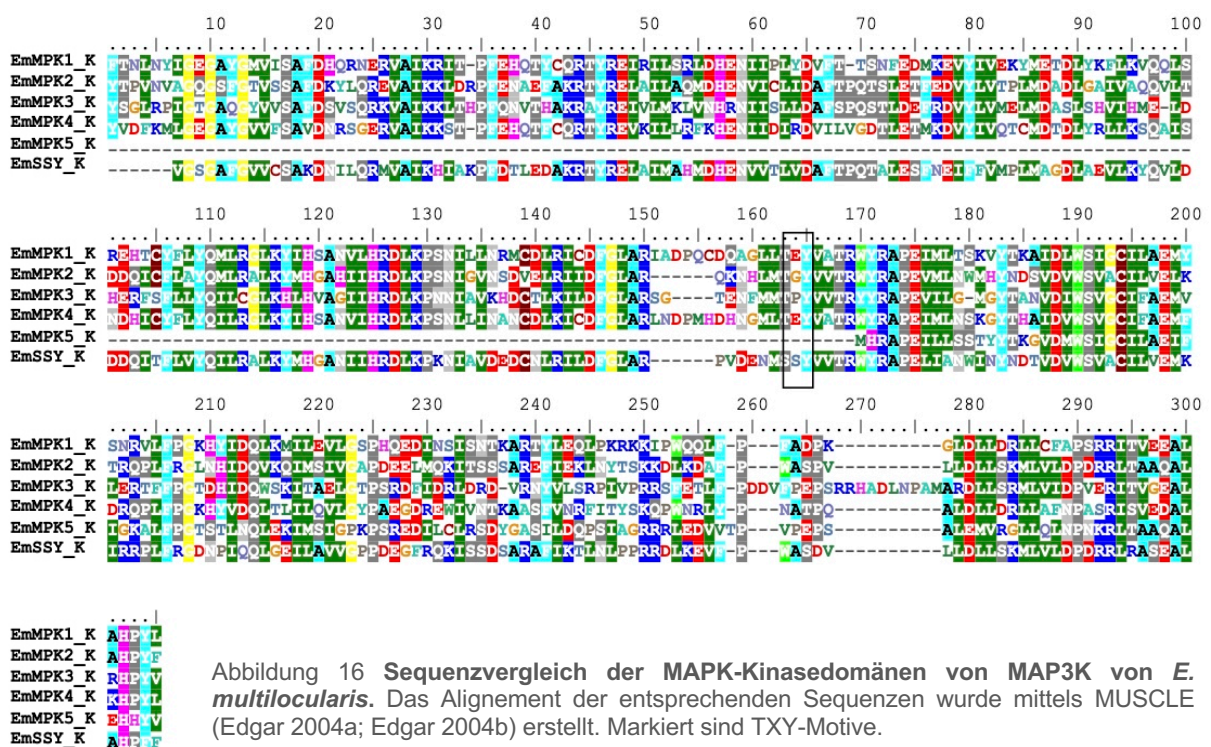
Abbildung 15 **Genexpression von MAP2K In Metacestoden nach Behandlung mit HU und Bi2536**. Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Signifikanzniveau (\*) < 0,05

### 3.1.4 Mutmaßliche MAPK in *E. multilocularis*

Sowohl die Kinasedomänen, als auch die vollständigen AS-Sequenzen der MAPK von *E. multilocularis* sind evolutionär hoch konserviert und weisen alle über 50% Homologie zum humanen Korrelat auf (siehe Tabelle 4). Die AS-Sequenzen im Bereich der Kinasedomäne zeigen zwischen alle MAPK von *E. multilocularis* große Übereinstimmungen (siehe Abbildung 16).

Bezeichn.	First Hit Human			First Hit		
	Accession	Bezeichn.	Hom.	Accession	Bezeichn.	Hom.
<b>A: Kinasedomäne</b>						
EmMPK1 **	P27361.4	HsMK03	71%	P27361.4	HsMK03	71%
EmMPK2 *	Q16539.3	HsMK14	59%	P47812.1	XIMK14	60%
EmMPK3	P45984.2	HsMK09	69%	Q9WTU6.2	MmMK09	70%
EmMPK4	P28482.3	HsMK01	69%	P26696.3	XIMK01	69%
EmMPK5	Q8TD08.1	HsMK15	54%	Q501Q9.1	XIMK15	53%
<b>B: vollständige Proteinsequenz</b>						
EmMPK1 **	P27361.4	HsMK03	70%	P27361.4	HsMK03	70%
EmMPK2 *	Q16539.3	HsMK14	56%	P47812.1	XIMK14	56%
EmMPK3	P53779.2	<u>HsMK10</u>	61%	Q9WTU6.2	MmMK09	64%
EmMPK4	P28482.3	HsMK01	64%	P26696.3	XIMK01	65%
EmMPK5	Q8TD08.1	HsMK15	51%	Q501Q9.1	XIMK15	42%

Tabelle 4 Übersicht über potenzielle MAPK von *E. multilocularis* mit homologen Proteinen anderer Organismen. A: BLAST-Analysen der Kinasedomäne, B: BLAST-Analyse der vollständigen Proteinsequenz. Homologe Proteine wurden über reziproke BLAST gefunden. Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Proteinnamen von *E. multilocularis*, sowie der erste menschliche und der erste organismusunabhängige Treffer in der Swiss-Prot Datenbank bei NCBI. \*(Gelmedin et al. 2008) \*\* (Spiliotis et al. 2006). Hom: Homologien. Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Xl: *Xenopus laevis*. Mit Unterstrich gekennzeichnet sind sich bei Kinasedomäne und gesamten Protein unterschiedene First Hits.



In Analysen mit MEGA7 (Kumar et al. 2016; Kumar et al. 1994) zeigt besonders EmMPK4 eine hohe Konservierung, während EmMPK5 eine höhere Distanz zu anderen MAPK aufweist (siehe Abbildung 17).

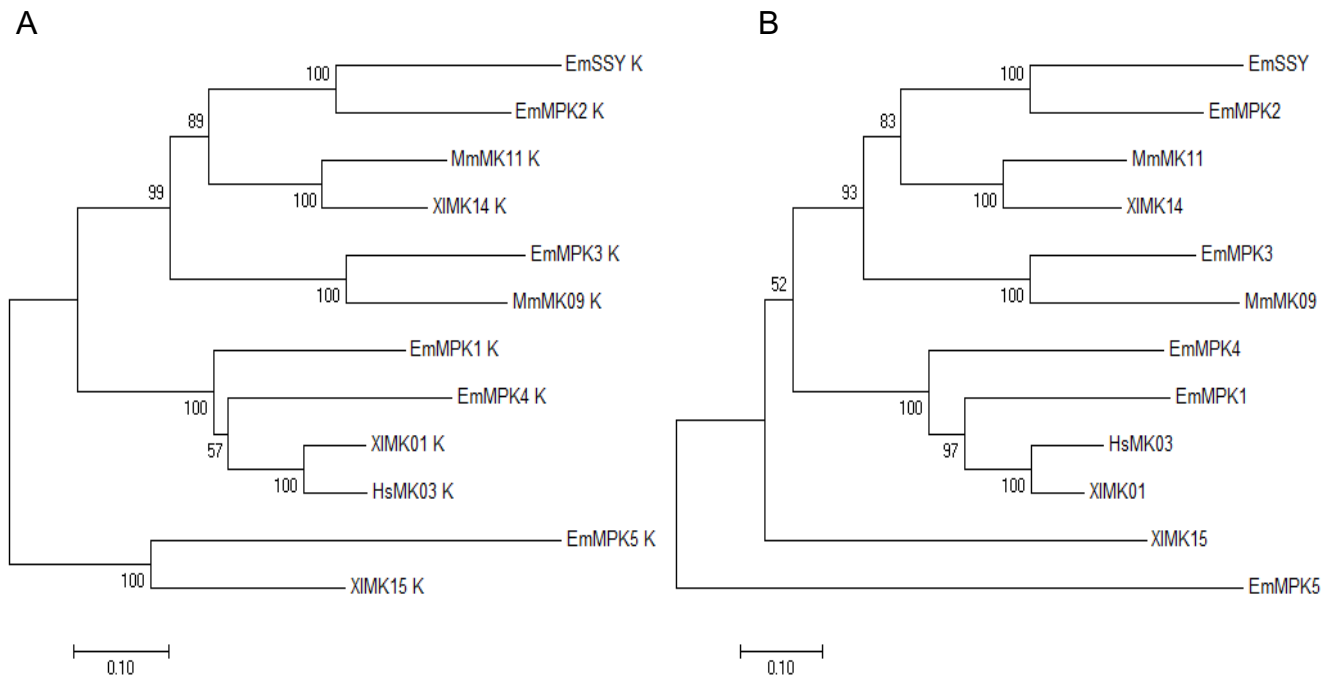


Abbildung 17 **Phylogenetische Analyse von MAPK** A: der Kinasedomänen, B: vollständige Proteinsequenzen. AS-Sequenzen von *E. multilocularis* MAPK und entsprechender First Hits in der Swissprot Datenbank bei NCBI wurden mit Hilfe von MUSCLE (Edgar 2004a; Edgar 2004b) alignet. Dieses Alignment wurde dann zur Erstellung phylogenetischer Analysen mittels Neighbour-Joining-Methode (Saitou und Nei 1987) bei MEGA7 (Kumar et al. 2016; Kumar et al. 1994) verwendet. Die Astlängen zeigen die evolutionäre Distanz an, die Nummern repräsentieren die Bootstrap-Werte. Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Xi: *Xenopus laevis*.

Zur genaueren Klassifikation der potenziellen MAPK wurden die neu gefundenen Proteine auf das Vorhandensein von Phosphorylierungsstelle durch MAP2K, bestehend aus dem Dreipeptid-Motiv TXY (Morrison 2012) untersucht. EmMPK3 weist ein TPY-Motiv auf, was es als eine JNK definiert (Krishna und Narang 2008). EmMPK4 besitzt ein TEY-Motiv und kann daher der Gruppe der ERK-Kinasen zugeordnet werden (Krishna und Narang 2008). Interessanterweise besitzt EmMPK5 im Gegensatz zu den Erk7/8-Proteinen mit höchster Homologie von *Homo sapiens* und *Xenopus laevis* statt einem TEY-Motiv ein TYY-Motiv auf und kann daher nicht eindeutig einer Gruppe zugeordnet werden. Dies gilt auch für EmSSY, das im Gegensatz zu seinen murinen und humanen Äquivalenten kein TGY-Motiv, sondern ein SSY-Motiv besitzt. Domänenanalysen zeigen, dass es sich bei allen diesen MAPK um Serin/Threonin-Kinasen handelt. Einzige Ausnahme bildet EmMPK5, die eine Kinasedomäne unklassifizierter Spezifität aufweist (Abbildung 18).



Abbildung 18 **Domänen von EmMPK4 und EmMPK5** Domänenanalysen wurden mit SMART (Letunic et al. 2015; Schultz et al. 1998) durchgeführt und zeigen das Vorhandensein von Proteinkinase- bzw. Serin/Threonin-Kinase-domäne.

Auch alle sechs in Genomanalysen gefundenen MAPK von *E. multilocularis* werden im nichtaktivierten und aktivierten Zustand der Protoscolices und– mit Ausnahme von *emmpk5* –in Metacestoden exprimiert (siehe Abbildung 19). Eine Behandlung von Metacestoden mit HU führt zu einer signifikanten Reduktion der *emssy*-Expression um 86%, eine Behandlung mit BI2536 sogar zu einer 92% Reduktion (siehe Abbildung 20) (Herz 2019).

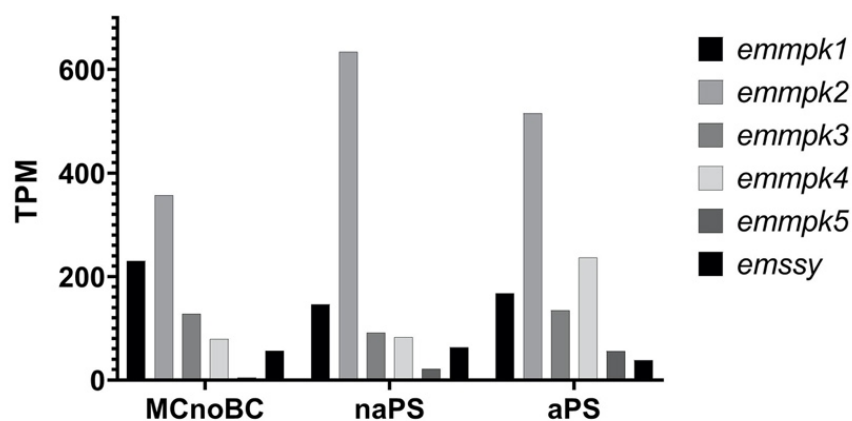


Abbildung 19 **Genexpression von MAPK in *E. multilocularis***: Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird in Transcripts Per Kilobase Million (tpm) angegeben. MCnoBC: Metacestode ohne Brutkapseln, naPS: nichtaktivierter Protoscolex, aPS: aktivierter Protoscolex

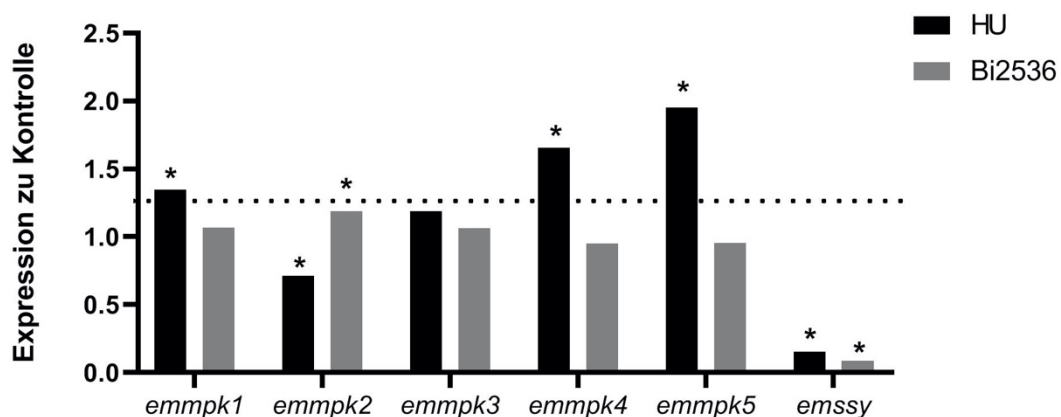


Abbildung 20 **Genexpression von MAPK in Metacestoden nach Behandlung mit HU und Bi2536**. Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben. Signifikanzniveau (\*) < 0,05.



Zusammenfassend konnten anhand dieser bioinformatischen Analysen elf potenzielle MAP3K, fünf potenzielle MAP2K und sechs potenzielle MAPK im *Echinococcus*-Genom identifiziert werden, die bis auf wenige Ausnahmen alle in Metacestoden exprimiert werden und teils hohe Homologien zu MAPK-Komponenten anderen Organismen aufweisen. Die Gene *emmkkk1*, *emmkk1* und *emssy* scheinen dabei in besonderem Ausmaß in Stammzellen und Progeny exprimiert zu sein. Bereits vorliegende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, dass das Gen *emssy* aus einer Genduplikation der EmMPK2 hervorging, aber keine eigene Kinaseaktivität besitzt. Warum es in den Stammzellen exprimiert wird, ist bis dato unbekannt (Duvoisin und Brehm, unpublizierte Daten).

### 3.2 Charakterisierung der MAP3K EmMKKK1

Wie im Abschnitt 3.1.2 bereits beschrieben ist bis dato nur die Proteinkinase EmRaf als Vertreter von *Echinococcus*-MAP3K weiteren Analysen unterzogen worden (Spiliotis et al. 2005). Die Erkenntnisse der vorliegenden bioinformatischen Analyse lassen das Augenmerk besonders auf die Kinase EmMKKK1 fallen, da phylogenetische Analysen ihre evolutionäre Konservierung belegen (siehe Abbildung 6) und Analysen von Transkriptomdaten die signifikante Expression von *emmkkk1* im Metacestodenstadium, insbesondere in Stammzellen, von *E. multilocularis* nahelegen (siehe Abschnitt 3.1.2). Die humane Proteinkinase mit höchster Homologie, HsM3K1, ist als MAP3K im ERK-Signalweg als Vermittler externer Stimuli zur Proliferation und Differenzierung beschrieben (Krishna und Narang 2008). Alle diese Faktoren machen EmMKKK1 daher interessant für eine genauere Analyse in Hinblick auf einen potenziellen pharmakologischen Angriffspunkt zur Entwicklung neuer antiparasitärer Medikamente.

Das Gen *emmkkk1* liegt auf Chromosom Nr. 9 und besitzt elf Introns. Das Transkript besitzt 4389 Basenpaare (bp, siehe Anhang 9.4) und kodiert für das Protein EmMKKK1 mit 1463 AS, einer C-terminalen Kinasedomäne an AS-Position 1096 bis 1363 (siehe Abbildung 7) und einem molekularem Gewicht laut EsPASy (Artimo et al. 2012) von 157,7kDA.

#### 3.2.1 Expression von *emmkkk1* in Metacestoden von *E. multilocularis*

Zur Validierung der Ergebnisse von vorliegenden Transkriptomdaten wurde die Expression von *emmkkk1* mittels WMISH in Metacestoden analysiert. Für die Sonden wurde aus cDNA zwei Tage alter Primärzellen mit den Primern Sonde\_Mekk1\_dw und Sonde\_Mekk1\_up (T 59°C) und der KOD Polymerase eine 1281bp lange Gensequenz

aus *emmkkk1* amplifiziert und dieses mit Hilfe des Restriktionsenzym Nco1-HF in pJET kloniert. Nach Transformation in kompetente *E. coli* wurden positive Klone mittels Klontest mit den Primern pJET 1.2 forward und Sonde\_Mekk1\_dw bzw. pJET 1.2 forward und Sonde\_Mekk1\_up detektiert, die Plasmide in Übernacht-Kulturen amplifiziert, isoliert und mit den Primern pJET 1.2 forward und pJET 1.2 reverse sequenziert. Je eine Sense- (forward) bzw. Antisense- (reverse) Probe ohne Veränderungen in der Basenfolge wurde mittels *in vitro* Transkription in RNA umgeschrieben und mittels Dot Blot die Konzentrationen auf 10ng/μl bestimmt. Mit diesen Sonden wurden im Anschluss WMISH an Metacestodenvesikeln der Isolate Ingrid und J2012 durchgeführt. Zur Auswertung wurden zwei Ausschnitte von jeweils vier Vesikel unter dem Konfokalmikroskop analysiert (siehe Abbildung 22).

In vorliegenden Versuchen lag der Anteil der während der fünfstündigen Inkubation mit EdU proliferierender und damit EdU-eingelagerten Zellen (EdU+) zwischen 4,3% (SD=2,4%; n=1712 Zellen; Isolat Ingrid) und 8,5% (SD=2,9%; n=2019 Zellen; Isolat J2012). In 8,6% (SD=3,6%; n=1712 Zellen; Isolat Ingrid) bzw. 13,6% (SD=4,8%; n=2019; Isolat J2012) der Zellen ließ sich ein positives Signal für *emmkkk1* (*emmkkk1+*) detektieren. Der Anteil von Zellen mit *emmkkk1+* und EdU+ Kolokalisation an allen EdU+ lag bei 69% (69,2%; SD=14,2%; n=162 EdU+, J2012 bzw. 68,8%; SD=23,2% n=70 EdU; Isolat Ingrid), der Anteil von Zellen mit *emmkkk1+* und EdU+ Kolokalisation an allen *emmkkk1+* bei 33,5% (SD=13,8%; n=142 *emmkkk1+*; Ingrid) bzw. 45,0% (SD=16,0%; n=269 *emmkkk1+*; Isolat J2012) (siehe Abbildung 21).

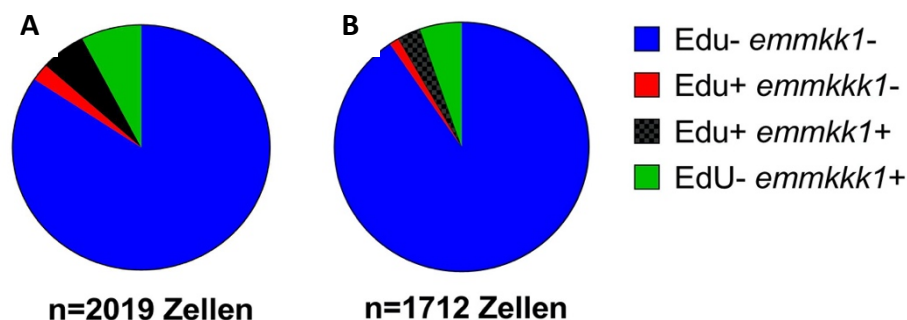


Abbildung 21 WMISH von *emmkkk1*. Metacestodenvesikel der Isolate J2012 (A) und Ingrid (B) wurden für 5h mit 50μM inkubiert, eine EdU Detektion und WMISH mit *emmkkk1*-Sonde durchgeführt und Kolokalisationen unter dem Konfokalmikroskop analysiert. Bei 70% der Edu+ Zellen konnte ein gleichzeitiges Signal für *emmkkk1* detektiert werden.

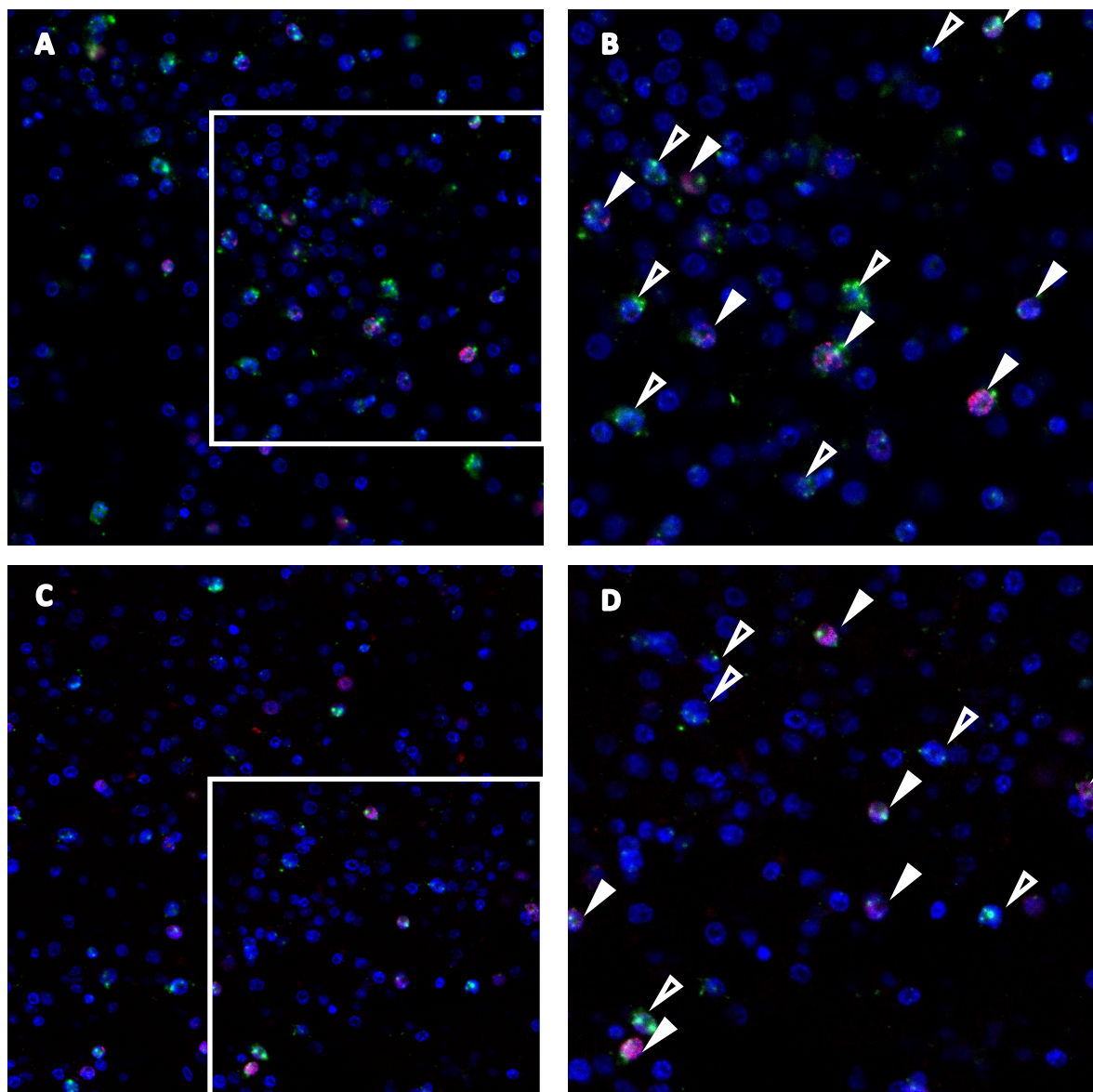


Abbildung 22 **WMISH von *emmkkk1***. A und C sind Übersichtsaufnahmen, B und D sind Detailansichten der Kollokalisation von *emmkkk1* (grün) mit EdU-Inkorporation (rot) nach 5h Inkubation mit 50  $\mu$ M EdU in der Germinalschicht. Zweifach-positive Zellen sind mit ausgefüllten Pfeilen, *emmkkk1*<sup>+</sup>, aber EdU<sup>-</sup> Zellen sind mit leeren Pfeilen gekennzeichnet. A und B entstammen dem Isolat J2012, C und D dem Isolat Ingrid. Mitgeführte Sense-Sonden ergaben kein Signal.

Durch WMISH konnte also gezeigt werden, dass *emmkkk1* in einem überwiegenden Anteil der proliferativen Stammzellen des Parasiten, aber auch in einem gewissen Anteil postmitotischer Zellen exprimiert wird.

### 3.3 Interaktionsassays von *Echinococcus*-MAPK-Komponenten

Wie bereits in der Einleitung kurz skizziert handelt es sich bei MAPK-Komponenten um Proteinkinasen, die in meist dreigliedrigen Kaskaden externe Stimuli vermitteln. Dies geschieht in erster Linie durch Protein-Protein-Interaktionen mittels gegenseitiger Phosphorylierung (Pearson et al. 2001). Als evolutionär hoch konserviertes Prinzip der Signaltransduktion sind solche MAPK-Module auch im *Echinococcus*-Genom kodiert (siehe Abschnitt 3.1, (Tsai et al. 2013)). Um mehr über die Funktionsweise dieser MAPK-Komponenten im Allgemeinen und im Speziellen der MAP3K EmMKKK1 in *E. multilocularis* zu gewinnen wurden Protein-Protein-Interaktionsassays mittels eines Y2H-Ansatzes durchgeführt.

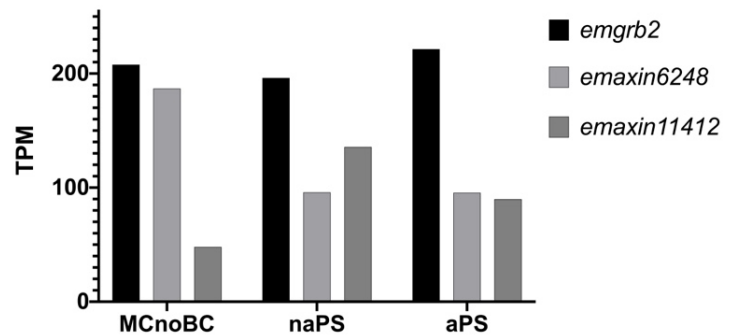
#### 3.3.1 Interaktionspartner von EmMKKK1

In einem ersten Ansatz wurde die Interaktion von EmMKKK1 mit allen fünf potenziellen MAP2K in *E. multilocularis* getestet, um die Zuordnung zur Gruppe der MAP3K zu überprüfen und Erkenntnisse über die Funktion dieser Kinase in *E. multilocularis* zu erhalten. In der Literatur sind außerdem verschiedene M3K1-Upstream-Interakteure wie Grb2 (Pomerance et al. 1998), Raf (Karandikar et al. 2000) oder Axin (Zhang et al. 1999) beschrieben. Zur Analyse der Aktivierungswege von EmMKKK1 wurde nach potenziellen *Echinococcus*-Homologen dieser Upstream-Interakteure analog zur bioinformatischen Analyse von MAPK-Komponenten gesucht (siehe Tabelle 5) und ihre tatsächliche Expression in *E. multilocularis* anhand von Transkriptomdaten nachgewiesen (siehe Abbildung 23). Bei EmGRB2, EmAXIN6248 und EmAXIN11412 scheint es sich um die einzigen Grb2- und Axin-Orthologe des Parasiten zu handeln. Aufgrund von Hinweisen, dass M3K1 direkt in der Lage ist, mit MAPK zu interagieren wurden auch JNK- und ERK-Kinasen von *E. multilocularis* in die Interaktionsstudien mit EmMKKK1 aufgenommen.

Nummer	Bezeichnung	First Hit Human		
		Accession	Bezeichnung	Homologie
EmuJ_000587600	EmGRB2	P62993.1	HsGRB2	47%
EmuJ_000624800	EmAXIN6248	O15169.2	HsAXIN1	46%
EmuJ_001141200	EmAXIN11412	O15169.2	HsAXIN1	49%

Tabelle 5 Übersicht über potenzielle Axin- und Grb2-Homologe in *E. multilocularis*. Homologe Proteine wurden über reziproken BLAST gefunden. Dargestellt sind die entsprechenden Gennummern und die in der Arbeit verwendeten Proteinennamen von *E. multilocularis*, sowie der erste menschliche Treffer in der Swiss-Prot Datenbank bei NCBI. Hs: *Homo sapiens*.

Abbildung 23 Genexpression von *emgrb2*, *emaxin6248* und *emaxin11412* in *E. multilocularis*: Transkriptomdaten wurden aus Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird in Transcripts Per Kilobase Million (tpm) angegeben. MCnoBC: Metacestode ohne Brutkapseln, naPS: nichtaktivierter Protoscolex, aPS: aktivierter Protoscolex



Die Herstellung der Plasmide von *emraf* (Spiliotis et al. 2005), *emmkk1* und *emmkk2* (Gelmedin et al. 2010), *emmpk1* (Spiliotis et al. 2006) und *emmpk3* (Riedl 2009) ist bereits beschrieben. Plasmide von *emmkk3*, *emmkk4* und *emmkk5* wurden freundlicherweise von Raphaël Duvoisin, Plasmide von *emmkkk1* 5' (pGADT7: bp 13 bis 2408, pGBDT7: bp 13 bis 2371) und *emmkkk1* 3' (bp 2188 bis 4389), sowie *emaxin6248* und *emaxin11412* (Montagne et al. 2019) von Monika Bergmann zur Verfügung gestellt. *Emgrb2* wurde mittels der Primer Grb2-dw-YH und Grb2-up-YH und der Taq Polymerase aus Metacestoden-cDNA H95 C1 amplifiziert, das aufgereinigte Produkt mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI-HF verdaut und anschließend in pGBKT7 und pGADT7 ligiert. *Emmpk3* wurde mittels der Primer Erk2 dw YH und Erk2 up YH und der Taq Polymerase von cDNA H95 C1 amplifiziert, das aufgereinigte Produkt mit den Restriktionsenzymen EcoRI-HF und BamHI-HF verdaut und anschließend in pGBKT7 und pGADT7 ligiert. Alle Klone wurden vor ihrer Verwendung nochmals sequenziert, um unerwünschte Veränderungen in der Basenfolge aufgrund fehlerhafter PCR-Amplifikation oder Mutationen der Klone auszuschließen. Bei EmMPK4-pGADT7 und EmRaf-pGBDT7 konnte leider kein Wachstum der Hefen erreicht werden und somit entsprechende Interaktionsstudien nur monodirektional durchgeführt werden. Entsprechende Übersichtstabellen (Tabelle 6 A und B) sind am Ende des Abschnitts, die Sequenzen der noch nicht publizierten Gene im Anhang (Abschnitt 9.4) zu finden.

In den vorliegenden Versuchen konnte durch Hefewachstum auf SD-Leu-Trp-His-Ade eine starke Interaktion von EmGrb2-pGADT7 mit EmMKKK1 5'-pGBDT7 und EmMKKK1 3'-pGBDT7 gezeigt werden (siehe Abbildung 24).

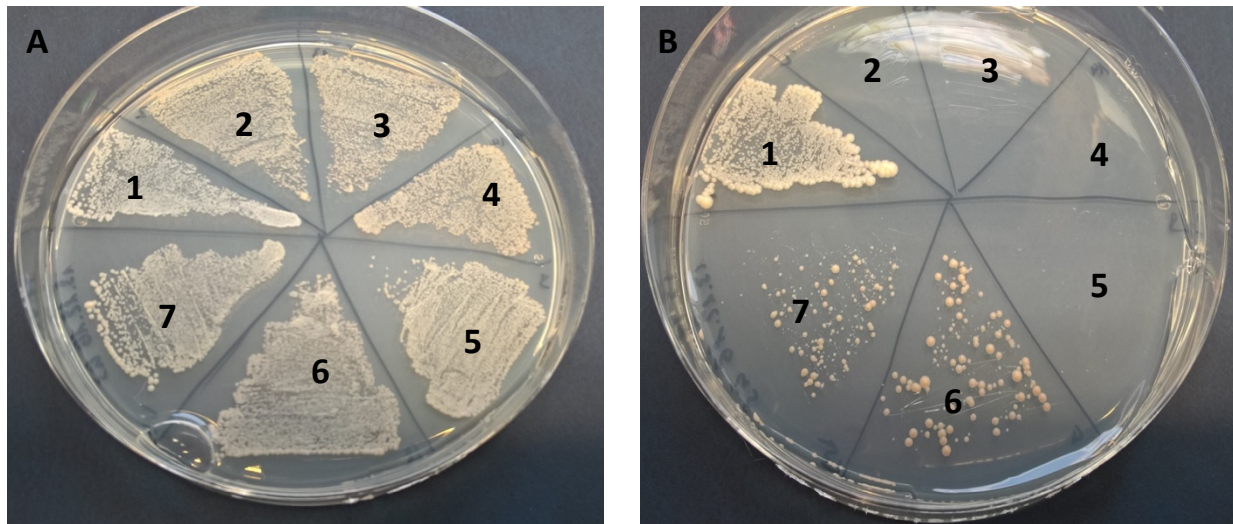


Abbildung 24 **Interaktion von EmMKKK1 mit EmGrb2 im Yeast-two-Hybrid-Assay.** EmMKKK1 5' bzw. EmMKKK1 3' wurden jeweils mit der Gal4 DNA-Bindedomäne (GBKT7) bzw. der Gal4 DNA-Aktivierungsdomäne (pGADT7) fusioniert und mit den zu testenden Interaktionspartner EmGRB2 im Hefestamm AH109 exprimiert. Das Wachstum wurde nach drei Tagen beurteilt. A zeigt die erfolgreiche Transformation der Plasmide auf SD-Leu-Trp-Platten, B zeigt das Wachstum auf hochstringenten SD-Leu-Trp-His-Ade an. 1: Positivkontrolle t-Antigen- pGADT7 + p53 i-pGBKT7; 2: Negativkontrolle t-Antigen-pGADT7 + lamC-pGBKT; 3: pGADT7 & EmMKKK1 3'- pGBDT7; 4: pGADT7 & EmMKKK1 5'-pGBDT7; 5: EmGrb2-pGADT7 & pGBDT7; 6: EmGrb2-pGADT7 & EmMKKK1 3'- pGBDT7; 7: EmGrb2-pGADT7 & EmMKKK1 5'-pGBDT7

Eine Interaktion von EmMKKK1 mit den potenziellen Upstream-Aktivatoren EmRaf, EmAXIN6248 und EmAXIN11412 konnte in den vorliegenden Versuchen nicht detektiert werden. Auch die bidirektionale Expression von EmMKKK1 5' bzw. EmMKKK1 3' mit EmMKK1, EmMKK4 und EmMKK5 zeigte kein Wachstum der Hefen auf schwachstringenten Selektionsplatten. Die pGBT7-Konstrukte von EmGRB2, EmMKK2, EmMPK1, EmMPK3 und EmMPK4 zeigten ein hohes Autoaktivationspotenzial, sodass hier die Versuche zur sicheren Diskrimination einer potenziellen Interaktion um SD-Leu-Trp-His mit 3-AT verschiedener Konzentrationen erweitert wurden. Bei 7,5mM 3-AT konnte kein Wachstum der Hefen bei Kombination der entsprechenden pGBT7-Konstrukte mit dem Leervektor pGADT7 beobachtet werden, allerdings ließ sich auf diesen Platten auch kein weiteres Wachstum dieser pGBT7-Konstrukte mit EmMKKK1 5'-pGADT7 und EmMKKK1 3'-pGADT7 beobachten. Von daher lässt sich das Wachstum auf den schwachstringenten Platten am ehesten als falsch positive Ergebnisse werten. Auch bei der Testung *vice versa* ließen sich keine Hinweise auf eine potenzielle Interaktion finden.

Auch EmMKK3-pGBT7 zeigte in Kombination mit dem Leervektor pGADT7 ein hohes Autoaktivationspotenzial. Bei Steigerung der 3-AT-Konzentration auf 15mM in den SD-Leu-Trp-His-Platten ließ sich dieses Phänomen nicht mehr beobachten, wohingegen es immer noch zu einem Wachstum der Hefen bei Kombination der Plasmide EmMKKK1 5'-pGADT7 mit EmMKK3-pGBT7 kam. Somit kann hier von einer mittleren Interaktion dieser beiden Proteine ausgegangen werden (siehe Abbildung 25).

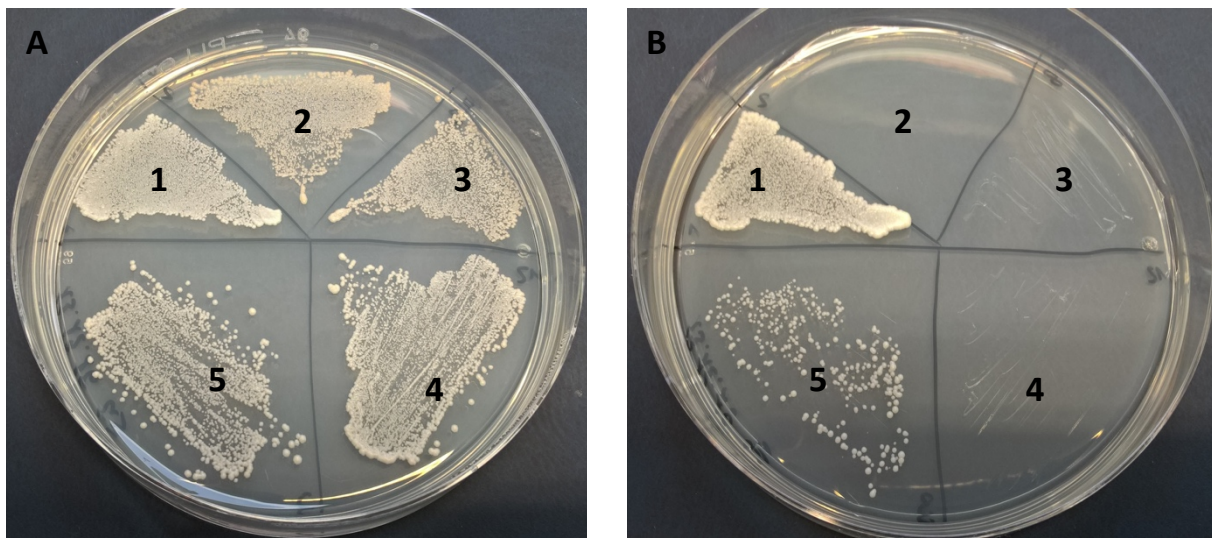


Abbildung 25 **Interaktion von EmMKKK1 mit EmMKK3 im Yeast-two-Hybrid-Assay.** EmMKKK1 5' wurde mit der DNA-Aktivierungsdomäne (pGADT7) fusioniert und mit dem zu testenden Interaktionspartner EmMKK3-pGBT7 im Hefestamm AH109 exprimiert. Das Wachstum wurde nach einer Woche beurteilt. A zeigt die erfolgreiche Transformation der Plasmide auf SD-Leu-Trp-Platten, B zeigt das Wachstum auf mittelstringenten SD-Leu-Trp-His mit 7,5mM 3-Amino-1,2,4-triazol an. 1: Positivkontrolle t-Antigen- pGADT7 + p53-pGBKT7; 2: Negativkontrolle t-Antigen-pGADT7 + lamC-pGBKT; 3: EmMKKK1 5'-pGADT7 & pGBT7; 4: pGADT7 & EmMKK3-pGBT7; 5: EmMKKK1 5'-pGADT7 & EmMKK3-pGBT7

		pGBDT7		
		EmMKKK1 5'	EmMKKK1 3'	leer
pGADT7	EmRaf	–	–	–
	EmGrb2	+++	+++	–
	EmAXIN6248	–	–	–
	EmAXIN11412	–	–	–
	EmMKK1	–	–	–
	EmMKK2	–	–	–
	EmMKK3	–	–	–
	EmMKK4	–	–	–
	EmMKK5	–	–	–
	EmMPK1	–	–	–
	EmMPK3	–	–	–
	EmMPK4	–	–	–
	leer	–	–	–
			pGADT7	
		EmMKKK1 5'	EmMKKK1 3'	leer
pGBT7	EmRaf			
	EmGrb2	a –	a –	a –
	EmAXIN6248	–	–	–
	EmAXIN11412	–	–	–
	EmMKK1	–	–	–
	EmMKK2	a –	a –	a –
	EmMKK3	a +	a –	a –
	EmMKK4	–	–	–
	EmMKK5	–	–	–
	EmMPK1	a –	a –	a –
	EmMPK3	a –	a –	a –
	EmMPK4	a –	a –	a –
	leer	–	–	–

Tabelle 6 A und B: Interaktionsstudien von EmMKKK1 mit verschiedenen potenziellen upstream- und downstream-Komponenten im entsprechenden MAPK-Signalweg. EmMKKK1 5' bzw. EmMKKK1 3' wurden jeweils mit der Gal4 DNA-Bindedomäne (GBKT7) bzw. der Gal4 DNA-Aktivierungsdomäne (pGADT7) fusioniert und mit den zu testenden Interaktionspartnern EmRaf, EmGRB2, EmAXIN6248, EmAXIN11412, EmMKK1-5 und EmMPK1, EmMPK3 und EmMPK4 im Hefestamm AH109 exprimiert. Als Positivkontrolle wurde t-Antigen-pGADT7 und p53-pGBKT7 und als Negativkontrolle t-Antigen-pGADT7 und lamC-pGBKT7 mitgeführt. Zum Ausschluss von Autoaktivierung wurden weitere Kontrollen der Interaktionspartner und den leeren Vektoren pGADT7 bzw. pGBKT7 mitgeführt. (–) bzw. (+) zeigen kein Wachstum bzw. Wachstum auf schwachstringenten Platten, (a–) bzw. (a+) kein Wachstum bzw. Wachstum auf mittelstringenten Platten bei Wachstum auf schwachstringenten Platten aufgrund Autoaktivierung an. (+++) indiziert Wachstum auf hochstringenten Platten.



### 3.3.2 Interaktionspartner von EmMPK3 und EmMPK4

Weitere Y2H-Interaktionsstudien wurden mit den *Echinococcus*-MAP2K und potenziellen Downstream-Akteuren durchgeführt. Da sich EmMPK4 nur als Konstrukt mit pGBT7 exprimieren ließ, konnten die entsprechenden Studien nur monodirektional durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. EmMPK4-pGBT7 zeigte bereits in Kombination mit dem Leervektor pGADT7 ein Wachstum auf den schwachstringenten SD-Leu-Trp-His Platten, sodass auch hier den Platten 7,5mM 3-AT zugesetzt wurde und somit diese Autoaktivierung verhindert werden konnte. Weiter bestehendes Wachstum der Hefen bei Kombination der Plasmide von EmMPK4-pGBT7 mit EmMKK3- pGADT7 und EmMPK4-pGBT7 mit EmMKK2-pGADT7 deutet in beiden Fällen auf eine mittlere Interaktionsstärke dieser Proteine untereinander hin (siehe Abbildung 26).

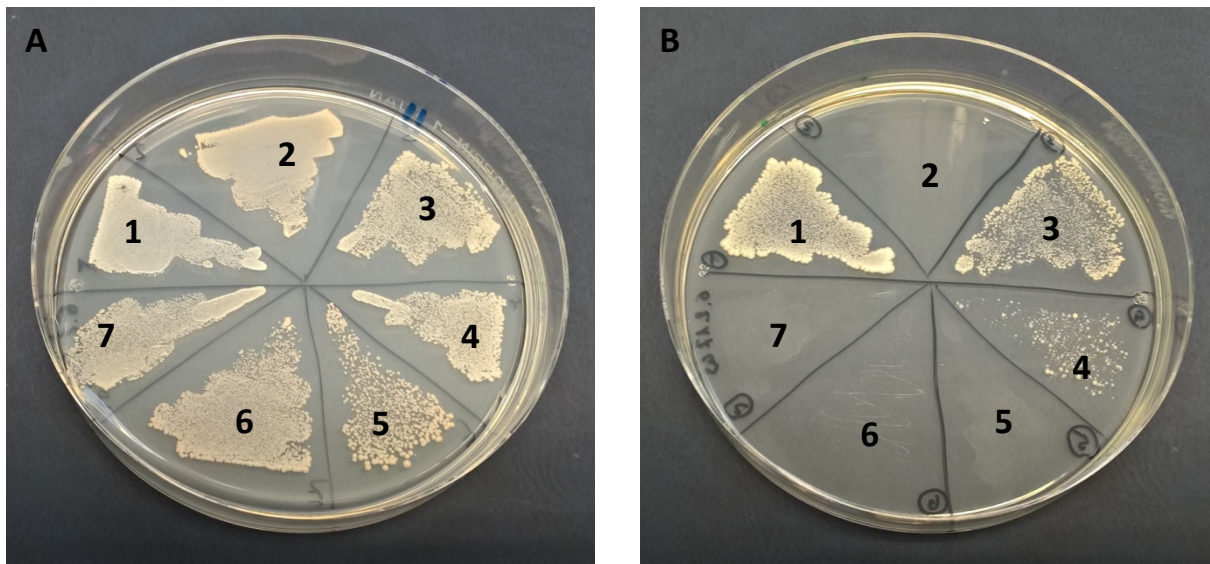


Abbildung 26 **Interaktion von EmMPK4 mit EmMKK2 und EmMKK3 im Yeast two Hybrid-Assay.** EmMPK4 wurde mit der Gal4 DNA-Bindedomäne (GBKT7) bzw. der Gal4 DNA-Aktivierungsdomäne (pGADT7) fusioniert und mit den zu testenden Interaktionspartnern EmMKK2 und EmMKK3 im Hefestamm AH109 exprimiert. Das Wachstum wurde nach einer Woche beurteilt. A zeigt die erfolgreiche Transformation der Plasmide auf SD-Leu-Trp-Platten, B zeigt das Wachstum auf mittelstringenten SD-Leu-Trp-His mit 7,5mM 3-Amino-1,2,4-triazol an. 1: Positivkontrolle t-Antigen- pGADT7 + p53 i-pGBKT7; 2: Negativkontrolle t-Antigen-pGADT7 + lamC-pGBKT; 3: EmMKK2-pGADT7 & EmMPK4-pGBDT7; 4: EmMKK3-pGADT7 & EmMPK4-pGBDT7; 5: EmMKK2-pGADT7 & pGBDT7; 6: EmMKK3-pGADT7 & pGBDT7; 7: pGADT7& EmMPK4-pGBDT7

Kein Hefewachstum konnte bei der Plasmidkombination EmMPK4-pGBT7 mit EmMKK4-pGADT7 und EmMKK5-pGADT7 auf mittelstringenten Platten beobachtet werden, sodass hier beim Wachstum auf den schwachstringenten Platten am ehesten von einem Wachstum aufgrund EmMPK4-pGBT7 Autoaktivierung ausgegangen werden muss. Bei Kombination der Plasmide EmMPK4-pGBT7 mit EmMKK1-pGADT7 zeigte sich bereits bei schwachstringenten Platten kein Hefewachstum.

		pGBT7	
		EmMPK4	leer
pGADT7	EmMKK1	–	–
	EmMKK2	a +	–
	EmMKK3	a +	–
	EmMKK4	a –	–
	EmMKK5	a –	–
	leer	a –	–

Tabelle 7 **Interaktionsstudien von EmMPK4 mit verschiedenen potenziellen upstream-Aktivatoren im entsprechenden MAPK-Signalweg.** EmMPK4 wurde mit der Gal4 DNA-Bindedomäne (GBKT7) fusioniert und mit den zu testenden Interaktionspartnern EmMKK1-5 im Hefestamm AH109 exprimiert. Als Positivkontrolle wurde t-Antigen-pGADT7 und p53-pGBKT7 und als Negativkontrolle t-Antigen-pGADT7 und lamC-pGBKT7 mitgeführt. Zum Ausschluss von Autoaktivierung wurden weitere Kontrollen der Interaktionspartner und den leeren Vektoren pGADT7 bzw. pGBKT7 mitgeführt. (–) bzw. (+) zeigen kein Wachstum bzw. Wachstum auf schwachstringenten Platten, (a–) bzw. (a+) kein Wachstum bzw. Wachstum auf mittelstringenten Platten bei Wachstum auf schwachstringenten Platten aufgrund Autoaktivierung an.

Auch die pGBT7-Konstrukte von EmMPK3, EmMKK2 und EmMKK3 wiesen – wie eingangs schon erwähnt – bis zu einer 3-AT-Konzentration von 7,5mM ein starkes Autoaktivationspotenzial auf. Auf mittelstringenten SD-Leu-Trp-His Platten mit 7,5mM 3-AT ließ sich bei Kombination der Plasmide EmMPK3-pGBT7 mit EmMKK2-pGADT7 bzw. EmMKK3-pGADt7 und EmMPK3-pGADT7 mit EmMKK2-pGBT7 kein Hefewachstum beobachten. Bei Kombination von EmMPK3-pGADT7 mit EmMKK3-pGBT7 konnte hingegen ein Hefewachstum detektiert werden. Die Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle 8 A und B dargestellt.

A		pGBT7		B		pGADT7	
		EmMPK3	leer			EmMPK3	leer
pGADT7	EmMKK2	a –	–	pGBT7	EmMKK2	a –	a –
	EmMKK3	a –	–		EmMKK3	a +	a –
	leer	a –	–		leer	–	–

Tabelle 8 A und B **Interaktionsstudien von EmMPK3 mit zwei potenziellen Upstream-Aktivatoren im entsprechenden MAPK-Signalweg.** EmMPK3 wurde mit der Gal4 DNA-Bindedomäne (GBKT7) bzw. der Gal4 DNA-Aktivierungsdomäne (pGADT7) fusioniert und mit den zu testenden Interaktionspartnern EmMKK2 bzw. EmMKK3 im Hefestamm AH109 exprimiert. Als Positivkontrolle wurde t-Antigen-pGADT7 und p53-pGBKT7 und als Negativkontrolle t-Antigen-pGADT7 und lamC-pGBKT7, zum Ausschluss von Autoaktivierung Kontrollen der Interaktionspartner und den leeren Vektoren pGADT7 bzw. pGBKT7 mitgeführt. (–) bzw. (+) zeigen kein Wachstum bzw. Wachstum auf schwachstringenten Platten, (a–) bzw. (a+) kein Wachstum bzw. Wachstum auf mittelstringenten Platten bei Wachstum auf schwachstringenten Platten aufgrund Autoaktivierung an.

Insgesamt konnten in den vorliegenden Protein-Protein-Interaktionsassays mittels eines Y2H-Ansatzes die Interaktion von EmGRB2 mit EmMKKK1, EmMKKK1 mit EmMKK3 und EmMKK3 mit EmMPK3 und EmMPK4 nachgewiesen werden und somit zwei vollständige MAPK-Signalkaskaden in *E. multilocularis*, bestehend aus MAP3K, MAP2K und MAPK (Morrison 2012), identifiziert werden.

### 3.4 Einfluss selektiver und Multi-Kinaseinhibitoren auf *E. multilocularis*

#### 3.4.1 Inhibition des ERK-Signalwegs durch selektiven Inhibitor FR180204

Um genauere Aussagen über die Funktion des ERK-Signalwegs in *E. multilocularis* treffen zu können, wurde in der Literatur nach möglichst selektiven Inhibitoren von MAPK-Komponenten gesucht. So wurde eine Studie zum ERK-Inhibitor FR180204 gefunden, in der diese Substanz mittels ATP-Kompetitivität höchst selektiv die Kinaseaktivität von Erk1 und Erk2 inhibierte. Strukturanalysen zeigten dabei, dass für die Inhibitor-Protein-Interaktion die AS Glutamin an Position 105, Asparaginsäure an Position 106, Leucin an Position 156 und Cystein an Position 166 des humanen Proteins eine entscheidende Rolle spielen (Ohori et al. 2005). Drei dieser AS-Stellen, nämlich Q105, L156 und C166, scheinen evolutionär konserviert zu sein und lassen sich so auch in EmMPK4 finden. Aufgrund dieser überwiegenden Übereinstimmung ist auch eine Inhibition der *Echinococcus*-ERK durch FR180204 denkbar. An Position 106 findet sich bei EmMPK4 ein Threonin. EmMPK1 hingegen besitzt nur die beiden Bindungsstellen L156 und C166, während an Position 105 Glutaminsäure statt Glutamin und an Position 106 Lysin statt Asparaginsäure zu finden ist (siehe Abbildung 27).

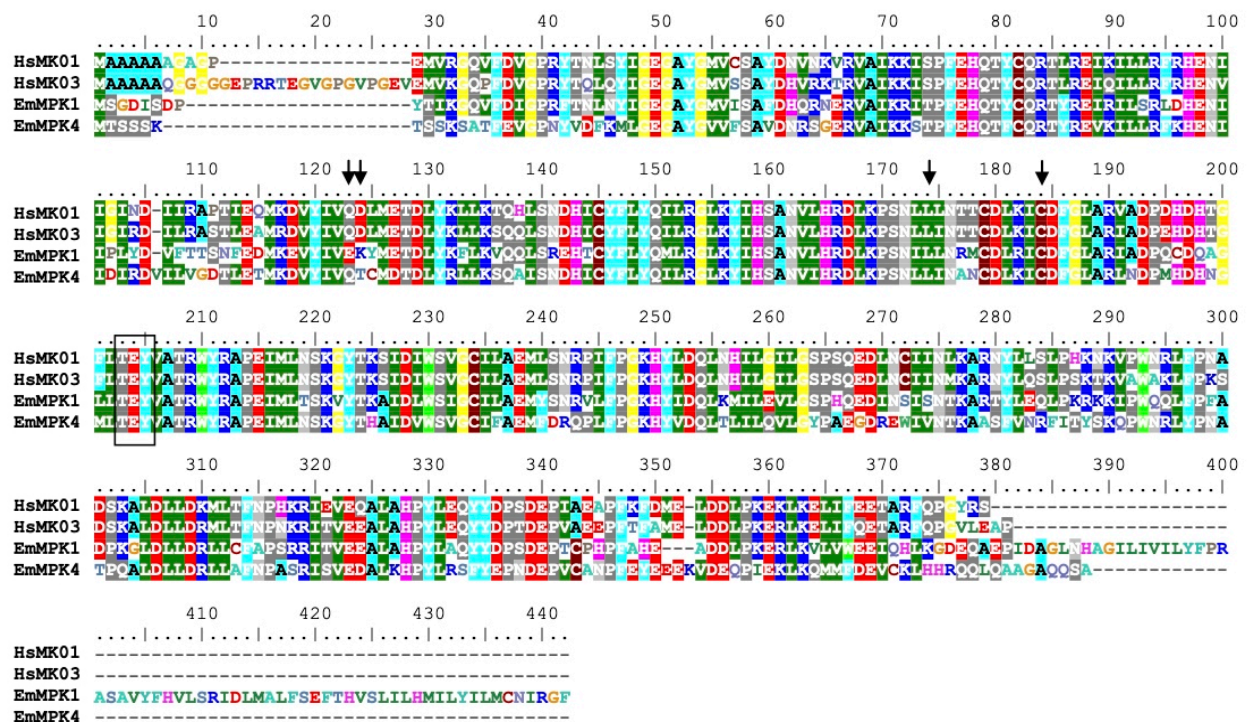
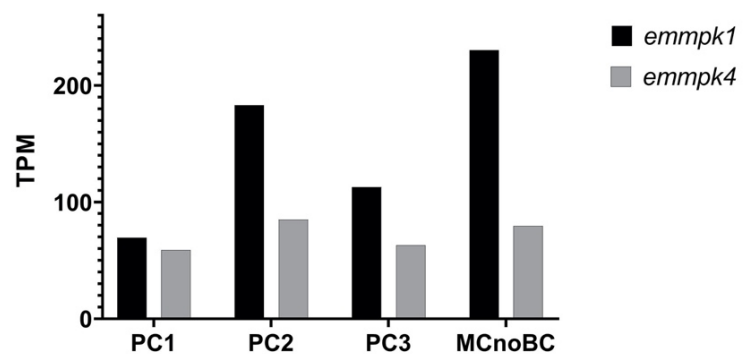


Abbildung 27 Sequenzvergleich der humanen ERK HsMK03 (Erk1) und HsMK01 (Erk2), sowie *Echinococcus*-ERK EmMPK1 (Erk1) und EmMPK4 (Erk2). Das Alignment der entsprechenden Sequenzen wurde mittels MUSCLE (Edgar 2004a; Edgar 2004b) erstellt. Umrahmt ist das für ERK charakteristische TEY-Motive. Pfeile kennzeichnen die Bindungsstellen des Inhibitors FR180204 (Ohori et al. 2005).

Für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika zur Behandlung der AE sind Angriffspunkte in Metacestoden, und hier vor allem in Stammzellen, vielversprechend (Koziol und Brehm 2015). Transkriptomdaten zeigen, dass *emmpk1* und *emmpk4* in Metacestoden und Primärzellkulturen unterschiedlichen Alters exprimiert werden (siehe Abbildung 28, (Herz 2019)). Dies ermöglicht die Testung des Inhibitors FR180204 in Zellkulturversuchen an Metacestoden und Primärzellen.

Abbildung 28 **Genexpression von *emmpk1* und *emmpk4* in *E. multilocularis*:** Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird in Transcripts Per Kilobase Million (tpm) angegeben. PC1-3: Primärzellen nach 2, 7 und 11 Tagen Kultur, MCnoBC: Metacestode ohne Brutkapseln



Zur Analyse der Auswirkung des Inhibitors FR180204 auf die Vitalität von Primärzellen wurden Resazurinassays an Primärzellkulturen der Isolate J2012 und H95 durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei einer FR180204-Konzentration von 120 $\mu$ M eine Signalintensität von 19143,7 fluorescence units (n=4 Versuche, SD=4942,9 fluorescence units), bei der Negativkontrolle 26107,6 fluorescence units (n=4 Versuche, SD=3346,7 fluorescence units). Die Reduktion ist signifikant (p=0,029) und beträgt in vorliegenden Versuchsreihen ca. 27% (siehe Abbildung 29).

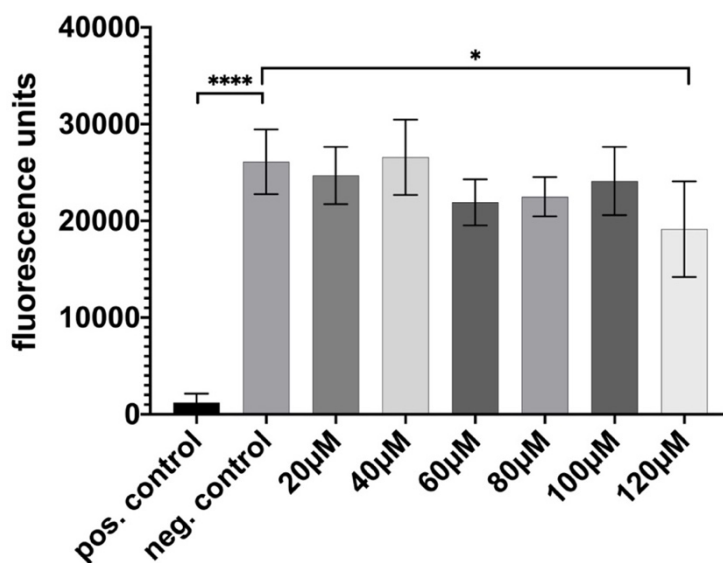
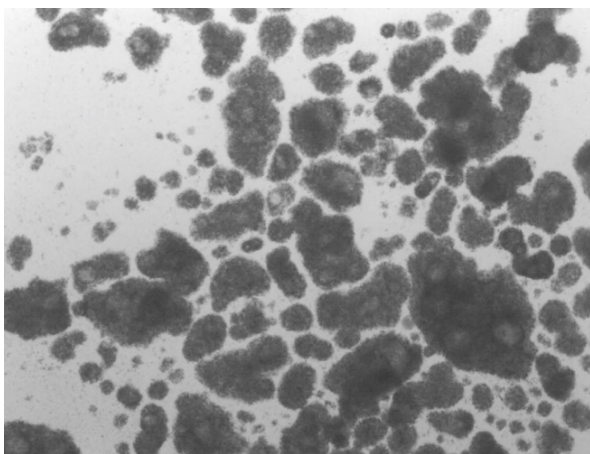


Abbildung 29 **Konzentrationsabhängiges Zellüberleben von Primärzellen mit Zusatz von FR180204.** Primärzellen von Metacestoden des Isolats J2012 und H95 wurden in 96-well-Platten mit A7-Medium und in DMSO gelöstem Inhibitor verschiedener Konzentrationen versetzt. Als Positivkontrolle wurde 1% Triton und als Negativkontrolle A7-Medium mit DMSO verwendet. Nach fünf Tagen wurden die Zellen für drei Stunden mit Resazurin inkubiert und die Fluoreszenz bei 540nm gemessen. Es wurden Triplikate verwendet, deren basislinienkorrigierte Mittelwerte in die statistische Auswertung mittels one way ANOVA eingingen. Die Balken indizieren die Standardabweichung. Signifikanzniveau (\*\*\*\*) < 0,0001, (\*) = 0,029; n=4

Zur Erfassung von langfristigen Auswirkungen auf Primärzellkulturen in Hinblick auf das Überleben und die Formation neuer Metacestodenvesikel wurden Primärzellen aus Metacestoden von J2012 und H95 über mehrere Wochen mit dem Inhibitor FR180204 in Konzentrationen von  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  und  $100\mu\text{M}$  inkubiert und die Entwicklung lichtmikroskopisch verfolgt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Trotz eingeschränkter Beurteilbarkeit der Zellen bei  $100\mu\text{M}$  FR180204 aufgrund von starker Aggregatbildung ließ sich nach zwei Wochen unter allen Konditionen eine Vesikelentstehung beobachten und sich mikroskopisch keine deutliche Veränderung der Zellmorphologie objektivieren (siehe Abbildung 30). Aufgrund einer zunehmenden Präzipitation des Inhibitors bei einer Konzentration von  $100\mu\text{M}$  musste der Versuch nach drei Wochen beendet werden.



Kontrolle

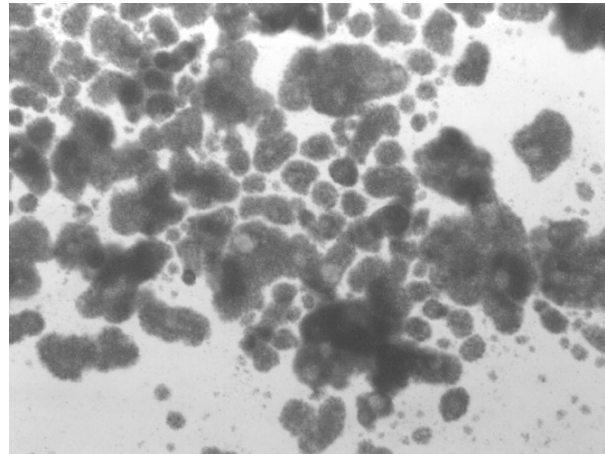
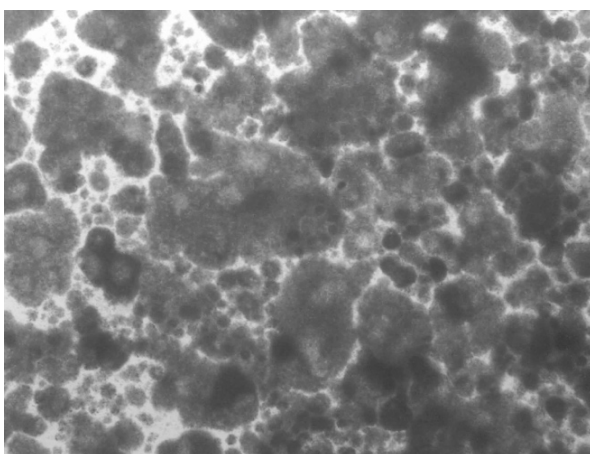
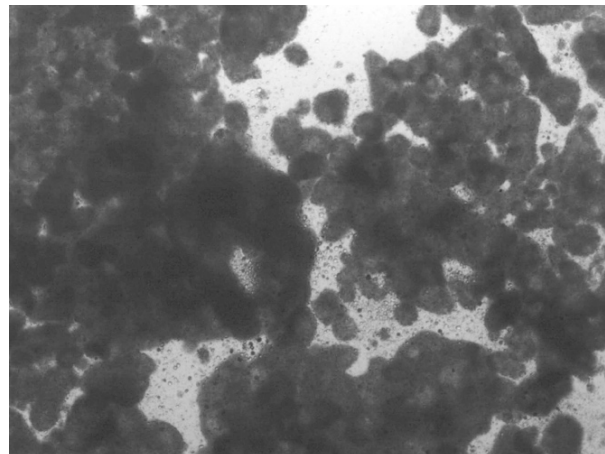
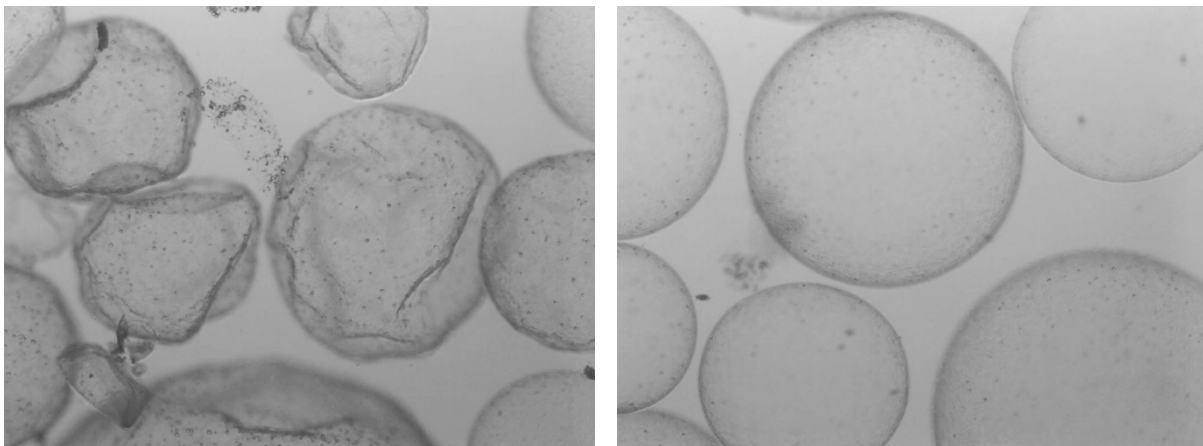
 $1\mu\text{M}$  FR180204c $10\mu\text{M}$  FR180204c $100\mu\text{M}$  FR180204c

Abbildung 30 **FR180204 zeigt keinen Effekt auf die Bildung von Metacestodenvesikel in Primärzellkulturen.** Primärzellen stammen von Metacestoden des Isolats J2012 und wurden in 24-well-Platten mit A7-Medium und in DMSO gelöstem Inhibitor der Konzentration  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  und  $100\mu\text{M}$  ausgesät. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und die Vesikelformation lichtmikroskopisch beurteilt. Als Kontrolle wurde A7-Medium mit reinem DMSO verwendet. Die Fotos entstammen Tag 14.

Darüber hinaus wurden Inhibitorstudien an Metacestodenvesikeln durchgeführt, um Einflüsse des Inhibitors auf Metacestodenintegrität und den Stammzellanteil zu untersuchen. Hierzu wurden Vesikel der Isolate RD15 und Suma mit 100 $\mu$ M FR180204 inkubiert und ihre Entwicklung lichtmikroskopisch verfolgt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Nach einer Woche zeigte sich bereits ein deutliches Absterben der Vesikel in der Kontrollgruppe, während die mit 100 $\mu$ M inkubierten Vesikel alle intakt waren (siehe Abbildung 31). Darüber hinaus zeigten diese Vesikel im Verlauf eine deutlich größere Umfangszunahme und eine erhöhte Bildungsrate neuer Vesikel. Nach zwei Wochen waren in der Kontrollgruppe alle Vesikel abgestorben, während sich bei der Interventionsgruppe der Großteil der Vesikel unversehrt zeigte. Aufgrund einer zunehmenden Präzipitation des Inhibitors an den Vesikeln musste der Versuch nach zwei Wochen abgebrochen werden.



Kontrolle

100 $\mu$ M FR180204c

Abbildung 31 **FR180204 zeigt einen protektiven Effekt auf die Integrität von Metacestodenvesikel.** Vesikel stammen von Isolat RD15 und wurden in 24-well-Platten mit A7-Medium, reduzierenden Reagenzien und 100 $\mu$ M in DMSO gelöstem Inhibitor ausgesät. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und die Integrität lichtmikroskopisch beurteilt. Als Kontrolle wurde A7-Medium mit reinem DMSO verwendet. Die Fotos entstammen Tag 8.

Um etwaige Auswirkungen des Inhibitors auf den prozentualen Stammzellgehalt in Metacestodenvesikeln detektieren zu können, wurden Vesikel des Isolats Suma mit 100 $\mu$ M FR180204 oder DMSO als Kontrolle inkubiert und nach neun Tagen proliferierende Zellen in den Vesikeln mit EdU gekennzeichnet, eine EdU-Detektion durchgeführt und der Anteil EdU-eingelagerter Zellen (EdU+) unter dem Konfokalmikroskop analysiert (siehe Abbildung 32). Im vorliegenden Versuch lag der Anteil EdU+ Zellen in mit Inhibitor inkubierten Vesikeln bei 5,7% (95% CI [3,9; 8,3], n=6720 Zellen) und in den Kontrollvesikeln bei 5,9% (95% CI [4,7; 6,8], n=6382 Zellen) (siehe Abbildung 33). Der Unterschied erwies sich im Mann-Whitney-Test als nicht signifikant.

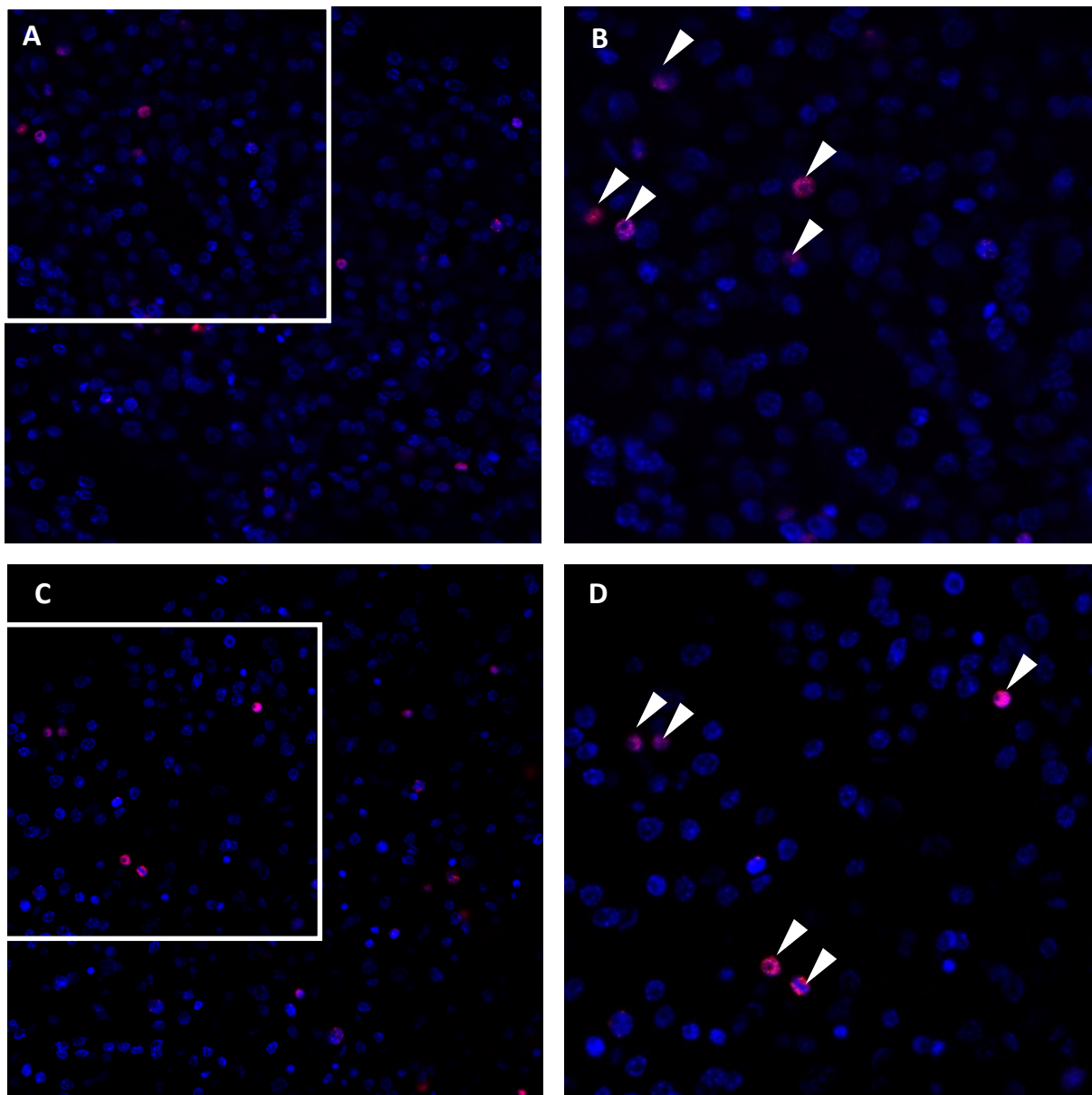


Abbildung 32 **Kennzeichnung proliferierender Zellen in Metacystoden nach Inkubation mit 100µM FR180204.** Vesikel von Isolat Suma wurden mit A7-Medium, reduzierenden Reagenzien und 100µM in DMSO gelöstem Inhibitor bzw. DMSO als Kontrolle ausgesät. An Tag 9 wurden die Vesikel 5h mit 50 µM EdU inkubiert, eine EdU Detection durchgeführt und mit Hilfe des Konfokalmikroskop der Anteil Edu+ Zellen ausgewertet. A und B zeigen einen Interventions-, C und D einen Kontrollvesikel – jeweils in Übersicht und Detail. Edu+ Zellen sind mit ausgefüllten Pfeilen gekennzeichnet.

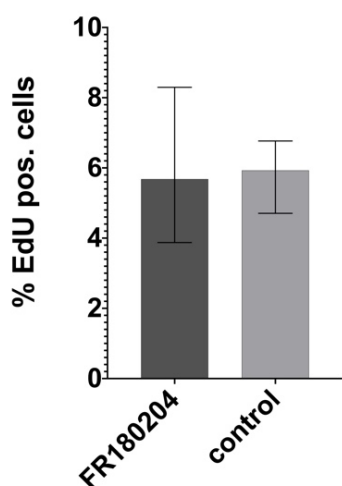


Abbildung 33 **Anteil proliferierender Zellen in Metacystoden nach Inkubation mit 100µM FR180204.** Vesikel von Isolat Suma wurden mit A7-Medium, reduzierenden Reagenzien und 100µM in DMSO gelöstem Inhibitor bzw. DMSO als Kontrolle ausgesät. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. An Tag 9 wurden die Vesikel 5h mit 50 µM EdU inkubiert, eine EdU Detection durchgeführt und mit Hilfe des Konfokalmikroskop der Anteil Edu+ Zellen in je 12 Vesikeln ausgewertet. Die Balken indizieren das 95% Konfidenzintervall.

### 3.4.2 Effekte des Multikinaseinhibitors Dasatinib auf *E. multilocularis*

Zusätzlich zu den Studien über eine selektive Inhibition des ERK-Signalwegs in *E. multilocularis* wurden die Auswirkungen einer Multikinaseinhibition auf Primärzellen und Metacestoden getestet. Da bereits in Studien ein hohes antiparasitäres Potenzial von Imatinib gezeigt werden konnte (Hemer und Brehm 2012), wurde für die aktuellen Assays aufgrund seiner ähnlichen Angriffspunkte der Inhibitor Dasatinib ausgewählt (Das et al. 2006; Davis et al. 2011).

Analog zu den Studien über die Auswirkung von FR180204 auf Primärzellen wurden Resazurinassays an Primärzellkulturen des Isolats J2012 durchgeführt, die mit Dasatinib verschiedener Konzentration inkubiert wurden. Schon nach zwei Tagen zeigt sich eine Reduktion der Signalintensität bei 100 $\mu$ M Dasatinib (3255,8 fluorescence units; n=3 Versuche, SD=2123,6 fluorescence units) um ca. 82% im Vergleich zur Negativkontrolle (23740,1 fluorescence units; n=3 Versuche, SD= 2770,9 fluorescence units). Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen konnte bei 100 $\mu$ M Dasatinib kein Fluoreszenzsignal mehr detektiert werden und bei 50 $\mu$ M Dasatinib (6829,4 fluorescence units; n=3 Versuche, SD= 2985,01 fluorescence units) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (27840,9 fluorescence units; n=3 Versuche, SD= 2642,3 fluorescence units) eine Reduktion der Signalstärke um ca. 77% (siehe Abbildung 34). Eine statistische Analyse der Fluoreszenzwerte bestätigte diese Ergebnisse als hochsignifikant ( $p \leq 0,0002$ ).

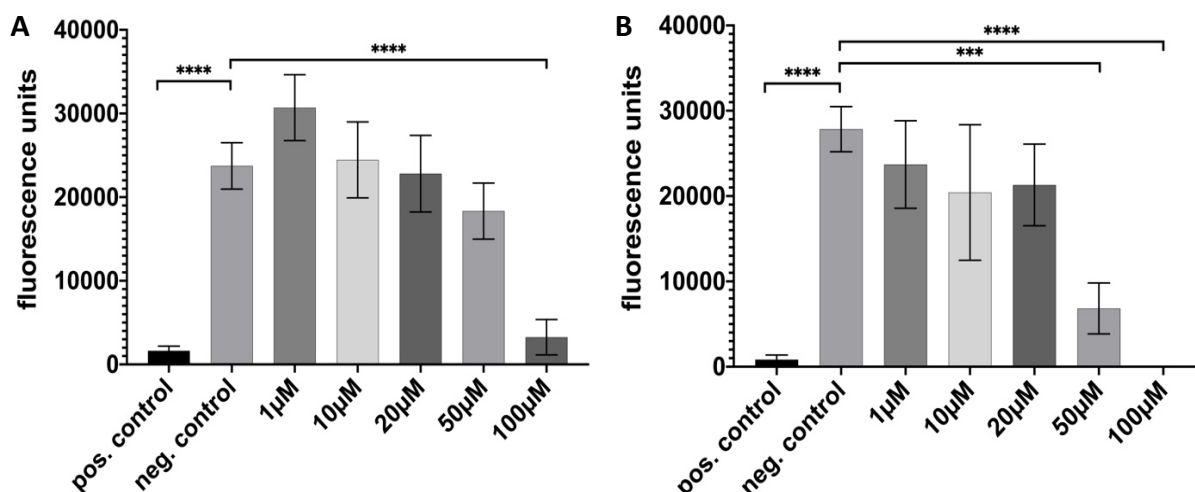


Abbildung 34 Zeit- und Konzentrationsabhängiges Zellüberleben von Primärzellen mit Zusatz von Dasatinib. Primärzellen von Metacestoden des Isolats J2012 wurden in 96-well-Platten mit A7-Medium und in DMSO gelöstem Inhibitor verschiedener Konzentrationen versetzt. Als Positivkontrolle wurde 1% Triton und als Negativkontrolle A7-Medium mit DMSO verwendet. Nach zwei (A) bzw. fünf (B) Tagen wurden die Zellen für drei Stunden mit Resazurin inkubiert und die Fluoreszenz bei 540nm gemessen. Es wurden Triplikate verwendet, deren basislinienkorrigierte Mittelwerte in die statistische Auswertung mittels one way ANOVA eingingen. Die Balken indizieren die Standardabweichung. Signifikanzniveau (\*\*\*\*) < 0,0001, (\*\*\*) = 0,0002; n=3 Versuche



Die Auswirkungen des Inhibitors Dasatinib auf Metacestodenvesikel wurden ebenfalls mittels Zellkulturversuche untersucht. Hierzu wurden Vesikel der Isolate H95 und J2012 mit 50 $\mu$ M und 100 $\mu$ M Dasatinib inkubiert und ihre Entwicklung lichtmikroskopisch verfolgt. Bereits nach zwei Tagen ließen sich mikroskopisch kleine Defekte in den Vesikeln der Wells mit 100 $\mu$ M Dasatinib erkennen, ein Vesikel war bereits kollabiert. Nach einer Woche waren alle Vesikel nach Inkubation mit 100 $\mu$ M Dasatinib abgestorben, die Vesikel mit 50 $\mu$ M zeigten Defekte in ihrer Oberfläche (siehe Abbildung 35).

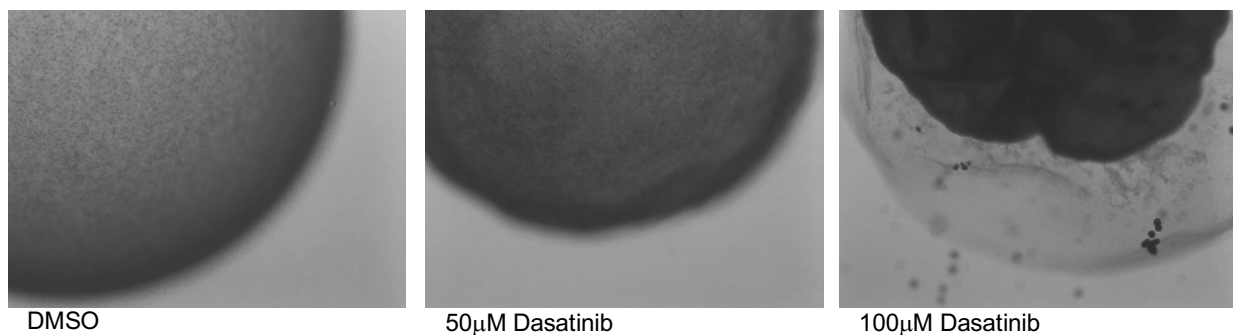


Abbildung 35 **Dasatinib hat einen negativen Einfluss auf die Integrität von Metacestodenvesikel.** Vesikel stammen von Isolat H95 und wurden in 12-Well-Platten mit A7-Medium und 50 $\mu$ M bzw. 100 $\mu$ M in DMSO gelöstem Inhibitor ausgesät. Dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt und die Integrität lichtmikroskopisch beurteilt. Als Kontrolle wurde A7-Medium mit reinem DMSO verwendet. Die Fotos entstammen Tag 5.

In den vorliegenden Studien zum Einfluss selektiver und Multi-Kinaseinhibitoren auf *E. multilocularis* wurden die Auswirkungen des selektiven ERK-Kinaseinhibitors FR180204 und des Multikinaseinhibitors Dasatinib auf Primärzellen und Metacestoden getestet. Ab 120 $\mu$ M FR180204 konnte eine signifikante Zellzahlreduktion von Primärzellen gezeigt werden. Mikroskopisch zeigten sich bis 100 $\mu$ M FR180204 keine Effekte auf die Morphologie von Primärzellkulturen oder auf den Anteil proliferierender Zellen in Metacestoden. Versuche an Metacestodenkulturen lassen lichtmikroskopisch auf einen positiven Effekt von 100 $\mu$ M FR180204 auf die Integrität von Vesikeln schließen. Dasatinib führte ab einer Konzentration von 50 $\mu$ M zu einer signifikanten Zellzahlreduktion von Primärzellen und zur zunehmenden Schädigung und konsekutiven Abtötung von Metacestodenvesikeln.

### 3.5 RNAi-Studien am ERK-Signalweg von *E. multilocularis*

Um genauere Aussagen über die Funktion des ERK-Signalwegs in *E. multilocularis* treffen zu können wurden einzelne Gene dieser Kaskade mittels RNAi herunterreguliert. Hierzu wurden in mehreren Versuchsreihen Primärzellen aus Metacestoden-vesikeln isoliert, diese mit siRNA elektroporiert (=Interventionsgruppen) und mit Medium in 24-Well-Platten ausgesät und die Entwicklung lichtmikroskopisch beobachtet. Als Kontrollgruppen wurde eine Negativkontrolle ohne siRNA und einer GFP-Kontrolle mit GFP-siRNA mitgeführt. Die RNAi-Untersuchungen wurden nach vorher beschriebenen Protokollen (Spiliotis et al. 2010) durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe 0 wurden Versuche mit *emmkkk1*-siRNA (siRNA Mekk1) am Isolat H95 durchgeführt. Leider zeigten sich die Primärzellen nach der Elektroporation in einem schlechten Zustand mit sehr geringer Aggregatbildung und vielen Kalziumkörperchen, sodass der Versuch nicht lichtmikroskopisch ausgewertet und das Versuchsprotokoll an einigen Stellen modifiziert wurde: Analog zu M. Spiliotis (Spiliotis et al. 2010) wurde vor der Primärzellisolation keine Axenisierung der Vesikel unternommen, sondern zusätzliche Waschschrte in das Protokoll eingefügt. Ebenso wurden weitere Zentrifugationsschritte während der Primärzellisolation durchgeführt, um den Anteil von Kalziumkörperchen in der Zellsuspension und somit subsequeute Fehler in der Abschätzung der Zellzahl mittels Spektrophotometrie zu reduzieren. Zudem wurde statt dem – teils eingefrorenen – A7-Medium stets frisches A7-/B4-Medium verwendet. Auch die zusätzliche Resuspension der Pellets in 500µl PBS und 500µl EB in Vorbereitung auf die Elektroporation wurde aus dem Protokoll entfernt. Nach diesen Modifikationen zeigte sich ein deutlich besserer Zustand der Primärzellen nach der Elektroporation und eine bessere Entwicklung der Zellen im Verlauf. Darüber hinaus wurde als Negativkontrolle PBS durch ampupa ersetzt, um durch eine Äquivalenz der Salzwerte eine höhere Vergleichbarkeit der Kontrolle mit den Proben zu gewährleisten. Für alle weiteren Versuchsreihen wurden Primärzellen des Isolats GH09 verwendet und die Zellen nach fünf Tagen einmalig resuspendiert, um große Aggregate aufzubrechen und entstehende Vesikel dadurch besser detektieren zu können.

Vorhergehende Protein-Protein-Interaktionsassays haben die potenzielle Beteiligung von EmMKKK1 nicht nur im ERK-, sondern auch im JNK-Signalweg gezeigt (siehe Abschnitt 3.3). Die RNAi-Studien wurden daher um Versuche mit *emmpk1*-siRNA (siRNA Erk1) und *emmpk4*-siRNA (siRNA Erk2) erweitert, um Daten speziell über den

ERK-Signalweg zu generieren. So wurde in Versuchsreihe 1 und Versuchsreihe 3 siRNA für *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* verwendet.

In Versuchsreihe 2 wurde in einem Ansatz mit *emmpk1*-siRNA und *emmpk4*-siRNA und einer Kombinations-Elektroporation mit *emmpk1*- und *emmpk4*-siRNA die Auswirkungen der kombinierten Herunterregulation dieser beiden Gene getestet. Leider wurde hier während des Versuchs das Medium von A7 auf A7/B4 gewechselt und es zeigte sich im Verlauf eine zunehmende Verunreinigung der Zellversuche mit RH- Zellen, sodass dieser Versuch nur eine eingeschränkte Aussagekraft aufweist und nicht lichtmikroskopisch ausgewertet wurde.

### 3.5.1 Überprüfung der erfolgreichen Genherunterregulation mittels qPCR

Als Marker für eine erfolgreiche Herunterregulation der Gene wurde das entsprechende mRNA-Level im Vergleich zur GFP-Kontrolle mittels qPCR analysiert. Für die qPCR von *emmkkk1* wurden die Primer qPCR\_Mekk1\_dw2 und qPCR\_Mekk1\_up2 bei einer Temperatur von 62°C, für *emmpk1* die Primer qPCR\_Erk1\_dw und qPCR\_Erk1\_up bei 60°C und für *emmpk4* die Primer qPCR\_Erk2\_dw und qPCR\_Erk2\_up ebenfalls bei 60°C verwendet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde RNA aus je einem Well pro entsprechender Interventions- bzw. Kontrollgruppe isoliert, in cDNA umgeschrieben und basierend auf qPCR-Daten eine erfolgreiche Herunterregulation als Ausdruck des mRNA-Levels des entsprechenden Gens in der Interventions- im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe überprüft. Die Daten an Tag zwei entstammen bei *emmpk1* und *emmpk4* der Versuchsreihe 1 (Isolat GH09), bei *emmkkk1* der Versuchsreihe 0 (Isolat H95), da die qPCR-Daten aus Versuchsreihe 1 für *emmkkk1* aufgrund starker Abweichungen der technischen Triplikate nicht für die Auswertung verwendet werden konnten. Die Daten an Tag sieben beziehen sich bei *emmkkk1* auf die Versuchsreihe 3 (Isolat GH09), bei *emmpk1* und *emmpk4* auf die Versuchsreihe 2 (Isolat GH09). Bei *emmpk1* wurde allerdings auch in der Negativkontrolle mit Wasser eine Genamplifikation beobachtet. Aufgrund des Zyklusabstands von über sieben Zyklen zwischen der Amplifikation in dieser Negativkontrolle und den Proben wurden die Ergebnisse trotzdem in die Auswertung mit aufgenommen.

Bei allen drei Genen konnte zwei Tage nach der Elektroporation eine Reduktion des mRNA-Levels auf unter 60% beobachtet werden: Bei *emmkkk1* auf 26%, bei *emmpk1* auf 51% und bei *emmpk4* auf 56%. Nach sieben Tagen zeigte sich bei *emmpk4* eine weitere Reduktion des mRNA-Levels auf 22%, während es bei *emmpk1* zu einer leichten Zunahme auf 62% und bei *emmkkk1* zu einer Rückkehr des mRNA-Levels auf Ausgangsniveau kam (siehe Abbildung 36).

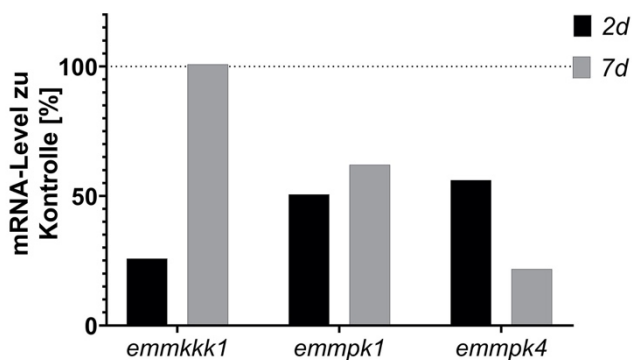


Abbildung 36 **Zeitabhängiger Effekt von siRNA auf das mRNA-Level von *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4*.** *Echinococcus*-Primärzellen wurden mit siRNA gegen *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* behandelt. Nach zwei und sieben Tagen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und basierend auf qPCR-Daten das mRNA-Level der entsprechenden Gene zwischen Interventions- und GFP-Kontrolle – auf das Housekeeping-Gen *emelp* normalisiert – verglichen.

Auch bei der Kombination der siRNA von *emmpk1* und *emmpk4* konnte nach sieben Tagen eine Herunterregulation des entsprechenden Gens auf 49% bzw. 18% – analog zu den Effekten einzelner siRNA-Behandlung – erreicht werden (siehe Abbildung 37).

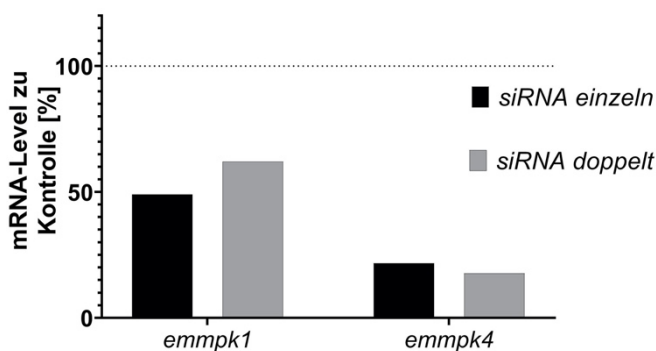


Abbildung 37 **Effekt von siRNA einzeln und in Kombination auf das mRNA-Level von *emmpk1* und *emmpk4*.** *Echinococcus*-Primärzellen wurden mit siRNA gegen *emmpk1* oder *emmpk4* oder einer Kombination beider siRNA behandelt. Nach 7 Tagen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und basierend auf qPCR-Daten das mRNA-Level der entsprechenden Gene zwischen Interventions- und GFP-Kontrolle – auf das Housekeeping-Gen *emelp* normalisiert – verglichen.

### 3.5.2 Langzeiteffekte der Herunterregulation der Genexpression

In beiden Versuchsreihen (1 und 3) konnten nach vier bis fünf Tagen in allen Zellpopulationen sog. Red Dots, rot/orange Inklusionen in der Mitte von kleinen Zellaggregaten, detektiert werden (siehe weiße Pfeile in Abbildung 38). Eine Vesikelentstehung konnte in der Versuchreihe 1 bei *emmpk1* nach sechs Tagen, bei GFP nach acht Tagen beobachtet werden (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 38). Bei der Negativkontrolle und *emmkkk1* ließen sich nach elf Tagen, bei *emmpk4* nach 13 Tagen deutlich Vesikel erkennen.

In der Versuchsreihe 3 konnten bei *emmkkk1* bereits nach fünf Tagen Vesikel detektiert werden. An Tag neun wurden die ersten entstehenden Vesikel in den beiden Kontrollgruppen und an Tag 14 in den Interventionsgruppen *emmpk1* und *emmpk4* entdeckt.

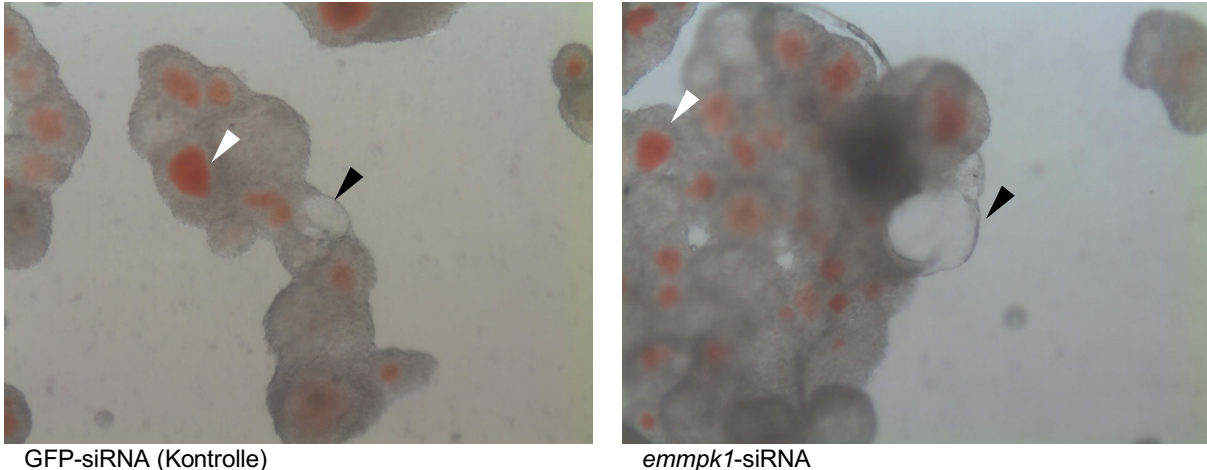


Abbildung 38 **Red Dots und Vesikelbildung bei RNAi an Primärzellen.** *Echinococcus*-Primärzellen des Isolats GH09 wurden mit siRNA gegen *emmpk1* elektroporiert und in einer 24-Well-Platte mit A7-/B4-Medium inkubiert. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und die Entwicklung lichtmikroskopisch beurteilt. Als Kontrolle wurde GFP-siRNA verwendet. Nach acht Tagen zeigt sich bei beiden Zellpopulationen die Entstehung von Vesikeln (schwarze Pfeile). Weiße Pfeile markieren zwei Red Dots. Vergrößerung 5x.

Im Versuchsverlauf bildeten sich in einigen Zellpopulationen Ansammlungen vieler Vesikel, die besonders groß erschienen (siehe weiße Pfeile in Abbildung 39) und teils orange gefärbten Inhalt besaßen (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 39). In Versuchsreihe 1 setzte dies bei *emmpk1* an Tag 13, bei *emmkkk1* und GFP an Tag 18 ein. In Versuchsreihe 3 wurde dieses Phänomen bei *emmpk1* an Tag 19, bei den Negativkontrollen an Tag 21 und bei GFP und *emmkkk1* an Tag 25 deutlich sichtbar. Insgesamt scheint dieses Phänomen allerdings in den Kontrollgruppen etwas geringer ausgeprägt zu sein als bei *emmpk1*. Bei *emmpk4* konnte eine damit vergleichbare Entwicklung lichtmikroskopisch nicht detektiert werden. Nach ca. vier Wochen kam es zu einer zunehmenden Degeneration der Zellen, sodass die Versuchsreihen beendet wurde.

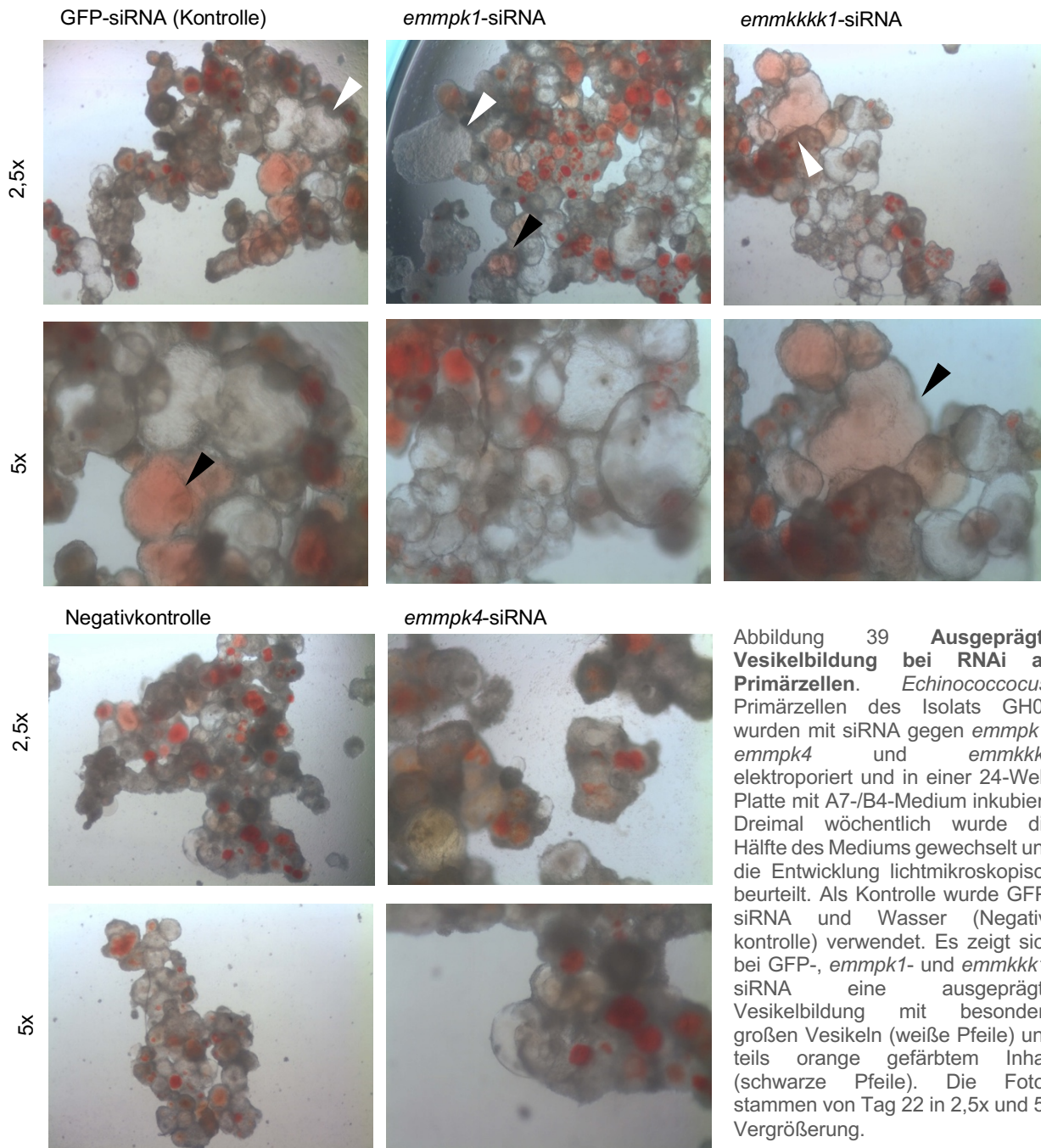


Abbildung 39 **Ausgeprägte Vesikelbildung bei RNAi an Primärzellen.** *Echinococcus*-Primärzellen des Isolats GH09 wurden mit siRNA gegen *emmpk1*, *emmpk4* und *emmkkk1* elektroporiert und in einer 24-Well-Platte mit A7-/B4-Medium inkubiert. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und die Entwicklung lichtmikroskopisch beurteilt. Als Kontrolle wurde GFP-siRNA und Wasser (Negativkontrolle) verwendet. Es zeigt sich bei GFP-, *emmpk1*- und *emmkkk1*-siRNA eine ausgeprägte Vesikelbildung mit besonders großen Vesikeln (weiße Pfeile) und teils orange gefärbtem Inhalt (schwarze Pfeile). Die Fotos stammen von Tag 22 in 2,5x und 5x Vergrößerung.

Um die vermeintlichen Unterschiede in der Vesikelgröße besser quantifizieren zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fotografische Gesamtwell-Aufnahmen gemacht und der Durchmesser der jeweils fünf größten Vesikel manuell vermessen. Bereits nach zwei Wochen lassen sich nach Herunterregulation von *emmpk1* im Vergleich zu beiden Kontrollen signifikant größere Vesikel verzeichnen. Im Mittel lagen die fünf größten Vesikel bei *emmpk1* bei 0,44mm (SD=0,23mm, n=20), während sie bei den Kontrollen bei 0,32mm (SD=0,11; n=24) für GFP und bei 0,34mm (SD=0,08mm; n=24) für die Negativkontrolle lagen. Für *emmkkk1* lag der Mittelwert bei 0,34mm (SD=0,11; n=20) und für *emmpk4* bei 0,27mm (SD=0,10; n=20) (siehe Abbildung 40 A).

Nach vier Wochen hatten die jeweils fünf größten Vesikel bei Behandlung mit *emmkkk1*-siRNA einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,58mm (SD=0,26mm; n=20), *emmpk1*-siRNA einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,79mm (SD=0,35mm; n=20), bei Behandlung mit *emmpk4*-siRNA von 0,35mm (SD=0,08mm; n=20), bei der Kontrolle mit GFP-siRNA 0,45mm (SD=0,16mm; n=24) und bei der Negativkontrolle 0,38mm (SD=0,09mm; n=24). Die Unterschiede zwischen *emmpk1*-siRNA und den Kontrollen, sowie *emmkkk1*-siRNA und GFP-siRNA sind statistisch signifikant (siehe Abbildung 40 B).

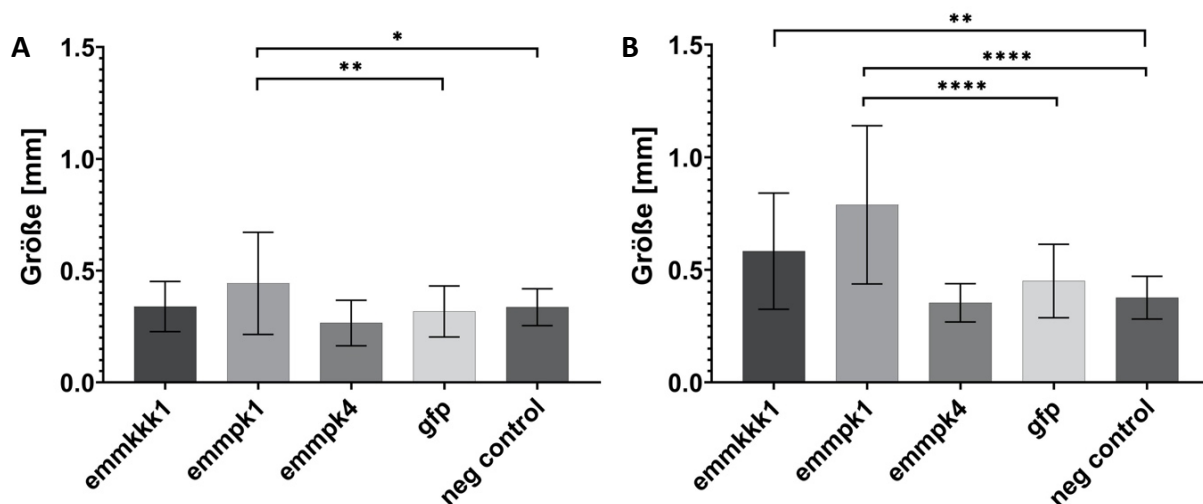


Abbildung 40 **Maximale Vesikelgröße bei RNAi an Primärzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.** *Echinococcus*-Primärzellen des Isolats GH09 wurden mit siRNA gegen *emmpk1*, *emmpk4* und *emmkkk1* elektroporiert und in einer 24-Well-Platte mit A7-/B4-Medium inkubiert. Dreimal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und nach zwei (A), drei und vier (B) Wochen der Durchmesser der jeweils fünf größten Vesikel pro Well manuell anhand von Fotoaufnahmen gemessen und mittels one-way ANOVA auf ihre Signifikanz überprüft. Als Kontrolle wurde GFP-siRNA und Wasser (Negativkontrolle) verwendet. Versuche wurden zweifach, je als Duplikate (Intervention) bzw. Triplikate (Kontrollen) durchgeführt. *Emmpk1*-siRNA führt im Vergleich zu beiden Kontrollen sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen Inkubationszeit zu signifikant größeren Vesikeln im Vergleich zu beiden Kontrollen, *emmkkk1*-siRNA führt nach vier Wochen zu signifikant größeren Vesikeln im Vergleich zur Negativkontrolle. Signifikanzniveau (\*)  $\leq 0,0368$ , (\*\*)  $\leq 0,01$ , (\*\*\*\*)  $< 0,0001$ . Balken indizieren Standardabweichung.

### 3.5.3 Auswirkungen der RNAi auf Genexpression von *emmucin7429*

Aufgrund der begrenzten Aussagekraft von mikroskopischen Beobachtungen in Hinblick auf die Proliferation von Primärzellen wurde nach möglichen Ansätzen zur besseren Quantifizierung der Vesikelentstehung und -größe gesucht. Vergleiche der Transkriptomdaten von *emmucin7429* (EmuJ\_000742900) unterschiedlicher *Echinococcus*-Entwicklungsstadien zeigen, dass die Expression dieses Gens in Metacestoden um ein Vielfaches höher ist als in Primärzellen unterschiedlichen Alters (siehe Abbildung 41, (Herz 2019)). Somit erschien *emmucin7429* ein vielversprechender Marker zur Quantifizierung der Metacestodenbildung in vorliegenden Versuchen zu sein.

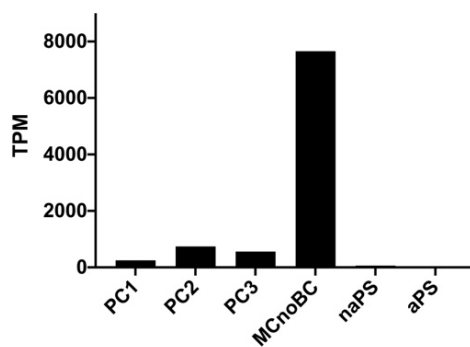


Abbildung 41 **Genexpression von *emmucin7429* in *E. multilocularis***: Transkriptomdaten wurden Datensätzen von M. Herz entnommen (Herz 2019). Die Expression wird in Transcripts Per Kilobase Million (tpm) angegeben. PC 1-3: Primärzellen nach 2, 7 und 11 Tagen Kultur, MCnoBC: Metacystode ohne Brutkapseln, naPS: nichtaktivierter Protoscolex, aPS: aktivierter Protoscolex

Nach Versuchsende (Tag 30 bzw. Tag 36) wurde mittels qPCR die Expression von *emmucin7429* in Zellen der Interventionsgruppen mit der GFP-Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund der geringen Zellanzahl/well wurden die Replikate zur RNA-Isolation gepoolt. Als Versuchsreihen wurden die RNAi-Studien am Isolat GH09 mit A7/B4-Medium (Versuch 1 und Versuch 3) verwendet. Für die entsprechende qPCR erwies sich in Vorversuchen die Paarung aus Muzin\_Dw2 und Muzin\_Up1 bei einer Temperatur von 61°C am besten geeignet. Da *emmucin7429* kein Intron besitzt musste im nächsten Schritt die aus den Proben isolierte RNA auf genomische Verunreinigungen überprüft werden und konnten dann erst in cDNA umgeschrieben werden. Im Mittel zeigte sich im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe bei Behandlung mit *emmkkk1*-siRNA eine erhöhte Genexpression von *emmucin7429* um 80% (n=2, SD= 48%), bei Behandlung mit *emmpk4*-siRNA eine leicht erhöhte Genexpression von *emmucin7429* um 15% (n=2, SD= 22%, Isolat GH09) und bei der Behandlung mit *emmpk1*-siRNA eine leicht reduzierte Genexpression um 7% (n=2, SD= 22%) (siehe Abbildung 42). Die Unterschiede erwiesen sich als nicht signifikant.

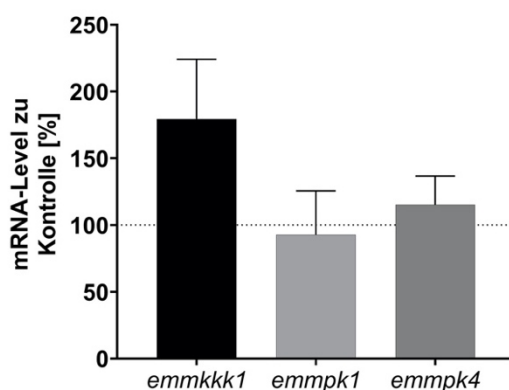


Abbildung 42 **Einfluss von siRNA auf das mRNA-Level von *emmucin7429***. *Echinococcus*-Primärzellen wurden mit siRNA gegen *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* behandelt. Nach einem Monat wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und basierend auf qPCR-Daten das mRNA-Level von *emmucin7429* zwischen Interventions- und GFP-Kontrolle – auf das Housekeeping-Gen *emelp* normalisiert – verglichen. Versuche wurden als Duplikate durchgeführt. Balken indizieren die Standardabweichung. Die Ergebnisse erwiesen sich im Mann-Whitney-U-Test als nicht signifikant.

Insgesamt konnte durch RNAi an Primärzellen die Expression von *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* auf 50% reduziert werden. Dies hatte in vorliegenden Versuchen keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen, sowie die prinzipielle Entstehung von Red Dots und Vesikeln. Bei *emmpk1* zeigte sich im Verlauf aber die Entstehung signifikant größerer Vesikel.



## 4 Diskussion

Die Regulation von Entwicklung und Homöostase bei Metazoen hängt von komplexen Zell-Zell-Kommunikationsmechanismen ab, deren Basis unter anderem Peptidhormone, Zytokine und entsprechende Rezeptortyrosinkinasen bilden. Als ein solches Signalsystem agieren MAPK-Module, die *E. multilocularis* zur Wachstums- und Entwicklungsregulation dienlich scheinen und vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Parasiten-Wirt-Interaktion besitzen (Brehm 2010b; Brehm und Koziol 2017). Basierend auf Daten von Planarien wird MAPK-Komponenten darüber hinaus eine Bedeutung bei der enormen Entwicklungsplastizität der *Echinococcus*-Stammzellen zugeschrieben (Brehm 2010b; Tasaki et al. 2011a; Tejada-Romero et al. 2015). Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen von MAPK-Komponenten und ihrem Potenzial als neuer Angriffspunkt einer chemotherapeutischen Therapie der AE besteht ein reges Forschungsinteresse daran, MAPK-Signalwege in *E. multilocularis* aufzudecken und mehr über ihre Funktionen im Parasiten zu erfahren (Brehm und Koziol 2017). So wurden in den letzten Jahren bereits einzelne MAPK-Komponenten von *E. multilocularis* charakterisiert (Brehm et al. 2006; Gelmedin et al. 2008; Gelmedin et al. 2010; Spiliotis et al. 2005), wenngleich noch viele Fragen unklar bleiben.

In der vorliegenden Arbeit konnten mit EmMKKK1 und neuen ERK- und JNK-Signalwegen zentrale Komponenten der komplexen MAPK-Signalkaskaden in *E. multilocularis* identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich einen Beitrag zur enormen Regenerationsfähigkeit der *Echinococcus*-Stammzellen leisten und vom Wirt abgeleitete Signale wie Insulin, EGF und FGF über EmGRB2 in Proliferationsnetzwerke des Parasiten integrieren.

### 4.1 Das komplexe MAPK-Netzwerk von *E. multilocularis*

#### 4.1.1 MAPK-Komponenten von *E. multilocularis*

In einem ersten Schritt wurde eine komplette bioinformatische Analyse von MAPK-Komponenten im Genom von *E. multilocularis* vorgenommen. Dabei konnten neben den bereits bekannten Proteinkinasen EmRaf (Spiliotis et al. 2005), EmMKK1 und EmMKK2 (Gelmedin et al. 2010), sowie EmMPK1 (Spiliotis et al. 2006) und EmMPK2 (Gelmedin et al. 2008) zehn weitere mutmaßliche MAP3K, drei weitere mutmaßliche MAP2K und vier weiterer mutmaßliche MAPK identifiziert werden. Unter den MAPK weist die EmMPK3 ein charakteristisches TPY-Phosphorylierungsmotiv auf und kann

somit der Gruppe der JNK zugeordnet werden (Krishna und Narang 2008). Folglich scheint sich das MAPK-Netzwerk von *E. multilocularis* neben den schon bekannten ERK- und p38-Signalwegen (Gelmedin et al. 2008; Spiliotis et al. 2006) auch in JNK-Signalwege zu gliedern. Diese Erkenntnisse decken sich mit bioinformatischen Studien an anderen Platyhelminthes, bei denen ebenfalls die Kodierung vieler verschiedener MAPK-Komponenten inklusive einer JNK im Genom gezeigt werden konnte (Almuedo-Castillo et al. 2014; Andrade et al. 2014; Wang et al. 2006). Besonders interessant ist die Identifizierung einer weiteren ERK von *E. multilocularis*, EmMPK4, mit charakteristischem TEY-Motiv, da mit EmMPK1 bis dato nur von einer im *Echinococcus*-Genom kodierten ERK ausgegangen wurde (Spiliotis et al. 2006). Während es im Zuge der Adaption an einen parasitären Lebensstil zu einer enormen Reduktion des Genommaterials gekommen ist (Brehm und Koziol 2017), deutet die nun aufgedeckte Vielzahl an MAPK-Komponenten auf ein komplexes Signaltransduktionssystem im Parasiten hin. Mit ihren humanen Homologen weisen diese Proteinkinasen, wie auch die Vertreter anderer Organismen (Craig et al. 2017; Wang et al. 2006), teils hohe Homologien auf, was die These der evolutionären Konservierung dieser Kaskadenmodule weiter bestätigt (Brehm 2010b). Phylogenetische Analysen zeigen aber auch die ausgesprochen hohen Homologien der *Echinococcus*-MAP3K EmMKKK6-10 untereinander, die sich möglicherweise erst in *E. multilocularis* durch Genduplikation gebildet haben.

Um die Expressionsmuster dieser Gene zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt Analysen von entsprechenden RNA-Sequenzierungsdaten durchgeführt. Diese indizieren, dass – bis auf bis auf *emmkkk9* und *emmkkk10* – alle dieser Proteinkinasen in Primärzellen, Metacestoden, Protoscolices und im adulten Wurm exprimiert werden (Herz 2019). Dies deckt sich mit bioinformatischen Studien an Schistosomen, bei denen ebenfalls die Expression von MAPK-Komponenten in nahezu allen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden konnte (Wang et al. 2006). Aufgrund dieser kontinuierlichen Expression von MAPK-Komponenten im parasitären Lebenszyklus kann von einer entscheidenden Bedeutung dieser Signalwege in ganz unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Lebensumständen ausgegangen werden.

Vorgenommene Analysen von RNA-Sequenzierungsdaten zeigten auch, dass *emmkkk1* als einzige MAP3K in besonderem Maße in Stammzellen von *E. multilocularis* exprimiert wird. Zur Validierung dieser Aussagen wurde die Expression

von *emmkkk1* in der vorliegenden Arbeit mittels WMISH in Metacestoden analysiert. Auch hier konnte die mRNA von *emmkkk1* im Großteil mitotischer Zellen detektiert werden. Da Stammzellen als einzige Zellart in *E. multilocularis* zur Zellteilung befähigt sind (Koziol et al. 2014), lässt dieser Befund auf die deutliche Expression von *emmkkk1* in Stammzellen schließen. Darüber hinaus wurde *emmkkk1* aber auch in postmitotischen Zellen exprimiert, dessen genaue Charakterisierung nicht eindeutig möglich war. Bei einem Stammzellanteil in der Metacestodengerminalschicht von 20-25% (Koziol und Brehm 2015) und einem Anteil *EdU+* Zellen von unter 10% in vorliegenden Versuchen bleibt unklar, ob es sich bei diesen postmitotischen Zellen ebenfalls um Stammzellen, die sich im Inkubationszeitraum nicht (mehr) in der Mitosephase befanden, oder um „Übergangszellen“ zwischen Stammzelle und fertig differenzierter Zelle handelt. Bei einem Anteil von *emmkkk1+* Zellen von unter 15% in den vorliegenden Versuchen wären beide Erklärungen denkbar. Um weitere Erkenntnisse über die Expression von *emmkkk1* in verschiedenen Stammzellsubpopulationen mit bekanntlich unterschiedlichen Genexpressionsmustern und Differenzierungsgraden (Brehm und Koziol 2017), sowie möglicherweise auch differenzierten Zellen zu gewinnen, wären zum Beispiel Doppel-WMISH mit Markern für verschiedene Zelltypen zielführend. Darüber hinaus würden Stapelaufnahmen der Metacestodeneskel und eine standardisierte Auswertung der Bilder die Detektion der Kollokalisierungen vereinfachen.

Zusammenfassend belegen die RNA-Sequenzierungs- und WMISH-Daten die Expression von *emmkkk1* in Stammzellen von *E. multilocularis*, wenn auch möglicherweise nicht ausschließlich. Diese Erkenntnisse decken sich mit ähnlichen Befunden an Neoplasten von Planarien (Hosoda et al. 2018).

#### 4.1.2 Gliederung der MAPK-Komponenten in Signalkaskaden

In einem nächsten Schritt wurden Protein-Protein-Interaktionsassays mittels eines Y2H-Ansatzes durchgeführt, um mehr über die Funktionsweise von MAPK Komponenten und insbesondere der MAP3K EmMKKK1 in *E. multilocularis* zu erfahren. So konnte in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von EmMKKK1 mit EmMKK3 und EmMKK3 mit EmMPK3 gezeigt und somit erstmals ein komplettes dreigliedriges Modul des JNK-Signalwegs in *E. multilocularis* beschrieben werden. Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus den phylogenetischen Analysen, in denen EmMKK3 höchste Homologien zur HsMP2K7 aufweist, die als Signaltransduktor im humanen JNK-Signalweg agiert. Anhand solcher phylogenetischen Nähe wäre analog

auch eine Beteiligung von EmMKK4 und EmMKK5 am JNK-Signalwegs in *E. multilocularis* denkbar, da dessen Kinasedomänen die höchsten Homologien zur HsMP2K4 aufweisen und diese im Menschen ebenfalls am JNK-Signalweg involviert ist. Eine weiterführende Untersuchung in dieser Richtung erscheint daher vielversprechend. Durch den Nachweis der Interaktion von EmMKK3 mit EmMPK4 ist außerdem die Beteiligung von EmMCKK1 am ERK-Signalweg wahrscheinlich, wie es auch in Planarien der Fall ist (Hosoda et al. 2018). Somit scheint EmMCKK1 analog zu seinem humanen Homolog am ERK- und JNK-Signalweg beteiligt sein, was vielfältige Funktionen dieses Gens in *E. multilocularis* vermuten lässt (Garrington und Johnson 1999; Xu und Cobb 1997). Mit der Interaktion von EmGrb2 mit EmMCKK1 konnte zudem ein potenzieller Upstream-Aktivator dieser Kaskaden identifiziert werden, der extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren in das intrazelluläre Signalsystem integrieren könnte (Pomerance et al. 1998). Darüber hinaus konnte eine Interaktion von EmMKK2 mit EmMPK4 nachgewiesen werden und EmMPK4 somit eine weitere mögliche Komponente des bereits bekannten Raf-ERK-Signalwegs in *E. multilocularis* darstellen. Um dies zu überprüfen, könnte in Anlehnung an frühere Studien (Gelmedin et al. 2010) überprüft werden, ob Raf-Inhibitoren (Bay43-9006 oder PD18 4352) zu einer Dephosphorylierung von EmMPK4 führen.

Die mittels Y2H-Assays aufgeklärten Interaktionen sind in der Literatur bereits bei anderen Organismen beschrieben und da Transkriptomdaten die Expression aller Interaktionspartner in den gleichen Stadien von *E. multilocularis* zeigen, auch physiologisch möglich. Dennoch ist die Aussagekraft derartiger Assays begrenzt, da vielfältige Faktoren wie posttranslationale Modifikationen, Voraktivierungen, benötigte Gerüstfaktoren, Komplexbildungen und Umgebungskonditionen die Abläufe *in vivo* beeinflussen und Interaktionen *in vitro* daher möglicherweise nicht realitätsgetreu reproduziert werden können (Garrington und Johnson 1999; Pearson et al. 2001; Wang et al. 2006). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum in hiesigen Versuchen eine direkte Bindung von EmMCKK1 mit EmAXIN6248, EmAXIN11412, EmRaf oder weiteren MAP2K und MAPK nicht gezeigt werden konnte, im Gegensatz zu publizierten Befunden der Signalabläufe im Menschen (Karandikar et al. 2000; Xu und Cobb 1997; Zhang et al. 1999). Ein weiterer Grund könnte auch die Tatsache sein, dass Kinasen nach der Phosphorylierungsreaktion die Bindung zu ihren Substraten verlieren und in vorliegender Arbeit keine mutierten Kinasedomänen verwendet wurden, um dies zu verhindern. So hätte man anhand bekannter Interaktionen auch

erwartet, dass die im 3'-Anteil der EmMKKK1 enthaltene Kinasedomäne in Y2H-Assays ebenfalls Interaktionen zeigt, was in vorliegender Arbeit nicht der Fall war. Dies könnte zum Einen daran liegen, dass aufgrund der Länge des Proteins jeweils nur ein Abschnitt der Kinase in Interaktionsassays getestet werden konnte und daher die räumliche Struktur verändert vorlag. Zum Anderen verändert, wie bereits erwähnt, der Phosphorylierungsstatus die Aktivität und Interaktion der Kinasen. Weiterführende Untersuchungen von EmMKKK1 mit inaktiverter Kinasedomäne konnten allerdings leider im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Denkbar ist natürlich auch eine andere Organisation der MAPK-Kaskaden in *E. multilocularis*. Zudem ist die Aktivierung von MAPK-Komponenten und ihre konsekutive Signalvermittlung selbstverständlich auch von Dauer und Stärke der Phosphorylierung abhängig, bei der unter anderem Phosphatasen und Feedbackmechanismen eine wichtige Rolle spielen (Garrington und Johnson 1999; Pearson et al. 2001; Wang et al. 2006). Insgesamt sind also weitere Untersuchungen nötig, um die Ergebnisse der vorliegenden Assays zu untermauern und ggf. weitere Signalkomponenten zu identifizieren, sowie die Funktionalität der Proteinkinasen zu überprüfen. Darüber hinaus könnten auch Studien mit selektiven Inhibitoren helfen, ein besseres Verständnis von MAPK-Signalwegen in *E. multilocularis* zu gewinnen. So könnte analog zu Studien an Platyhelminthes untersucht werden, ob eine Inhibition von MAP2K, z.B. durch den MEK1 Inhibitor U0126, die Phosphorylierung von EmMPK1, EmMPK3 und EmMPK4 reduziert (Ressurreicao et al. 2014; Umesono et al. 2013).

#### **4.1.3 ERK-Signaling in *E. multilocularis***

Um genauere Erkenntnisse über die funktionelle Rolle von EmMKKK1 und des ERK-Signalwegs in *E. multilocularis*, insbesondere bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen, zu erlangen, wurden *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* jeweils selektiv mit Hilfe von siRNA in Primärzellen, einer überwiegend aus Stammzellen bestehenden Zellpopulation, herunterreguliert (Koziol et al. 2014). Es zeigten sich im Verlauf alle Zellpopulationen vital und waren zur Bildung von Metacestodenvesikel befähigt, wobei das Einsetzen der Vesikelbildung bei *emmpk4* stets verspätet eintrat. Die Bildung der in Abschnitt 3.5.2 beschriebenen Vesikelansammlungen setzte bei *emmpk1* etwas früher ein und bei einem Quantifizierungsversuch über die maximale Vesikelgröße zeigten sich die entstandenen Vesikel bei *emmpk1* signifikant größer. Bei der Überprüfung dieser mikroskopischen Beobachtung mit Hilfe eines Muzin-markers ließ sich dies allerdings nicht bestätigen. In vorliegenden RNAi-Studien zu

*emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* konnte also insgesamt kein deutlicher Phänotyp erzielt werden.

Bei der Interpretation der RNAi-Studien sind folgende technische Limitationen zu berücksichtigen: In vorliegenden Versuchen konnte lediglich ein transienter Knockdown von *emmkkk1* erreicht werden und die Genexpressionen von *emmpk1* und *emmpk4* an Tag 3 nicht auf unter 50% gesenkt werden, sodass ausbleibende deutliche Phänotypen auf die Expression einer weiterhin ausreichenden Proteinmenge zurückzuführen sein könnten. In vergleichbaren RNAi-Studien an Platyhelminthes mit sichtbaren Effekten wurde ein deutlich höherer Knockdown der mRNA-Level von bis zu 92% erreicht (Andrade et al. 2014; Hosoda et al. 2018). Hier wären in einem ersten Schritt größere Stichproben von Nöten, um validere Aussagen bezüglich der reduzierten Genexpression in den Versuchen treffen zu können. Auch interessant wären Untersuchungen auf Proteinebene, um die Zeitspanne des mittels siRNA reduzierten Proteinlevels zu überblicken (Spiliotis et al. 2010). Darüber wären bessere Methoden zur Bestimmung des Outcomes wünschenswert, da mikroskopische Beobachtungen stark untersucherabhängig sind und sich eine Quantifizierung schwierig gestaltet. So ist auch das hier durchgeführte Vermessen der Vesikel aufgrund von möglichen Verzerrungen der Fotos, verschiedenen Schnittebenen der Vesikel und dem Bias des Auswerters mit potenziellen Fehlerquellen behaftet. Der Ansatz mit Hilfe eines Muzinmarkers erscheint hier eine vielversprechende Variante. Die entsprechenden qPCRs sollten allerdings – anders als in vorliegenden Versuchen – bereits nach drei bis vier Wochen durchgeführt werden, um Verfälschungen aufgrund eines zeitlich bedingt einsetzenden Zellsterbens und der Gefahr des Absaugens von Vesikeln beim Mediumwechsel zu reduzieren. Desweiteren wären auch hier größere Stichproben wünschenswert, um das Problem der Probenheterogenität zu reduzieren. Insgesamt sollten die vorliegenden RNAi-Studien aufgrund der erwähnten Limitationen eher als Vorversuche gewertet werden, die allerdings zu einer deutlichen Verbesserung des Versuchsprotokolls beigetragen haben. Durch die im Ergebnisteil beschriebenen Modifikationen in Hinblick auf Elimination von Kalziumkörperchen und dem Wechsel des Mediums konnte ein besserer Ausgangszustand der Primärzellen nach Elektroporation und eine bessere Proliferation im Verlauf erreicht werden und so die Durchführung nachfolgender Studien erleichtert werden. Darüber hinaus konnte mit dem gleichzeitigen Einsatz von *emmpk1*- und *emmpk4*- siRNA und konsekutiver Herunterregulation beider Gene analog zum Einsatz von single-siRNA die technische

Machbarkeit eines Doppelknockdowns bei Primärzellen von *E. multilocularis* mit vorliegendem Versuchsprotokoll gezeigt werden.

Zur weiteren Analyse der Effekte einer ERK-Inhibition in *E. multilocularis* wurde der ERK-Inhibitor FR180204 verwendet. Als Endpunkt zur Messung der antiparasitären Substanzeffizienz wurde in Anlehnung an frühere Studien unter anderem die Bildung von Metacestodenvesikeln aus Primärzellen und die morphologische Integrität von Metacestodenvesikeln untersucht (Brehm 2014). Hierbei zeigte der Inhibitor selbst bei einer Konzentration von 100 $\mu$ M keine Effekte auf die Vitalität von Primärzellen, die Bildung von Metacestodenvesikel, sowie den prozentualen Stammzellgehalt in Metacestoden. Es bleibt bislang unklar, ob folglich eine Hemmung von ERK-Kinasen in *E. multilocularis* keinen mikroskopisch sichtbaren Phänotyp hervorbringt oder dies einer fehlenden Enzymhemmung geschuldet ist, da EmMPK4 nur drei und EmMPK1 nur zwei der vier beschriebenen Bindestellen von FR180204 exponiert (Ohori et al. 2005). Interessant ist allerdings die Tatsache, dass Vesikel unter 100 $\mu$ M FR180204 eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bessere Integrität und höhere Überlebensrate aufwiesen, wenn auch hierzu nur deskriptive und keine quantitativen Versuche durchgeführt wurden. Hierbei ist allerdings unklar, in welcher Konzentration der grundsätzlich zellpermeable Inhibitor das Innere des Vesikels erreicht und ob der positive Effekt tatsächlich durch eine Hemmung von ERK bedingt ist oder ein indirektes Phänomen, zum Beispiel aufgrund der Interaktion des Inhibitors mit potenziell vesikelschädigenden Reagenzien wie freien Radikalen im Medium, widerspiegelt.

Der Multikinaseinhibitor Dasatinib zeigte ab einer Konzentration von 50 $\mu$ M negative Effekte auf das Überleben von Primärzellen und Metacestoden und ist damit trotz ähnlicher Ansatzpunkte deutlich schwächer potent als Imatinib (Hemer und Brehm 2012).

Insgesamt müssen die vorliegenden RNAi-Studien und Vesikelversuche aufgrund der begrenzten Anzahl von Replikaten und verschiedenen Limitationen als Vorversuche betrachtet werden. Die Tatsache allerdings, dass sowohl bei der Herunterregulation von *emmpk1* mRNA, als auch bei der Verwendung eines ERK-Inhibitors ein tendenziell positiver Effekt auf die Größe bzw. die Integrität von Metacestodenvesikeln zu beobachten war, legt die Vermutung einer Beteiligung des ERK-Signalwegs an Zellproliferation in *E. multilocularis* nahe und macht diesen Signalweg interessant für weiterführende Untersuchungen.

## 4.2 Die Bedeutung EmMKKK1-vermittelter Signalwege in *E. multilocularis*

Insgesamt leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung von relevanten Regenerationsfaktoren von Stammzellen und molekularer Abläufe von Metacestoden als Reaktion auf Wachstumsfaktoren des Wirts, sowie zur Identifizierung neuer pharmakologischer Ansatzmöglichkeiten in der Therapie der AE.

### 4.2.1 Bedeutung bei Parasiten-Wirt-Interaktion

MAPK-Komponenten sind als intrazelluläre Signalkomponenten von eukaryotischen Zellen essenziell, um externe Stimuli zu verarbeiten und so unter anderem Entwicklung und Homöostase zu regulieren. Diese Signalsysteme sind evolutionär früh entstanden und daher hoch konserviert, wie auch bioinformatische Analysen zwischen Menschen und Parasiten bestätigen. So sind ihre Akteure bei *Echinococcus* und seinen Wirten strukturell verwandt und können sich sogar funktionell ersetzen (Brehm und Koziol (2017)). Aus diesen Erkenntnissen ist das Konzept der hormonellen Wirt-Parasiten-Cross-Kommunikation entstanden, bei dem unter anderem angenommen wird, dass Zytokine wie Insulin, EGF oder FGF des Wirts an parasitären Oberflächenrezeptoren binden und konsekutiv Organtropismus, Wachstum und Entwicklung beeinflussen können (Brehm 2010b). Diese Reaktion auf Mitogene wird vor allem über ERK-Signalkaskaden vermittelt (Morrison 2012). So könnte ERK-Signaling in *E. multilocularis* einer der entscheidend an der Parasit-Wirt-Kommunikation beteiligten Signalwege sein. Diese These unterstützen verschiedene Studien, in denen eine Phosphorylierung von EmMPK1 und Schistosomen-ERK durch Wirts-EGF bereits nachgewiesen werden konnte (Spiliotis et al. 2006; Vicogne et al. 2004). Als Vermittler dieser Kommunikation wäre eine Signaltransduktionskaskade über EmGRB2 und EmMKKK1 denkbar, da in anderen Organismen bereits die Verbindung von Grb2 mit Tyrosinkinase-Rezeptoren bekannt ist (Eblen 2018). Die in dieser Arbeit durchgeführten Y2H-Experimente legen in Übereinstimmung mit Studienergebnissen an anderen Organismen die Beteiligung von EmMKKK1 neben dem ERK- auch am JNK-Signalweg nahe, der meist als Reaktion auf Umweltstress aktiviert wird (Morrison 2012). Bestätigung findet diese These in Studien bei denen die Aktivierung von Mekk1 als Reaktion auf Stress gezeigt werden konnte (Schlesinger et al. 1998). So lässt sich vermuten, dass EmMKKK1 in *E. multilocularis* eine Schlüsselfunktion der Kommunikation mit der Außenwelt, und damit auch mit seinem Wirt, übernimmt. Eine



weiterführende Forschung an diesen Signalwegen könnte relevante Wirtsstimuli identifizieren (Gelmedin et al. 2010).

#### **4.2.2 Bedeutung bei der Stammzellenregeneration**

Den totipotenten Stammzellen in *E. multilocularis* wird eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Parasiten und seines komplexen Lebenszyklus zugeschrieben. Sie werden als Schlüssel der „Unsterblichkeit“ des Metacestodengewebes in Zellkulturen angesehen (Brehm 2010a; Koziol und Brehm 2015). Die Aufklärung stammzellspezifischer Mechanismen hat daher ein besonderes Potenzial in Hinblick auf die Etablierung neuer antiparasitärer Therapien (Brehm und Koziol 2014). MAPK-Signalwege sind entscheidend an der Regeneration von Planarien beteiligt (Yuan et al. 2018) und EGFR-Signaling scheint wichtig für die Kontrolle von Zellproliferation, Differenzierung und Morphogenese zu sein und die klonale Expansion von Neoblasten zu regulieren (Fraguas et al. 2011; Fraguas et al. 2017). Hierbei wurden ERK- und Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling eine Rahmenfunktion zur organisierten Planarienregeneration zugeschrieben, da ERK in Absenz von posteriorem  $\beta$ -Catenin die Differenzierung von Stammzellen zum anterioren Pol triggert (Umesono et al. 2013). Anhand von RNAi konnte die entscheidende Beteiligung von Mekk1 an diesem Prozess nachgewiesen werden (Hosoda et al. 2018). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass JNK als Vermittler zwischen apoptotischem Zelltod und Stammzellenregeneration fungiert und somit essenziell für Gewebserneuerung und Remodelling ist (Almuedo-Castillo et al. 2014). Hierbei scheint es ebenfalls eine Verbindung zum Wnt-Signalweg zu geben (Tejada-Romero et al. 2015). Aufgrund ihrer evolutionären Wurzeln kann davon ausgegangen werden, dass Entwicklungsmechanismen wie die Erhaltung und Differenzierung von totipotenten Stammzellen zwischen Parasiten und Planarien ähnlich sind (Brehm 2010a) und daher die im Rahmen dieser Arbeit neu aufgeklärten MAPK-Komponenten von *E. multilocularis* analog zu ERK- und JNK-Komponenten in Planarien Bestandteil komplexer Signalkaskaden zur Regulation von Entwicklung und Homöostase in Stammzellen sind.

#### **4.2.3 Potenzial als neuer pharmakologischer Angriffspunkt**

MAPK-Komponenten regulieren Schlüsselmechanismen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung und sind daher essenziell für eukaryotische Zellen (Zhang und Liu 2002). So werden auch in *E. multilocularis* viele verschiedene Vertreter dieser Signalsysteme exprimiert und bergen ein großes Potenzial als pharmakologischer Angriffspunkt, da mit Hilfe vorliegender Arbeit ihre Expression in Metacestoden, also

dem infektiösen Agenten im Menschen, bestätigt werden konnte und in Zusammenschau mit Studien an Planarien eine wichtige Rolle bei der Regeneration von Stammzellen vermutet werden kann. Die Expression von *emmkkk1* in Stammzellen konnte bereits in den vorliegenden Studien nachgewiesen werden. Die Expression eines potenziellen chemotherapeutischen Angriffspunktes in Stammzellen ist vor allem vor dem Hintergrund der Reduktion von Rezidivraten nach antiparasitärer Therapie entscheidend, da nur bei therapeutischem Angriff der germinativen Zellen ein parasitozider Effekt erzielt werden kann (Koziol und Brehm 2015). Genau hier sehen Studien eine der großen Schwachstelle der aktuellen Therapie, bei der durch Benzimidazol nur ein sehr geringer Effekt auf germinative Zellen erzielt werden kann (Schubert et al. 2014). Diese Faktoren, kombiniert mit der Tatsache, dass die Enzymaktivität von Proteinkinasen leicht modifizierbar ist und aufgrund ihrer Bedeutung als Onkogene entsprechende inhibitorische Substanzen bereits in der onkologischen Anwendung sind, machen die hiesigen MAPK-Komponenten zu einem vielversprechenden Angriffspunkt einer antiparasitären Therapie (Brehm 2014; Brehm und Koziol 2017). Dass verschiedene Kinaseinhibitoren antiparasitäre Eigenschaften besitzen, konnte schon *in vitro* gezeigt werden: So sind ATP-kompetitive Kinaseinhibitoren wie die Pyridinylimidazole SB202190 und ML3403 (Gelmedin et al. 2008), der stammzellspezifische Plk-Inhibitor Bi2536 (Schubert et al. 2014) oder der Raf-Inhibitor BAY 34-9006 (Gelmedin et al. 2010) nur einige Beispiele für Substanzen mit antiparasitären Effekten. Die in der vorliegenden Arbeit neu charakterisierten Signalwege liefern also neue chemotherapeutische Ansatzpunkte, da sie vermutlich eine wichtige Aufgabe in der Integration externer Wirtsstimuli spielen und an der Regeneration von Stammzellen beteiligt scheinen. Darüber hinaus vermuten Studien an Schistosomen die Beteiligung von ERK an Prozessen der Fortpflanzung und der Suche und Invasion von Wirten (Andrade et al. 2014; Ressurreicao et al. 2015). Somit könnten EmMPK1 und EmMPK4 auch eine Rolle bei Infektionswegen von *E. multilocularis* spielen. Ebenso konnte an Schistosomen gezeigt werden, dass eine Herunterregulation der JNK in Schistosomen mittels RNAi zum Zelltod führte und eine Behandlung von Planarien mit dem JNK Inhibitor SP600125 zu einem drastischen Verlust von Stammzellen und zu schweren Defiziten in der Wundheilung führte (Tasaki et al. 2011b; Tejada-Romero et al. 2015).

### 4.3 Fazit

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit mit EmMKKK1 und neuen ERK- und JNK-Signalwegen zentrale Komponenten der komplexen MAPK-Signalkaskaden in *E. multilocularis* identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich einen großen Beitrag zur enormen Regenerationsfähigkeit der *Echinococcus*-Stammzellen leisten und vom Wirt abgeleitete Signale wie Insulin, EGF und FGF über EmGRB2 in Proliferationsnetzwerke des Parasiten integrieren. Arzneimittel-Screening-Assays, die auf diese Signalwege abzielen, könnten daher zu alternativen Arzneimitteln führen, die alleine oder in Kombination mit einer bestehenden Chemotherapie (Benzimidazol) die Prognose von für AE-Patienten verbessern könnten.

Für ein noch besseres Verständnis der Signaltransduktion von *E. multilocularis* sollten ausgehend von der vorliegenden Arbeit die neu charakterisierten MAPK-Komponenten in bereits bekannte Kaskaden integriert werden und so unter anderem überprüft werden, ob eine Verbindung von EmRaf mit EmMKK3 und von EmGRB2 zu EmRas besteht. Analog zu früheren Studien sollte auch der Zusammenhang zwischen externer Stimulation anhand von Wachstumsfaktoren oder Umweltstress und des Phosphorylierungsstatus von EmMPK3 und EmMPK4 und somit die vermutete Bedeutung dieser Signalkaskaden bei der Integration von extrazellulären Signalen überprüft werden (Spiliotis et al. 2006). Weiterführende Forschung zur Verbindung von EmMKKK1 und den neu aufgedeckten Signalwegen mit Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaling verspricht neue Erkenntnisse in Hinblick auf Regeneration von Stammzellen und der Formation des Metacestodengewebes. Aufgrund von Erkenntnissen von anderen Platyhelminthes könnte zur Identifikation chemotherapeutischer Ansatzpunkte besonders die Inhibition von EmMPK3, zum Beispiel mit dem JNK Inhibitor SP600125 zielführend sein (Tasaki et al. 2011b; Tejada-Romero et al. 2015).

## 5 Zusammenfassung

Die alveoläre Echinokokkose (AE), verursacht durch das Metacestoden-Larvenstadium des Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*), ist eine lebensbedrohliche Zoonose der nördlichen Hemisphäre mit eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten. Bei der Suche nach neuen Therapeutika haben Mitogen-activated Proteinkinase (MAPK) -Kaskaden als pharmakologische Zielstrukturen aufgrund ihrer essentiellen Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung ein großes Potenzial.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch BLAST- und reziproke BLAST-Analysen elf potenzielle MAPK Kinase Kinasen (MAP3K), fünf potenzielle MAPK Kinasen (MAP2K) und sechs potenzielle MAPK im *E. multilocularis*-Genom identifiziert, die teils hoch konserviert sind und in nahezu allen Entwicklungsstadien des Parasiten exprimiert werden. Diese Erkenntnisse lassen auf ein komplexes MAPK-Signaltransduktionssystem in *E. multilocularis* mit großer Bedeutung für den Parasiten schließen. Transkriptomdatenanalysen und Whole Mount *in Situ* Hybridisierung (WMISH) zeigten, dass *emmkkk1* (EmuJ\_000389600) als einzige MAP3K neben der Expression in postmitotischen Zellen in besonderem Maße in proliferativen Stammzellen des Parasiten exprimiert wird und somit eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Stammzellen spielen könnte. In Yeast-Two-Hybrid (Y2H) -Wechselwirkungsassays wurden Interaktionen von mehreren upstream- (EmGRB2) und downstream-wirkenden Signalkaskadekomponenten des JNK (EmMKK3, EmMPK3) und ERK (EmMKK3, EmMPK4) -Signalwegs gefunden. Daraus lässt sich schließen, dass EmMKKK1, analog zu seinem humanen Homolog HsM3K1, eine zentrale Rolle bei der *Echinococcus*-Wachstumsregulation durch Rezeptortyrosinkinasen und vielfältige weitere Funktionen im Parasiten besitzt. Anhand von Erkenntnissen an Platyhelminthes kann daher von einem großen Potenzial dieser neu charakterisierten Signalwege als chemotherapeutische Angriffspunkte ausgegangen werden, wenngleich erste RNA-Interferenz (RNAi)- und Inhibitorstudien an *emmkkk1*, *emmpk1* und *emmpk4* keine durchschlagenden Effekte auf das Überleben von Primärzellkulturen und die Bildung von Metacestodenesikeln zeigten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit mit EmMKKK1 und neuen ERK- und JNK-Signalwegen zentrale Komponenten der komplexen MAPK-Signalkaskaden in *E. multilocularis* identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich einen großen Beitrag zur enormen Regenerationsfähigkeit der *Echinococcus*-Stammzellen leisten und vom

Wirt abgeleitete Signale wie Insulin, Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) über EmGRB2 in Proliferationsnetzwerke des Parasiten integrieren. Arzneimittel-Screening-Assays, die auf diese Signalwege abzielen, könnten daher zu alternativen Arzneimitteln führen, die alleine oder in Kombination mit einer bestehenden Chemotherapie (Benzimidazol) die Prognose von für AE-Patienten verbessern könnten.

## 6 Summary

Alveolar echinococcosis (AE), caused by the metacestode larval stage of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis* (*E. multilocularis*), is a life-threatening zoonosis of the Northern Hemisphere with limited therapeutic options. In searches for a new chemotherapy, mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades are of great potential as new drug targets due to their essential role in cell proliferation and differentiation.

In this work eleven potential MAPK kinase kinases (MAP3K), five potential MAPK kinases (MAP2K) and six potential MAPK were identified in the *E. multilocularis* genome by BLAST and reciprocal BLAST analyses, of which some are highly conserved and expressed in almost all developmental stages of the parasite. These findings suggest a complex MAPK signal transduction system in *E. multilocularis* with major importance for the parasite. Transcriptome data analysis and Whole Mount *in Situ* Hybridization (WMISH) showed that *emmkkk1* (EmuJ\_000389600) is the only MAP3K being decisively expressed in the proliferative parasite in addition to expression in postmitotic cells, and thus could play an important role in the differentiation of stem cells. In Yeast-Two-Hybrid (Y2H) interaction assays, interactions between several upstream (EmGRB2) and downstream signaling cascade components of JNK (EmMKK3, EmMPK3) and ERK (EmMKK3, EmMPK4) signaling pathways were detected. Thus, EmMKKK1, like its human homologue HsM3K1, appears to play a central role in *Echinococcus* growth regulation by receptor tyrosine kinases and seems to have diverse other functions in the parasite. Based on findings on other platyhelminths it can be expected that these newly characterized signaling pathways are of great potential as drug target, although first RNA interference (RNAi) and inhibitor studies on *emmkkk1*, *emmpk1* and *emmpk4* revealed no substantive effects on the survival of primary cell cultures and the formation of metacestode vesicles.

In conclusion, the present work identified with EmMKKK1 and new ERK and JNK signaling pathways central components of the complex MAPK signaling cascades in *E. multilocularis*, which most likely contribute to the enormous regenerative capacity of *Echinococcus* stem cells and integrate host derived signals such as insulin, epidermal growth factor (EGF), and fibroblast growth factor (FGF) via EmGBR2 into proliferative networks of the parasite. Targeting these signaling pathways in drug screening assays might thus lead to alternative drugs that alone, or in combination with existing chemotherapy (benzimidazole), could improve the prognose of AE patients.

## 7 Literaturverzeichnis

- Almuedo-Castillo, M., X. Crespo-Yanez, F. Seebeck, K. Bartscherer, E. Salo und T. Adell (2014). "JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling." *PLoS Genet* 10(6): e1004400.
- Andrade, L. F., M. Mourao Mde, J. A. Geraldo, F. S. Coelho, L. L. Silva, R. H. Neves, . . . G. Oliveira (2014). "Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway." *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2949.
- Artimo, P., M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, . . . H. Stockinger (2012). "ExPASy: SIB bioinformatics resource portal." *Nucleic acids research* 40(Web Server issue): W597-603.
- Bradley, M. und J. Horton (2001). "Assessing the risk of benzimidazole therapy during pregnancy." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(1): 72-73.
- Brehm, K. (2010a). "Echinococcus multilocularis as an experimental model in stem cell research and molecular host-parasite interaction." *Parasitology* 137(3): 537-555.
- Brehm, K. (2010b). "The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction." *Med Microbiol Immunol* 199(3): 247-259.
- Brehm, K. (2014). Protein Kinases as Drug Targets in the Treatment of Alveolar Echinococcosis. *Protein Phosphorylation in Parasites*, C. Doerig, G. Späth and M. Wiese: 357-373.
- Brehm, K., K. Jensen, P. Frosch und M. Frosch (1999). "Characterization of the genomic locus expressing the ERM-like protein of *Echinococcus multilocularis*." *Mol Biochem Parasitol* 100(1): 147-152.
- Brehm, K. und U. Koziol (2014). "On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development." *Parasite* 21: 72.
- Brehm, K. und U. Koziol (2017). "Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels." *Adv Parasitol* 95: 147-212.
- Brehm, K., M. Spiliotis, R. Zavala-Gongora, C. Konrad und M. Frosch (2006). "The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world." *Parasitol Int* 55 Suppl: S15-21.
- Brunetti, E., P. Kern und D. A. Vuitton (2010). "Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans." *Acta Trop* 114(1): 1-16.
- Buttenschoen, K., D. Carli Buttenschoen, B. Gruener, P. Kern, H. G. Beger, D. Henne-Bruns und S. Reuter (2009). "Long-term experience on surgical treatment of alveolar echinococcosis." *Langenbecks Arch Surg* 394(4): 689-698.
- Craig, P. (2003). "Echinococcus multilocularis." *Curr Opin Infect Dis* 16(5): 437-444.

- Craig, P. S., D. Hegglin, M. W. Lightowers, P. R. Torgerson und Q. Wang (2017). "Echinococcosis: Control and Prevention." *Adv Parasitol* 96: 55-158.
- Das, J., P. Chen, D. Norris, R. Padmanabha, J. Lin, R. V. Moquin, . . . J. C. Barrish (2006). "2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor." *J Med Chem* 49(23): 6819-6832.
- Davis, M. I., J. P. Hunt, S. Herrgard, P. Ciceri, L. M. Wodicka, G. Pallares, . . . P. P. Zarrinkar (2011). "Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity." *Nature Biotechnology* 29: 1046.
- Deplazes, P., L. Rinaldi, C. A. Alvarez Rojas, P. R. Torgerson, M. F. Harandi, T. Romig, . . . E. J. Jenkins (2017). "Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis." *Adv Parasitol* 95: 315-493.
- Eblen, S. T. (2018). "Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes." *Adv Cancer Res* 138: 99-142.
- Eckert, J. und P. Deplazes (2004). "Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern." *Clin Microbiol Rev* 17(1): 107-135.
- Edgar, R. C. (2004a). "MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity." *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Edgar, R. C. (2004b). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-1797.
- Fraguas, S., S. Barberan und F. Cebria (2011). "EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis." *Dev Biol* 354(1): 87-101.
- Fraguas, S., Y. Umesono, K. Agata und F. Cebria (2017). "Analyzing pERK Activation During Planarian Regeneration." *Methods Mol Biol* 1487: 303-315.
- Garrington, T. P. und G. L. Johnson (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 211-218.
- Gelmedin, V., R. Caballero-Gamiz und K. Brehm (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(9): 1068-1081.
- Gelmedin, V., M. Spiliotis und K. Brehm (2010). "Molecular characterisation of MEK1/2- and MKK3/6-like mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK) from the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*." *Int J Parasitol* 40(5): 555-567.
- Gottstein, B., M. Stojkovic, D. A. Vuitton, L. Millon, A. Marcinkute und P. Deplazes (2015). "Threat of alveolar echinococcosis to public health--a challenge for Europe." *Trends Parasitol* 31(9): 407-412.



- Hall, T. A. (1999). "Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hegglin, D. und P. Deplazes (2013). "Control of *Echinococcus multilocularis*: strategies, feasibility and cost-benefit analyses." *Int J Parasitol* 43(5): 327-337.
- Hemer, S. und K. Brehm (2012). "In vitro efficacy of the anticancer drug imatinib on *Echinococcus multilocularis* larvae." *Int J Antimicrob Agents* 40(5): 458-462.
- Herz, M. (2019). Genome wide expression profiling of *Echinococcus multilocularis* Dissertation, GSLS.
- Hosoda, K., M. Motoishi, T. Kunimoto, O. Nishimura, B. Hwang, S. Kobayashi, . . . Y. Umesono (2018). "Role of MEKK1 in the anterior-posterior patterning during planarian regeneration." *Dev Growth Differ* 60(6): 341-353.
- Ito, A. und P. S. Craig (2003). "Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections." *Trends Parasitol* 19(9): 377-381.
- Junghanss, T., A. M. da Silva, J. Horton, P. L. Chiodini und E. Brunetti (2008). "Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives." *Am J Trop Med Hyg* 79(3): 301-311.
- Karandikar, M., S. Xu und M. H. Cobb (2000). "MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components." *J Biol Chem* 275(51): 40120-40127.
- Koziol, U. (2014). Molecular and developmental characterization of the *Echinococcus multilocularis* stem cell system, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Koziol, U. und K. Brehm (2015). "Recent advances in *Echinococcus* genomics and stem cell research." *Vet Parasitol* 213(3-4): 92-102.
- Koziol, U., F. Jarero, P. D. Olson und K. Brehm (2016). "Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms." *BMC Biol* 14: 10.
- Koziol, U., T. Rauschendorfer, L. Zanon Rodríguez, G. Krohne und K. Brehm (2014). "The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*." *EvoDevo* 5: 10-10.
- Krishna, M. und H. Narang (2008). "The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple." *Cell Mol Life Sci* 65(22): 3525-3544.
- Kumar, S., G. Stecher und K. Tamura (2016). "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Mol Biol Evol* 33(7): 1870-1874.
- Kumar, S., K. Tamura und M. Nei (1994). "MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers." *Comput Appl Biosci* 10(2): 189-191.
- Letunic, I., T. Doerks und P. Bork (2015). "SMART: recent updates, new developments and status in 2015." *Nucleic Acids Res* 43(Database issue): D257-260.

- Montagne, J., M. Preza, E. Castillo, K. Brehm und U. Koziol (2019). "Divergent Axin and GSK-3 paralogs in the beta-catenin destruction complexes of tapeworms." *Dev Genes Evol* 229(4): 89-102.
- Moro, P. und P. M. Schantz (2009). "Echinococcosis: a review." *Int J Infect Dis* 13(2): 125-133.
- Morrison, D. K. (2012). "MAP kinase pathways." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(11).
- Ohori, M., T. Kinoshita, M. Okubo, K. Sato, A. Yamazaki, H. Arakawa, . . . T. Fujii (2005). "Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex." *Biochem Biophys Res Commun* 336(1): 357-363.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman und M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pomerance, M., M. C. Multon, F. Parker, C. Venot, J. P. Blondeau, B. Tocque und F. Schweighoffer (1998). "Grb2 interaction with MEK-kinase 1 is involved in regulation of Jun-kinase activities in response to epidermal growth factor." *J Biol Chem* 273(38): 24301-24304.
- Ressurreicao, M., P. De Saram, R. S. Kirk, D. Rollinson, A. M. Emery, N. M. Page, . . . A. J. Walker (2014). "Protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase regulate movement, attachment, pairing and egg release in *Schistosoma mansoni*." *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2924.
- Ressurreicao, M., R. S. Kirk, D. Rollinson, A. M. Emery, N. M. Page und A. J. Walker (2015). "Sensory Protein Kinase Signaling in *Schistosoma mansoni* Cercariae: Host Location and Invasion." *J Infect Dis* 212(11): 1787-1797.
- Riedl, S. B., K. (2009). "Molekulare Charakterisierung einer c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) aus *Echinococcus multilocularis*."
- Romig, T., D. Thoma und A. K. Weible (2006). "*Echinococcus multilocularis*--a zoonosis of anthropogenic environments?" *J Helminthol* 80(2): 207-212.
- Ruijter, J. M., C. Ramakers, W. M. H. Hoogaars, Y. Karlen, O. Bakker, M. J. B. van den Hoff und A. F. M. Moorman (2009). "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data." *Nucleic Acids Research* 37(6): e45-e45.
- Saitou, N. und M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* 4(4): 406-425.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, . . . A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nat Methods* 9(7): 676-682.

- Schlesinger, T. K., G. R. Fanger, T. Yujiri und G. L. Johnson (1998). "The TAO of MEKK." *Front Biosci* 3: D1181-1186.
- Schubert, A., U. Koziol, K. Cailliau, M. Vanderstraete, C. Dissous und K. Brehm (2014). "Targeting *Echinococcus multilocularis* stem cells by inhibition of the Polo-like kinase EmPlk1." *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2870.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork und C. P. Ponting (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 5857-5864.
- Schweiger, A., R. W. Ammann, D. Candinas, P. A. Clavien, J. Eckert, B. Gottstein, . . . P. Deplazes (2007). "Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland." *Emerg Infect Dis* 13(6): 878-882.
- Siles-Lucas, M., A. Casulli, R. Cirilli und D. Carmena (2018). "Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets." *PLoS Negl Trop Dis* 12(4): e0006422.
- Spiliotis, M. und K. Brehm (2009). "Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacystode vesicles and the generation of primary cell cultures." *Methods Mol Biol* 470: 245-262.
- Spiliotis, M., C. Konrad, V. Gelmedin, D. Tappe, S. Bruckner, H. U. Mosch und K. Brehm (2006). "Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to human epidermal growth factor." *Int J Parasitol* 36(10-11): 1097-1112.
- Spiliotis, M., C. Mizukami, Y. Oku, F. Kiss, K. Brehm und B. Gottstein (2010). "*Echinococcus multilocularis* primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference." *Mol Biochem Parasitol* 174(1): 83-87.
- Spiliotis, M., D. Tappe, S. Bruckner, H. U. Mosch und K. Brehm (2005). "Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*." *Mol Biochem Parasitol* 139(2): 225-237.
- Spiliotis, M., D. Tappe, L. Sesterhenn und K. Brehm (2004). "Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacystodes under axenic conditions." *Parasitol Res* 92(5): 430-432.
- Tasaki, J., N. Shibata, O. Nishimura, K. Itomi, Y. Tabata, F. Son, . . . Y. Umesono (2011a). "ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration." *Development* 138(12): 2417-2427.
- Tasaki, J., N. Shibata, T. Sakurai, K. Agata und Y. Umesono (2011b). "Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration." *Dev Growth Differ* 53(3): 389-400.

- Tejada-Romero, B., J. M. Carter, Y. Mihaylova, B. Neumann und A. A. Aboobaker (2015). "JNK signalling is necessary for a Wnt- and stem cell-dependent regeneration programme." *Development* 142(14): 2413-2424.
- Torgerson, P. R., A. Schweiger, P. Deplazes, M. Pohar, J. Reichen, R. W. Ammann, . . . B. Mullhaupt (2008). "Alveolar echinococcosis: from a deadly disease to a well-controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the last 35 years." *J Hepatol* 49(1): 72-77.
- Tsai, I. J., M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garciarrubio, A. Sanchez-Flores, K. L. Brooks, . . . M. Berriman (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism." *Nature* 496(7443): 57-63.
- Umesono, Y., J. Tasaki, Y. Nishimura, M. Hroudá, E. Kawaguchi, S. Yazawa, . . . K. Agata (2013). "The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis." *Nature* 500(7460): 73-76.
- Vicogne, J., K. Cailliau, D. Tulasne, E. Browaeys, Y. T. Yan, V. Fafeur, . . . C. Dissous (2004). "Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*." *J Biol Chem* 279(36): 37407-37414.
- Vuitton, D. A., F. Demonmerot, J. Knapp, C. Richou, F. Grenouillet, A. Chauchet, . . . L. Millon (2015). "Clinical epidemiology of human AE in Europe." *Vet Parasitol* 213(3-4): 110-120.
- Wagner, D. E., I. E. Wang und P. W. Reddien (2011). "Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration." *Science* 332(6031): 811-816.
- Wang, L., Z. Yang, Y. Li, F. Yu, P. J. Brindley, D. P. McManus, . . . W. Hu (2006). "Reconstruction and in silico analysis of the MAPK signaling pathways in the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*." *FEBS Lett* 580(15): 3677-3686.
- Xu, S. und M. H. Cobb (1997). "MEKK1 binds directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases." *J Biol Chem* 272(51): 32056-32060.
- Yang, S. H., A. D. Sharrocks und A. J. Whitmarsh (2013). "MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation." *Gene* 513(1): 1-13.
- Yuan, J., Z. Wang, D. Zou, Q. Peng, R. Peng und F. Zou (2018). "Expression profiling of planarians shed light on a dual role of programmed cell death during the regeneration." *J Cell Biochem* 119(7): 5875-5884.
- Zhang, W. und H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." *Cell Research* 12: 9.
- Zhang, Y., S. Y. Neo, X. Wang, J. Han und S. C. Lin (1999). "Axin forms a complex with MEKK1 and activates c-Jun NH(2)-terminal kinase/stress-activated protein kinase through domains distinct from Wnt signaling." *J Biol Chem* 274(49): 35247-35254.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
AE	Alveoläre Echinokokkose
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CDS	kodierende Sequenz
CMEM	undefiniertes konditioniertes Medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
EB	Elektroporationspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
EsPASy	Expert Protein Analysis System
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
HU	Hydroxyurea
JNK	Jun amino-terminal kinases
LB	Luria Broth
MAP2K	MAPK Kinasen
MAP3K	MAPK Kinase Kinase
MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase
MEGA7	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
mRNA	messenger RNA
MUSCLE	Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation
OD <sub>600</sub>	optische Dichte im Spektrophotometer bei 600nm
p38/SAPK	stress-activated protein kinases
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RH-Zellen	Rat Reuber Zellen, ATCC No.: CRL-1600
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

rpm	rounds per minute
SD-Medium	synthetic dropout-Medium
siRNA	small interfering RNA
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression-Medium
tpm	Transcripts Per Kilobase Million
WMISH	Whole Mount <i>in Situ</i> Hybridisierung
Y2H	Yeast-Two-Hybrid
YPDA	yeast peptone dextrose adenine

## 9 Anhang

### 9.1 Quellen für Genomvorhersagen und Proteinsequenzen

GeneDB	<a href="http://www.genedb.org/Homepage/Emultilocularis">http://www.genedb.org/Homepage/Emultilocularis</a>
WormbaseParasite	<a href="https://parasite.wormbase.org">https://parasite.wormbase.org</a> Version WBPS9 (WS258)
Sanger Institute	<a href="ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/multilocularis/">ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/multilocularis/</a> Version V4
NCBI	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

### 9.2 Anfragen zur Identifikation von *E. multilocularis* Homologen auf NCBI

Protein	Accession Number bei NCBI	Organismus
MAP3K	Q9XTC6.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Q95UN8.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Q9V3Q6.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Q13233.4	<i>Homo sapiens</i>
	Q9Y2U5.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q99759.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q9Y6R4.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q99683.1	<i>Homo sapiens</i>
	O95382.3	<i>Homo sapiens</i>
	O43318.1	<i>Homo sapiens</i>
	P41279.2	<i>Homo sapiens</i>
	P80192.3	<i>Homo sapiens</i>
	Q02779.3	<i>Homo sapiens</i>
	Q16584.1	<i>Homo sapiens</i>
	Q12852.2	<i>Homo sapiens</i>
	O43283.1	<i>Homo sapiens</i>
	Q99558.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q6ZN16.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q56UN5.1	<i>Homo sapiens</i>
	Q9NYL2.3	<i>Homo sapiens</i>

	Q5TCX8.3	<i>Homo sapiens</i>
	XP_012799912.1	<i>Schistosoma Haematobium</i>
	XP_012792882.1	<i>Schistosoma Haematobium</i>
MAP2K	G5EDF7.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Q10664.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Q21307.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	G5EDT6.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Q20347.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Q23977.2	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Q24324.2	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Q02750.2	<i>Homo sapiens</i>
	P36507.1	<i>Homo sapiens</i>
	P46734.2	<i>Homo sapiens</i>
	P45985.1	<i>Homo sapiens</i>
	Q13163.2	<i>Homo sapiens</i>
	P52564.1	<i>Homo sapiens</i>
	O14733.2	<i>Homo sapiens</i>
MAPK	Q17446.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	O44514.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	P39745.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	Q11179.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	G5EBT1.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	O62618.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
	O61443.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
	P40417.3	<i>Drosophila melanogaster</i>
	P28482.3	<i>Homo sapiens</i>
	P27361.4	<i>Homo sapiens</i>
	P31152.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q16659.1	<i>Homo sapiens</i>
	Q13164.2	<i>Homo sapiens</i>
	P45983.2	<i>Homo sapiens</i>
	P45984.2	<i>Homo sapiens</i>
	P53779.2	<i>Homo sapiens</i>
	Q15759.2	<i>Homo sapiens</i>
	P53778.3	<i>Homo sapiens</i>
	O15264.1	<i>Homo sapiens</i>
	Q16539.3	<i>Homo sapiens</i>
	Q8TD08.1	<i>Homo sapiens</i>
	XP_012797625.1	<i>Schistosoma Haematobium</i>
	CAX72940.1	<i>Schistosoma japonicum</i>

### 9.3 Proteinsequenzen für phylogenetische Analyse der MAPK-Komponenten

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Accession Number</b>	<b>Organismus</b>
MAP3K	ArRMIL	P10533.1	<i>Avian retrovirus</i>
	BtM3K7	A2VDU3.1	<i>Bos taurus</i>
	DmM3K7	Q9V3Q6.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
	DmM3K7L	P83104.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
	HsBRAF	P15056.4	<i>Homo sapiens</i>
	HsM3K1	Q13233.4	<i>Homo sapiens</i>
	HsM3K5	Q99683.1	<i>Homo sapiens</i>
	HsM3K7	O43318.1	<i>Homo sapiens</i>
	HsM3K11	Q16584.1	<i>Homo sapiens</i>
	HsM3K12	Q12852.2	<i>Homo sapiens</i>
	HsM3K15	Q6ZN16.2	<i>Homo sapiens</i>
	MmM3K7	Q62073.1	<i>Mus musculus</i>
	PaM3K7	Q5RFL3.1	<i>Pongo abelii</i>
	XIM3K10	Q7T2V3.1	<i>Xenopus laevis</i>
	MAP2K	BtMP2K6	Q5E9X2.1
DrMP2K6		Q9DGE0.2	<i>Danio rerio</i>
HsMP2K1		Q02750.2	<i>Homo sapiens</i>
HsMP2K4		P45985.1	<i>Homo sapiens</i>
HsMP2K6		P52564.1	<i>Homo sapiens</i>
HsMP2K7		O14733.2	<i>Homo sapiens</i>
MmMP2K4		P47809.2	<i>Mus musculus</i>
ScMP2K1		Q91447.1	<i>Serinus canaria</i>
XIMP2K2		Q07192.1	<i>Xenopus laevis</i>
MAPK	HsMK11	Q15759.2	<i>Homo sapiens</i>
	HsMK01	P28482.3	<i>Homo sapiens</i>
	HsMK03	P27361.4	<i>Homo sapiens</i>
	HsMK09	P45984.2	<i>Homo sapiens</i>
	HsMK10	P53779.2	<i>Homo sapiens</i>
	HsMK14	Q16539.3	<i>Homo sapiens</i>
	HsMK15	Q8TD08.1	<i>Homo sapiens</i>
	MmMK09	Q9WTU6.2	<i>Mus musculus</i>
	MmMK11	Q9WUI1.2	<i>Mus musculus</i>
	XIMK01	P26696.3	<i>Xenopus laevis</i>
	XIMK14	P47812.1	<i>Xenopus laevis</i>
XIMK15	Q501Q9.1	<i>Xenopus laevis</i>	



## 9.4 cDNA-Sequenzen von *Echinococcus*-MAPK-Komponenten

Start- und Stopcodon sind jeweils grau hinterlegt.

### Partielle Sequenz *emgbr2*

```

1      ATGGAGGCCG ATGCAAAGCA CGATTTCCAA GCAAGTGCTG CGGATGAGCT TCCTTTTTGC
61     AAGAATTCGG TTTTGAAGAT TTTGAGCGTG GAGGATGACC CAAACTGGTA CTTGGCAGAA
121    CAGGATGGGC GGAAGGGTCT GGTGCCATGC AACTACATCT CCTTCCGTCC CAATCCCTGG
181    TATATGCAGG CGTGTCGTCT AAACACTGCG GAGGAGTGCC TTCTTGAAAC TGACCCGTAC
241    ACCGGTCTGC CCGTCCAACC CGACGGTGCT TTCGTGGTCC GACGTTCCGA GTCCAATGGG
301    CCTGGCTTCA GCCTCTCCGT TAAAGACGGC CAGAAAGTGC AGCACTTCAA GGTGCTACAA
361    GATGAGATGG GCAAGTACTT TGTTTGGCTA CGCAAATTTG ACTCCATCAA CCAGCTGATT
421    GACTACCATC GACGCACTAG CATCTCCCGC GACGGTTTCC TCCTCCTTGT CGATAGGCAG
481    CCCTCTAGGA TGATTAGCAT GGGACGCGGA GACCAACAGT CTCAGATGGT GCAGCGGGTG
541    ATCGCGCGTT TTGATTTCAA TGCTCAGAG CCAGAGGAGT TGTCAATTCCA TCGGGGTGAC
601    GTGATTGAAG TGTGGGCCA GGAGGACGAA AATTGGTGGC GCGGTCGAAT CTCCAACACC
661    GGCTCTACCG GCCTCTTCCC TGCCAACACT GTGGACACCC TACCACCCAT TATGCCCAAT

```

### Partielle Sequenz *emmkkk1*

```

1      GGTGCAACAG GATGCTCCTC TACTACTCCC AAACGTCAGC GCTTTCGAGT AACCTTGGGA
61     GGACATTCGT CCGGCTGTAG TTGCTCTGAA CAGCCTTTCT TCTGTCCAGC ATCCACCCGT
121    TCACCTTG TG CACACACTCT TTTTGTCTT CTTCGTATCC TCCGCCTACG ATTGGAAGAC
181    CCACGGATCT CAAGGCCGCG ATTAGAGAAT TATGAGGTGG AGCCCCTGCT TCAGCGATAT
241    GCTCGTCTGC GAGCTTCCAA CTTCCGTTTA CCGGGAGGTC ATCATCCCAC AGAAGTTCCC
301    ACTTCCACCT CCACCAGTAC CACTGTTACC AATCCAGTGC AAAATACCCA ACCCACCCTG
361    CGCATCGTAA TGCCGCGTCC GGTGTGCTG AACACCTCAG CGCCAAATAC ATGTCTCTTG
421    GCTGCTGTGC GCGCCTCCGT CCGCTCCTCC GAGTGCTCTG AACTCTCCAA CATCACCCGC
481    AGCATCGAAC CCTCCTCACG CCGCTGTGAA GTTGTCTCCG TATGCCGACG CTGCCTCTCC
541    CACGCCCTCT ACTACTGGTGG CCGGGGCATT GGCTGTAGAA GTGGTGATAG CGGTGGTGGT
601    GTTAGCAGCG GAGGTGGTGG CGGTGGAAAG GTTGGGAATG GCGTTGGTGG TGGAGAACGT
661    GGCAGGAAGCG TGGAGGTAGA GGATGGAGAG GGGTTCGAAC GCAGGCCGAA AACAGAACCT
721    CAAGCCTACT ATGATACTCT GAATTCAGA ATAAGCATA TTAATTCAGC TACTGCTAGA
781    CACGCCCTTT CCACCACCTT CCGACCGATC GGTGAGCCGA GCTCAAATCC TGAGACAGAC
841    CCCGAAACTG AAGGCGTTTC CTCTCGAGT CGAAGCAGTC GATTTGAGGA AACTCCCTCC
901    CAGGGTGTA TAATGGTCGC CCTCACCCGT AACGTCGCCT CCGTGGACGA CACTCTCACC
961    GGTCAATCAC GTCGCTCCGC TAGTCCGGAC GCCATCACAG TGGAGATGGG CACTGTATGC
1021   CGTCTGTGCC TGC CGAACT CCGACCCCTT TCCGAGCCTT CCACTACTGT CTGCTCCTCT
1081   GTTACTGTG GCGTGGCTTT CCATCAAGAG TGCTTCTGTA TCTGGCAAGA AGAATGTGAA
1141   AGTGAAACGG GCTCGCTTTA CTGTCCGGTA TCGGACGTG TCTGGACCAA TGCTTTGACC
1201   CCCACGAATC TCCCCGAGGG CGGAACGCGT CCGGTGCCCC CCTCTGCCGC CGATCTGCCC
1261   GCGCCTCCGC CACCTCACGA GGTCAATCCC GCTTGGGCGC CGGTTAGTGG GGTGGAGAAC
1321   GCAAATCTTC TTCTTTTGCA GAACCAAATT ATCCCCGGGC TAAGGAGTAG TTTGGCTGTG
1381   TGGAAATCGG TCTTTTCAGA GGAGGTTGCT ATGGGGATGA TTTCGCCTTA CTGGCACGTA
1441   CGTCAGAGTG CTTTGCCTCA AGTTGCAAAA ATCACCATT TGTGCGTCTT GATGGCACGG
1501   AAAGCAACCA CAATGGCAAC CACTGCTTCC CTTATCAAC AGCAATCCGA AGGTCTTCC
1561   ACCACACCTA ATAATCTGGG CTGCGAGTCT CTTCAATGT CCATCCGACT GATCCAGTAC
1621   CTTCTAAGCG ATCCAGCCGA CGAGGCTTTC ATTGCTTCTT TGTGTGCGTT CCGAGAAATT
1681   CTGGGCTACC TCATTTGTCT CGACACGGAG ACCATGACCG CATTGCAACG CACAATCGCG
1741   CCAGTCCTAC GACGGTTGCT TATATTTGTT GGTGGCTACC TAACACCCGG TCACGTGCCT
1801   ATCAACAACG TGGCCAACTT AAACCTTCCA ACCGCCACAG CGTCAACTGC GCGACAGTG
1861   ACCGAGAACG GAGCAGCGTC AATCGATGTG ACTCTACCAC CACCGCCGGA TCAGCATCGA
1921   CGGGCCAATT TAGCCCTGGT CACTCTCGTA GAGTTGGCCA AGGGTCAGGA GGGCGAAATG
1981   TCCATCGGAA GGGACACTAG CAACGCGGAG GAATGCATGT CCATCAGCGG GTTGCCACAT

```

2041 ATGGCACACT TTCTGCTGCG TTCCGCCAAG TTTACCCAAA CTCACCTCGT GGGTCGGCTG  
 2101 AAGCTCTTGG AGAAGCTGGT GGAAATGCAC CGTGAAACAG TTGCTAAGAT TAGTGCTGGT  
 2161 GACGGTGTG GGGATGCTGT TGTTACCCAAA GACGTGGACA ACAAGCGCAT CAGTTACCGT  
 2221 CACCTCTGTT CCAGCCTCAT CTTCACTCGA CGTCATGTCT ACCCCCCTGA ACAGCCCGTC  
 2281 TTTCCGCACA ATCTTGTATC TGAGGATGCT ATGGCAACGC GATTTTCGAAG GAATCCCGCA  
 2341 GCATTTACAA ACGTCACTGG ATCCCCTCTT AAGGTCATGG GAGTGCCTGG TAAACGAGCC  
 2401 GAGGAGGTGC AGATTAGCTC TTTTGCCTGT CTCATGGAAG CCAACATCAA AGCCAGTCGA  
 2461 CTTGCCCGAC GTGTATTCAT CACAGTAGCG CGAGCTCTGC TTCAAGAGCC CCGTTCTTCC  
 2521 TCCTTTTCCCT CGTCCAATGG CAGTCTCTC CCCGATGCCG AGAGCTTTGT CAGTGCTGAA  
 2581 ATCAAGCTCC TCGATGTCAG TTTGGCCGCC AAACACTCGT CCAAATTAGC CGATCTTCTT  
 2641 AACACCAACA CTACCACTAC CAGCAGTTC GCAGCCACTA TCACCCGCATC CAACCCCATC  
 2701 AGCGCCAGTG GTACCGTAAC TGCTACGACC ACCACTGTAA GTACTAATAT TACCGCCGTC  
 2761 TCAACTACCA CGCCGCCTCA ACCACCACCA CCGCCCGAGC ATGAAGTCCC ACCCGTTCCC  
 2821 CCACCTCGGC GCTTTTCCCA GAGCAAGACA CCTGCTCGAG CCCCCTCAA TAGCACGAGG  
 2881 ATAATTACTC CCAACGGTGT TCGAGTTGCC CTTGAACCCG CTTACGACCA CGTAGCACTC  
 2941 TCGGAAACTG CTGGCGTCTA CAGTAGCAGT GAGGATGAGG AGGATGGAGA AGGCGGGGAC  
 3001 GAAGAACC GC TGGAAAAACT GGATTGGGAG GAGGTGAGAA CAACACAGCA ACCACAGCAG  
 3061 CATCAGTATC AAGGGAAAAG AGAGCCTGTT AAGTATACAA CATCAGCCTC TGTCGGGTC  
 3121 ACTCCAAGTC CAGCAGAACT GTCAGCTCTG AAAACGGCCC TCCGACGAGC CGCTGGTCA  
 3181 CCAGTACCCC TGGTGACGAT TCCAAACCTT GCACAGGCGT TGGACGCCAA GGATCCACTG  
 3241 AAAAGCGAGT ACCGATACAA AGAGGGGGTT GATTGGTTGC TAGGACCCTT TCTTGGCAAG  
 3301 GGTGCATTTT CACTCTGCTA CCAAGCACGC GACATTAGGA CGGGCACGTT GATGGCGGTG  
 3361 AAGCGGCTGC GGTTCGTGGG TGATTCCCTT GCCGAGGCGA TGGAGCAACT GGCAGCGGT  
 3421 AGGGAGGAGG TGGAGATAAT GCGACGACTG TATCATCCAA ACGTCCTACG TCTTTTCGGT  
 3481 ATCGCCTACA ACCCCGAAAA GAAGCACGTG GACATTTTTCG TGGAAATGGAT GCCGGGGGGA  
 3541 AGTATTACGA GTTTACTGAA TCAGTATGGC GCATTCACAG AACCCGTCTC CTTGGCATA  
 3601 ACTCTGCAGG TGGTTAGGGG CATCTCTTGC CTTACAAAAC ACGGTATTCT TCACAGAGAC  
 3661 TTAAGAGGAG CAAACTTATT GGTTGACTGC ACGGGCAGTG TCGTGCGTAT ATCTGATTTT  
 3721 GGTGCCTCTG CACGATTGGG CAGTCAGGGC AGTGTGGCAG GTCAATTTCA GGGTCAAGTT  
 3781 ATCGGCACTT TCGCCTTCAT GGCTCCGGAA GTGCTGAGAG GTGAGACGTA TGGGCGGGCG  
 3841 TGCGATATTT GGTTCGGTCGG CTGCTGCCTG CTGGAGATGC TGAGTGGAAA ACCTCCCTGG  
 3901 AATGATTCTC GACTTACCAA TCAATATGCC CTGATGTTTA CAATTGCGTC AACTGATCAG  
 3961 CCGCCCTCTT ATCCAAAGTC AGTCAGCTCC TCAGTCAAGC AGTTTCTGGA CTCTTGTTTC  
 4021 AATCGTATTC CAGAACAACG ACCCACAGCC CATCGTCTGC TTCAACATCC CGTTTCTCG  
 4081 GCCATTGTCT CCGCTCCAGA GCCATCCACG AAGGCGTCGT GTACATCAA GACCGCCAAC  
 4141 AGCAGCCTCT CAAAGAGCTT CACTGCTGTC AGTCTTTCGA GCAGTTCGTC GTCACGTGCC  
 4201 ACTAGTCGTC ACCGTGCTCT CCCACCTGTT CCCCACGAGA GCTCCCTTCC ACCCACCACC  
 4261 TTGTCTCCTC TGACGAATTA CGACAAACTC GTCTCTCCAG TACCACAAC TCGGCAGCAG  
 4321 CAGCAGCAGC AGCATCAGGT GGTGCCCTG CAGCGCAAAA TTTGCCGAAA CCAATGA

### Sequenz *emmkk3*

1 ATGAACCTGG TTCGTCTAGC ACCACAAGAC GTGATTAACA GTGTTGTTGA ATCATCACGT  
 61 CGAACCTCAC AAAAGTGTCA ACGACCAACT GAGCTGATTT TACGCCGTCC TGCTTCGGCG  
 121 ACTCCATACC ATGGACGTCG TCCTCCAGAT GTGTCAACCC CGCCTCCTTC GGAGCATATC  
 181 GAATTTAACC AACTCAAGGA AATCCTTCTC AAAAAAGTG GTGATCTCTG CTACAATTTT  
 241 GAGAGGATTA CCGCAACCAA AGATGACTTT ATCGACGAGG GTCAACTCGG TGCTGGAAC  
 301 TGCGGGGTAG TTAAAAAAAT GCGACATAAA GTTAGAAAGG ATCTTGTCAT GGCTGTCAA  
 361 CAAATGCATG TGTCATCGAC CTGTGCTGTG GAAAACAAAA GAATTATGAT GGATTTGGAC  
 421 GTTGTTACAA AATGTGTTGG CTGTCCCAAT ATCGTCAAAAT GTATGGGAAT ATTCTTCTCT  
 481 ATGTCTGAAG TGTGGATTTG CATGGAAGTT ATGTCAACAT CTCTTGATAA CCTCATGCGG  
 541 GACACTGCTG AACCGTTTCC CGAGTATGTT CTTGGCAAAA TTGCGGTTTC GATTGTAAAA  
 601 GCTTTGGATT ACCTCAAGAG AGAGCATAAC ATGATGCACC GAGATGTCAA ACCATCAAAT  
 661 ATGCTCTTGA GCTCTACCGG CGATATTTAA TTATGTGATT TCGGAATAAG TGGACAACCT  
 721 AAAGATTCTA TCGCGAATTC CAATCAGCTC GGCTGTATAG GCTATATGGC ACCGAAAGG  
 781 CTCGAAAAAT TCAAATATGA CGTTCGTGCT GATATATGGT CTCTCGGAAT ATCGTTAGTC

841 GAACTTGCCC TTAAGTCTTT CCCGTACAAA GGTTCCCAAT TTGAATTTGC CATTCTCAGT  
 901 AAAATCATTG AAGAACCGCC ACCTAAGCTT CCAAATGATG GGCGCTATTC AGCTGACTTC  
 961 TGTTCTTTTG TGGACAGGTG CTTGATCAAA GATTACGTCC AACGTCCCAA GTATGGAGCA  
 1021 CTTGTAAGG CCAACCTCTT TCTCACCTAC AACCAGGAGC CGTTCGATGT TGGTGATTGG  
 1081 TATCGCACTG TTCGATTAAA TCCTACTGGT AACCACAATG AGGGTCGCCA CACCCCATC  
 1141 TCTCCATCAT CCTCCACCGT CACTCTTAGT CCTGACGGAA ATCGCAGCTG GTTAGACTCC  
 1201 GAAATCGATG TACGTCGGAG TAATCAGCGT GAGACCTCAC TGACTCGGCG CAGTCCCGCT  
 1261 CCTCTTCTAT TTGACCCGCC AGCTCACCTG CTCCGGAAGG ACTGCATACC TAACTGGCAA  
 1321 AAGCCTCTGG TATACAATTC TGCGAGGTCA CAGACTCTTC CACCGCTGG CGTCTCATCC  
 1381 TACCGTCAGG CCTCTCCAAC TCCGCCGCCA CTTTTGAACG CTATTGAAAG ACCCGGCGTG  
 1441 CTCGGTTTTA ACTCTTCTGG TGGTGGTGAT AGTCTGAGA ATGTGATACT GCGCAACCGG  
 1501 AGCCGTCCGC GCGTTTCCTC GGGTCGAAAG CACCAGGAGG CATCTGAAAT GGTACCATCA  
 156q1 GTGGCGGTGG ACGTGCCTCG GAACGCTTTT TACCCCGCC TCGGCACCAA CGATATTGGT  
 1621 GGGGACGCGG GCGACTCTCC TTGCGGCCAT AGCACAACCA ATACTACCAC TTTGCAAGCC  
 1681 TATCTGAACA GCCTCAATCA ACAGCAAGTG CCACAAACGG CGCCTTCGCC ACCACTTACC  
 1741 TACTACACCG AACCCCGCTC CTCTCATCAG CGCCCATCCA TCCTGCCCCC ATCTCCTCT  
 1801 CCCTCCTCCA TCGTTACACC TCCGCACCAG CCCTATATAC CCAATGCGAC CGCTATGGAG  
 1861 CAGAACGGCC ACGACTCCCT TTCACCTCGT CCTCTGCGTT CCGTCTCCGC AGGCTACAAC  
 1921 GGCAATGGAC GTCGCATTCA ACGAGCCCC GCCTGTCTGC TCATCTCGAA CCCTTATCAG  
 1981 CCCACTCGAG TGGTCAACAA TGACACCCCA GTCTTCTCAT TCTCTCCCTC AAAAAAGACC  
 2041 ACGGCTACCC AGCCTGTGGT TTCTACCCC AGTTCTACTG ACAGTGCTTC TGGTGGTGCC  
 2101 TCAGAAAACG AGGCACAGGA GTACCATCAT GAGTACTTCT GGTATGCCA CCAACGGCTG  
 2161 AATCCACCCT CCCCATGA

### Sequenz emmk4

1 ATGCATTCAA AGCGGCCGAA TAAGCGACTG GAATTGAATG GTCACGCGAG TGAAGCACAA  
 61 CAGCGCTCGG ATCCGAGCGG TGCAACCCTC TCCGACAGGA CAACCGTGGT GGTGAATAAC  
 121 ACGGCGCTCC AACTCAAATT CAACGACCTC ACCTACGTGC GGAAGCTGGG CTCGGGTCAG  
 181 TTTGCAACCG TGCATCACGT GCGGGTGAAG CGCAACGATG TGGTATACGA CTTGCGGGTA  
 241 AAGGAAATTA AGATTAGCCG GTCAGAGATG CAGAAGAGCC GCATCCGCCA GGAGTCCGAA  
 301 TTTGGTATTC GTATGTCTGT GTGTCCCTC GCGGTCATCA CACACGGGGT TATGGGCCGC  
 361 GGCGACGACG TTCGCATCCT TATGGAGGTC ATGGACAGCT CCGTCACCAA TCTCTGTTTC  
 421 AAAAGGGACC TAGCTCGGCT TGATATGCCA GAAGAGCACG TCGCCTTCAT AACAAAAGTGT  
 481 GTAGTCAAAG GCCTTACTT TCTCTGTCAA CGCGATATCC AACACAGGGA TGTCAGCCG  
 541 ACCAACATGT TGGTCAATCG CAGTGGCTTT GTGAAGATAT GTGACTACGG AGTGGCTCAG  
 601 AAGATGGAAG GTGACATTAC AAAAAACGAAT GTAGGCACTT ACAAATTCCT GCGCCGGAG  
 661 CGACTGGTGG GAGGAAGGCA GGAGGAGGGG TTCCGAATTC AGTCAGACGT CTGGTCATTG  
 721 GGAGTTAGCG TCTACAACAT TGTGACGTCT TCGATACCTT TCCCTGAGAA CGCGACCATA  
 781 TTCGATTATC ACAGTTACAT TATGGCGAAT GCAGACGTTG AACTGCCGAC GGATAGACCG  
 841 TACTCCCGCG AACTGCGTAC CTTGCTCTCT TCTTGCCCTCA AAGTTAACGA AGCAAACCGT  
 901 CCCAACTACA CAGAGCTGCT CAGATTGGAC TTTATAGCGA ATATCAAGAT TAAAGAGCAT  
 961 AAACCCCTGT TCAGAGAGTT TGTGCGCCAA ACACCTGATG ACTCTTTGAG CACACCCGAG  
 1021 TAGCCTTGTT CTATCAAATC CCACACACAC ACACACCCCG TCCAGTCTCT CACCCCTGC  
 1081 AGTCCCTTTG ACGACAGTTG TTTTAAAACC CTGACCTCCC TAACCGTTCT AAAAGTGTG  
 1141 CAAGTCCCTGT CCTCCCGAT TACCATCTTC TTTCTACTG AAATTGTGCT GCCAAAGTGG  
 1201 CTAATATTTT CCTGA

**Sequenz *emmk5***

1     ATGCCATTTT TTGATCGTCC AAATCAAGAC CTTCTTATAC CAACATTGGA CAAACAACCT  
 61     GTTAATGGCA CCGAGCTTAA CGTCCCCGTT CCTGCAGTGG CAAGACTAAC GATCCCTAGC  
 121    GTATGCACGG ATTACCGTTT CACCGCAAAC GATCTGATCA ATGAAGGTGA ACTAGGTCAT  
 181    GGTAACTTTG CATTTGTTCA AAAGATGCGG CATCGAAAAG TTGATTGTTT AATGGCAGTA  
 241    AAAATTGTTA GATCAGTACT AAATGAACGT GAGAAGAACA AATCCCTCAA GGATCTGCAC  
 301    ATTATTATGA AGTCAAAATT TGAACGGATT GTCACGTTTT ATGGAGCCAT CTTTCATGAG  
 361    AGTGAATGCT GGATTTGCAT GGAGTTGATG GACTCTTCTC TTGACAAATT TTATAAAATG  
 421    GTCTATCTGG AGCGCAAATC ATTTATTCCA GAGGCTGTGC TCGCAATGAT TACCGTTGCT  
 481    ATCGTATCTG CTTTGAAC TA TTTGAAATGT GAACCTCACG TTATGCATAG AGATGTCAAA  
 541    CCCTCCAACG TGCTTATTAA CAAAGGTGGG GATATAAAGC TTTGTGACTT TGGTATCTCT  
 601    GGTGATCTCG TGAACAGCCT TGCCATGACC AAAGATGTCTG GATGTAGACC CTACATGGCG  
 661    CCAGAACGCA TAAACCCAGA CCTCATGTCC CATGGCTACG ACGTGCCTC CGATGTGTGG  
 721    AGTCTGGGCA TTAGTCTGGT TGAGCTGGCT ACCGGTCCGT TTCCCTATCC TTCATGGCGG  
 781    TCACCTTTC ACCAACTCCA GTCTGTGCTG CAGTCGCCTT CGCCACAGCT TCCGCCCGAC  
 841    GAGGAGGTCT CCGTACCGTT CTCGGCAGCA ATGCGCGAAT TCGTTGGCGC CTGTCTTCAG  
 901    AAGGACCTCA AGAAGCGACC GAAATATGCC GCTCTTATGG AACTGCCATG GTACGTGGAA  
 961    GCAACGTCAT CGACGGTGGG TTTGGGTGCC TACTTTACAA CCATCCTGGA ATCTGCCCT  
 1021  GAACCTGCCC TATAA

**Partielle Sequenz *emmpk4***

1     TCTAGCTCAA AAACCTCGTC TAAGTCAGCC ACCTTTGAGG TGGGGCCAAA TTATGTAGAC  
 61     TTTTAAATGC TGGGAGAAGG AGCCTACGGC GTTGTCTTTT CAGCCGTTGA TAATCGGTCT  
 121    GGCGAACGCG TTGCCATAAA AAAATCGACT CCGTTTGAAC ACCAAACGTT TTGTCAGAGA  
 181    ACATACAGGG AGGTTAAAAT ATTACTCCGC TTCAAACACG AAAATATCAT TGATATAAGA  
 241    GATGTGATAC TCGTCGGAGA CACACTGGAG ACCATGAAAG ATGTATACAT TGTTCAAACG  
 300    TGTATGGACA CTGATTTGTA TCGGTTGCTG AAAAGTCAAG CCATTTCAA TGATCACATA  
 361    TGTTATTTTC TGTACCAAAT TCTACGAGGT CTCAAATACA TCCATTCCGC TAATGTTATA  
 421    CACCGTGATT TGAAACCATC CAACCTGCTT ATTAATGCTA ATTGCGACCT CAAAATATGC  
 481    GATTTTGGTC TAGCTCGACT GAACGACCCG ATGCACGACC ACAACGGTAT GCTGACAGAG  
 541    TATGTGGCCA CACGCTGGTA CCGCGCGCCC GAGATTATGC TCAATTCCAA GGGTTATACG  
 601    CACGCTATCG ATGTCTGGTC GGTGGATGC ATCTTTGCCG AGATGTTTGA CCGCCAACCG  
 661    CTCTTCCCG GCAAGCACTA TGTCGATCAG TTGACACTCA TTCTTCAAGT CTTAGGCTAT  
 721    CCTGCGGAGG GTGACAGGGA GTGGATCGTC AATACCAAGG CTGCTAGCTT TGTGAACCGG  
 781    TTCATAACGT ACTCAAACA GCCTTGGAAAT CGCCTCTATC CCAACGCCAC CCCTCAAGCA  
 841    CTGGACCTCC TGGACCGACT ATTGGCCTTC AATCCTGCCT CTGGAATCTC CGTCGAGGAT  
 901    GCCCTAAAGC ATCCTTATCT GCGGTCTTTC TACGAACCCA ATGATGAGCC GGTGTGTGCG  
 961    AATCCTTTCG AGTACGAGGA GGAGAAGGTA GACGAGCAGC CGATAGAGAA GTTGAAACAG  
 1021  ATGATGTTTG ACGAGGTTTG CAAGCTTCAT CATCGTCAGC AGCTGCAGGC GGCGGGAGCA  
 1081  CAGCAGTCCG CGTAG

## Danksagung

Diese Arbeit wäre niemals ohne die großartige Unterstützung vieler Menschen in meinem Umfeld möglich gewesen:

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Klaus Brehm danken, der das Konzept dieser Forschungsarbeit erarbeitet hat, mich über Jahre als Doktorvater auf dem Weg meiner Promotion und als Mentor während meines Studiums begleitet hat und mir mit vielen produktiven Gesprächen stets zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Janzen, Prof. Dr. Stich und Prof. Dr. Liese, die sich als Mitglieder meines Promotionskomitees zur Verfügung gestellt haben und mit ihren Anregungen viel neuen Input für diese Arbeit brachten. Dank äußern möchte ich auch gegenüber meiner Betreuerin Michaela Herz für die Unterstützung im Labor und der Graduate School of Life Sciences für die großzügige finanzielle und ideelle Förderung dieser Arbeit.

Ein riesiges DANKESCHÖN gilt den „Echis“ – namentlich Monika Bergmann, Raphaël Duvoisin, Michaela Herz, Dirk Radloff und Markus Spiliotis! Ihr habt mich so herzlich in euren Team aufgenommen, mich tatkräftig bei der Laborarbeit unterstützt und dank all' den motivierenden Gesprächen, vermittelten Tipps & Tricks, gemeinsamen Backstreet-Boys-Duetten und Kuchenpausen gezeigt, wie viel Freude experimentelle Forschung bereiten kann.

Herzlichen Dank meinen lieben Eltern, die jedes noch so kleine Erfolgserlebnis mit mir feierten, mich bei Rückschlägen ermutigten und einfach in jeder Lebenslage für mich da sind. Herzlichen Dank meinen Freunden und Kommilitonen für die vielen schönen Stunden und die wundervollen Erinnerungen an die gemeinsame Zeit in Würzburg. Und zuletzt herzlicher Dank an Andreas Starke: Da eine Aufzählung all' Deiner guten Taten den Rahmen hier definitiv sprengen würde halte ich es kurz: Du bist einfach großartig! DANKE für alles!



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Molekulare Charakterisierung von Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)- Komponenten aus *Echinococcus multilocularis*“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

## **Affidavit**

I hereby confirm that my thesis entitled “Molecular characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK) components from *Echinococcus multilocularis*“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place, Date

Signature