

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Oliver Kurzai

Molekulare Charakterisierung
einer DyP-Typ Peroxidase des Humanparasiten
Echinococcus multilocularis

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johannes Ulrich

aus Eichstätt

Würzburg, Januar 2021

Referent: Prof. Dr. Klaus Brehm

Koreferent: Prof. Dr. Janzen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2024

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 ALVEOLÄRE ECHINOKOKKOSE.....	1
1.2 DER PARASIT <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS</i>	4
1.2.1 <i>Lebenszyklus</i>	4
1.2.2 <i>In vitro-Kultursystem</i>	5
1.2.3 <i>Molekularbiologie und Genomik</i>	6
1.2.4 <i>Wirt-Parasit-Interaktionen</i>	7
1.2.5 <i>Stammzellsystem</i>	8
1.2.6 <i>Phylogenetik</i>	8
1.3 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES UND <i>E. MULTILOCULARIS</i>	10
1.3.1 <i>Oxidativer Stress/Sauerstoffstress</i>	10
1.3.2 <i>Sauerstoffstress bei Plathelminthes und Echinococcus spp.</i>	13
1.4 PEROXIDASEN VOM DYP-TYP	14
1.5 ZIELSETZUNG.....	18
2 MATERIALIEN UND METHODEN	20
2.1 MATERIALIEN	20
2.1.1 <i>Software und Online-Tools</i>	20
2.1.2 <i>Geräte</i>	21
2.1.3 <i>Kits und Verbrauchsmaterialien</i>	22
2.1.4 <i>Vektoren und Bakterien</i>	23
2.1.5 <i>Stämme und Isolate von E. multilocularis</i>	23
2.1.6 <i>Oligonukleotide</i>	24
2.2 BIOINFORMATISCHE METHODEN.....	25

2.2.1	Analyse von Gen- und Proteinstruktur.....	25
2.2.2	Phylogenetische Analysen	25
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.3.3	Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der DNA	27
2.3.4	Ligation in Plasmid	27
2.3.5	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. Coli</i>	28
2.3.6	Klontest-PCR.....	28
2.3.7	Plasmidisolierung	29
2.3.8	Sequenzierung	29
2.3.9	Quantitative Realtime PCR.....	30
2.4	ARBEITEN MIT PARASITENMATERIAL.....	31
2.4.1	Isolierung von RNA aus Metacestoden.....	31
2.4.2	Isolierung von RNA aus mit <i>E. multilocularis</i> infizierter Leber von <i>M. unguiculatus</i>	32
2.4.3	Umschrieb isolierter RNA in cDNA.....	32
2.4.4	Aktivierung von <i>Protoscolices</i>	32
2.5	WHOLE-MOUNT <i>IN SITU</i> -HYBRIDISIERUNG	32
2.5.1	Herstellung und Aufreinigung von RNA-Sonden durch <i>In vitro</i> Transkription	33
2.5.2	Konzentrationsbestimmung der DIG-markierten RNA-Sonden mittels <i>Dot blot</i>	33
2.5.3	EdU-Färbung und Prozessierung der Metacestoden für WMISH.....	35
2.5.4	Nachweis der Ziel-mRNA mittels WMISH	35
2.5.5	EdU-Detektierung	40
2.5.6	Anfärben mit DAPI.....	41
2.5.7	Aufnahme und Auswertung der Bilder	41
2.6	GENEXPRESSION, PROTEINAUFREINIGUNG UND -NACHWEIS.....	42
2.6.1	Aquacloning in modifizierten pET151D-TOPO-Vektor und TOP10.....	42
2.6.2	Umtransformation in BL21 (DE3) und Induktion der Genexpression.....	42

2.6.3	<i>Proteinaufreinigung</i>	44
2.6.4	<i>Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung</i>	45
2.6.5	<i>Proteinnachweis mittels Western-Blot</i>	46
2.7	SPEKTROPHOTOMETRIE UND AKTIVITÄTSASSAYS	47
2.7.1	<i>Makroskopische Einschätzung der Reaktion mit RB19</i>	47
2.7.2	<i>Spektrophotometrische Messung der Extinktion bei der Reaktion mit DAB</i>	48
2.7.3	<i>Spektrophotometrische Bestimmung des pH-Spektrums</i>	49
2.7.4	<i>Messung der Chemilumineszenz bei Reaktion mit Luminol</i>	49
2.7.5	<i>Natives Katalase-Aktivitätsgel</i>	50
3	ERGEBNISSE	54
3.1	ANALYSE DER GENSTRUKTUR	54
3.1.1	<i>Abweichungen der Genstruktur aus der Genvorhersage von den Transkriptomdaten</i>	54
3.1.2	<i>Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung</i>	58
3.2	ANALYSE DER PROTEINSTRUKTUR	59
3.2.1	<i>Analyse der Primärstruktur</i>	59
3.2.2	<i>Heterologe Expression von EmIPOX</i>	62
3.3	BEZIEHUNG VON EMIPOX ZU DEN DYP-PEROXIDASEN ANDERER EUKARYOTEN	64
3.4	EMIPOX-TRANSKRIPTE IN VERSCHIEDENEN LARVENSTADIEN	67
3.4.1	<i>Die Aktivierung von <i>Parascolices</i> induziert die Expression von EmIPOX</i>	67
3.4.2	<i>Aerobe Kulturbedingungen induzieren die Expression von EmIPOX im Vergleich zu axenischen Bedingungen</i>	68
3.4.3	<i>Die Expression von EmIPOX in Parasitenmaterial aus dem Peritoneum von <i>M. unguiculatus</i> ist nicht signifikant höher als bei Metacestoden aus dem Kultursystem</i>	69
3.4.4	<i>EmIPOX-Expression steigt in infiziertem Lebergewebe stark an</i>	70
3.5	LOKALISATION DER TRANSKRIPTE VON EMIPOX UND IHR BEZUG ZU STAMMZELLEN	71
3.6	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON EMIPOX	76
3.6.1	<i>Remazol Brilliant Blue/RB19 ist kein Substrat von EmIPOX</i>	76

3.6.2	<i>3,3'-Diaminobenzidin ist ein EmIPOX-Substrat</i>	76
3.6.3	<i>EmIPOX ist bei saurem und basischem pH-Wert als Peroxidase aktiv</i>	79
3.6.4	<i>Luminol ist ein EmIPOX-Substrat</i>	81
3.6.5	<i>EmIPOX besitzt Katalase-Aktivität</i>	82
3.6.6	<i>Katalase-Aktivität in den Zelllysaten verschiedener Stadien von E. multilocularis</i>	83
4	DISKUSSION	86
4.1	PHYLOGENETIK	86
4.2	IST EMIPOX DIE GESUCHTE KATALASE VON <i>E. MULTILOCULARIS</i> ? – ÜBERLEGUNGEN ZUR PHYSIOLOGISCHEN ROLLE DES ENZYMS.....	88
4.2.1	<i>EmIPOX – another „catalase in peroxidase clothing“ (Njuma et al., 2014)?</i>	88
4.2.2	<i>Das emipox-Transkriptprofil weist auf eine Beteiligung in der Abwehr von exogenem, oxidativem Distress hin</i>	91
4.2.3	<i>Hochregulation der Transkription von emipox in der Wirtsleber</i>	96
4.3	BEZIEHUNG ZU GERMINALZELLEN BESTÄTIGT POTENTIAL ALS PHARMAKOLOGISCHE ZIELSTRUKTUR.....	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
	APPENDIX	113
	I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
	II ABBILDUNGSVERZEICHNIS	117
	III TABELLENVERZEICHNIS	120
	IV DANKSAGUNG	122

1 Einleitung

1.1 Alveoläre Echinokokkose

Die alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine potenziell tödliche, Zoonose Erkrankung, welche durch das Larvenstadium des Humanparasiten *Echinococcus multilocularis* verursacht wird. Obwohl sie eine grundlegend andere nosologische Entität beschreibt als die cystische Echinokokkose (CE), deren Erreger der Hundebandwurm *Echinococcus granulosus* ist, werden beide oft gemeinsam betrachtet. Hier soll sich ausdrücklich auf die AE beschränkt werden.

Die Ausbreitung der AE ist auf die nördliche Hemisphäre begrenzt, die größte Krankheitslast findet sich im westlichen China. So werden 91% der globalen Neuerkrankungen aus China gemeldet, was die Prävalenz der Tuberkulose dort an einigen Orten übersteigt (Torgerson et al., 2010; Yang et al., 2009). Die hohen Zahlen werden damit erklärt, dass das enge Zusammenleben mit Hunden einen anerkannten Risikofaktor darstellt (Craig et al., 2006). Torgerson et al. betonen, dass die jährliche Sterblichkeit der AE sich auf annähernd 18,000 beläuft; dies entspreche mehr als einem Zehntel der zehn vernachlässigten Tropenkrankheiten Trypanosomiasis, Chagas, Schistosomiasis, Leishmaniose, lymphatische Filariose, Onchocercose, intestinale Infektionen mit Nematoden, japanische Encephalitis, Dengue und Tollwut (Torgerson et al., 2010; Mathers et al., 2007).

Endemische Gebiete in Europa betreffen vor allem die Schweiz, Ostfrankreich und Süddeutschland (Vuitton et al., 2015). Im Zeitraum zwischen 2001 und 2018 wurden in Deutschland zwischen sechs und 56 Neuerkrankungen pro Jahr gemeldet; auf einen längeren Zeitraum betrachtet, scheint die Inzidenz leicht zu steigen (vgl. Abbildung 1).

Ein Zusammenhang mit dem gehäuften Auftreten von Füchsen in Städten wird diskutiert (Deplazes et al., 2004; Liccioli et al., 2015).

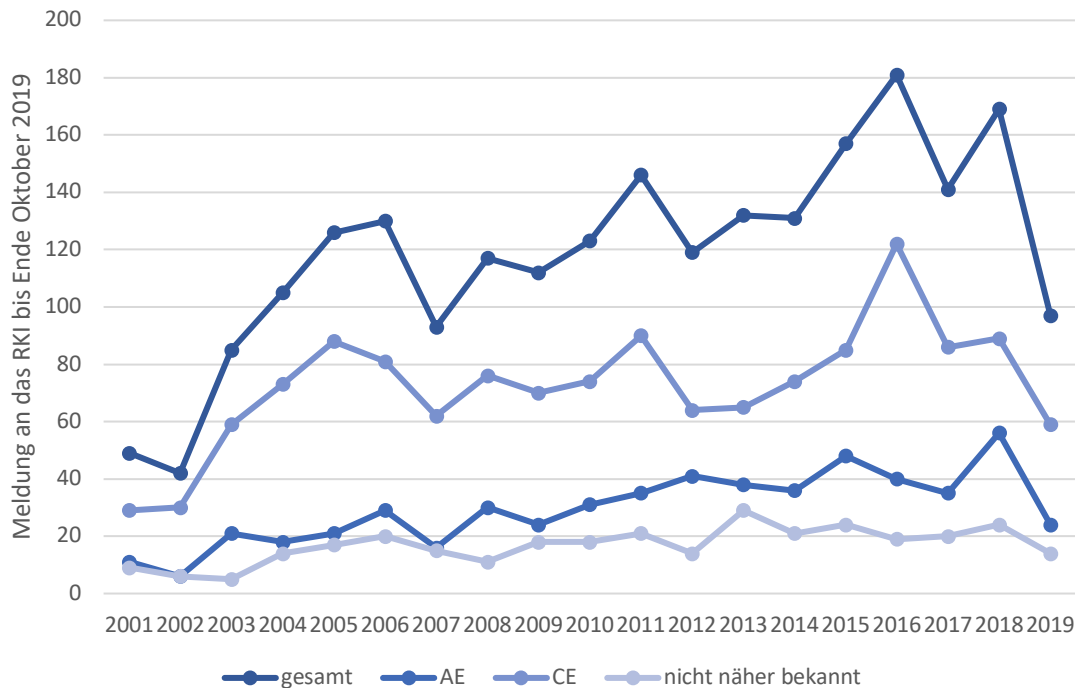


Abbildung 1: Gemeldete Fälle von alveolärer und cystischer Echinokokkose in Deutschland (2001-2019).

Die zu Grunde liegenden Daten entstammen einer Abfrage der Meldedaten gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG) auf <https://survstat.rki.de/> [Zugriff am 2.2.2020]. AE – Alveoläre Echinokokkose, CE – Cystische Echinokokkose.

Die AE ist primär eine Erkrankung der Leber, eine extrahepatische Erstmanifestation ist selten (Kern et al., 2003). Der Mensch infiziert sich durch die orale Aufnahme von Wurmeiern (Eckert & Deplazes, 2004). Initiale Symptome sind zu einem Drittel unspezifisch, wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Hepatomegalie oder Zufallsbefunde bei Blutuntersuchungen. Je ein weiteres Drittel fällt durch cholestatischen Ikterus oder abdominelle Schmerzen auf. Im Allgemeinen treten die Symptome erst nach einer Inkubationszeit von 5-15 Jahren auf (Brunetti et al., 2010).

Die Diagnostik der AE basiert nur zu einem Teil auf der Klinik. Große Bedeutung kommen der Bildgebung, der Histopathologie und dem Direktnachweis von

Nukleinsäuren und der Serologie zu (Kern, 2010). Zu Beginn der Diagnosefindung steht aufgrund der einfachen Durchführbarkeit häufig der Ultraschall. Die Sensitivität dieser Untersuchung kann durch Anwendung einer kontrastverstärkten Ultraschall-Untersuchung (CEUS) erhöht werden (Cai et al., 2019). CT- und MRT-Untersuchungen eignen sich besonders zur Abgrenzung der Morphologie der Leberläsion gegenüber Differentialdiagnosen, unter denen die CE die wichtigste ist (Bresson-Hadni et al., 2006). Eine Vielzahl von Antigenen zum serologischen Nachweis des Parasiten stehen zur Verfügung, die aber wegen der Gefahr falsch positiver Ergebnisse allesamt nur in Verbindung mit der Bildgebung genutzt werden sollten (Carmena et al., 2007). Trotz dieser diagnostischen Mittel kann es mitunter schwierig sein, die AE aus der Menge der differentialdiagnostischen Möglichkeiten zu isolieren: Immerhin ein Drittel der begonnenen Therapien fußt auf einer falschen Diagnose, in den meisten Fällen einer Verwechslung mit der CE (Stojkovic et al., 2015).

Die Therapie der AE beruht auf den beiden Säulen Chirurgie und Pharmakotherapie: Die radikale Resektion des Parasiten ist das oberste Ziel, dessen Erreichen aber durch das infiltrative Wachstum des Parasiten erschwert wird (Brunetti et al., 2010). Zur Chemotherapie stehen derzeit allein die parasitostatischen Substanzen der Benzimidazol-Klasse (Albendazol, Mebendazol) zur Verfügung, welche am β -Tubulin der Zelle angreifen (Brehm et al., 2000). Für die zum Teil beträchtlichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen wird die Ähnlichkeit von parasitärem und humanem Tubulin verantwortlich gemacht (Siles-Lucas et al., 2018). Die Nebenwirkungen in Verbindung mit der Notwendigkeit einer lebenslangen Einnahme machen besagte Substanzen zu einer nur unzulänglichen Therapieoption. Weitere Medikamente werden dringend benötigt. Die Untersuchung pluripotenter Stammzellen von *E. multilocularis* hat gezeigt, dass nur

dieser Zelltyp zur Proliferation fähig zu sein scheint (Koziol et al., 2014). Neue, potenziell parasitozide Substanzen sollten sich daher an der Stammzellpopulation orientieren (Brehm & Koziol, 2014).

Therapieadhärenz ist auch abhängig von psychischen Komorbiditäten. Erst kürzlich wurde von einer hohen Rate an Depression, Angsterkrankungen und posttraumatischem Stress bei Patienten mit AE berichtet (Nikendei et al., 2019). Die Behandlung dieser Komorbiditäten sollte in Zukunft bewusster in mögliche Therapieregime integriert werden.

1.2 Der Parasit *Echinococcus multilocularis*

1.2.1 Lebenszyklus

E. multilocularis zirkuliert zwischen wilden und domestizierten Caniden (Endwirt) und kleinen Säugetieren, vor allem Nagern (Zwischenwirt) (vgl. Abbildung 2). Die Infektion des Zwischenwirts erfolgt durch Aufnahme von Wurmeiern und der in ihnen enthaltenen Oncosphäre. Diese bohrt sich durch die Darmwand und findet ihren Weg in die Leber (Romig et al., 2017). In der Leber des Zwischenwirts erfolgt die Transformation in das nächste Larvenstadium, den Metacestoden. Aufgrund seines infiltrativen Wachstums im Leberparenchym wurde der Metacestode von *E. multilocularis* (im Gegensatz zu den Zysten von *E. granulosus*) als „atypisch“ bezeichnet (Koziol et al., 2014). Er besteht aus einer dünnen Gewebsschicht, der Germinalschicht, welche von einem Synzytium bedeckt wird. Dieses Synzytium sezerniert eine weitere azelluläre, kohlenhydratreiche Schicht, die sogenannte Laminatschicht, welche die Grenzfläche zwischen Wirt und Parasit bildet. Das Innere der Zyste ist mit Hydatidenflüssigkeit gefüllt. In der Wand dieser Zyste knospen Brutkapseln aus, in welchen das nächste Larvenstadium, der Protoscolex, heranreift (Eckert & Deplazes, 2004).

Nach Ingestion des Zwischenwirts durch den Endwirt kommt es im Darm zur Aktivierung des Protoscolex. Dieser positioniert sich in der Darmwand, indem er sich mit Hilfe seines Hakenkranzes verankert. Durch Wachstum und Segmentierung der Bandwurmglieder (Proglottiden) reift er zum adulten Wurm heran (Thompson & Eckert, 1983). Die Länge des adulten Wurms beträgt bis zu 4,5mm (Eckert & Deplazes, 2004).

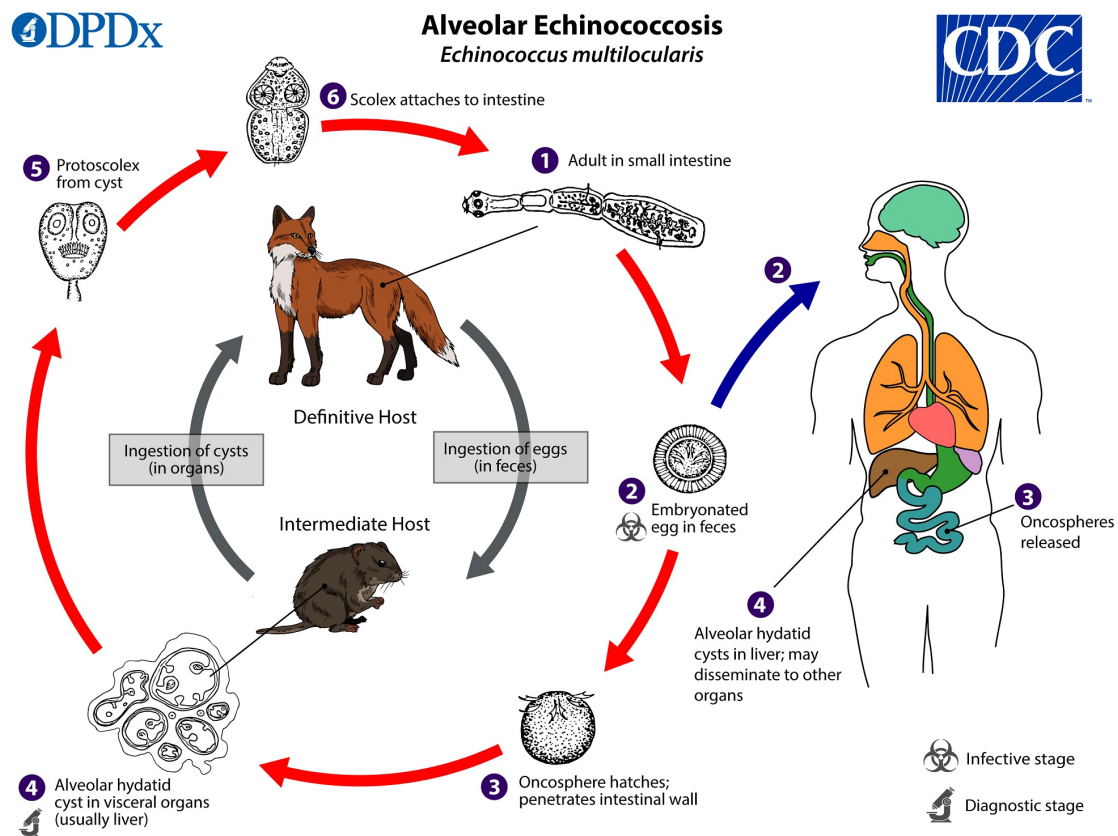


Abbildung 2: Lebens- und Infektionszyklus von *E. multilocularis*.

Die Abbildung entstammt den Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html> [Zugriff am 2.2.2020]

1.2.2 In vitro-Kultursystem

In den letzten Jahren konnte *E. multilocularis* als Modellorganismus für die Forschung an Cestodeninfektionen etabliert werden. Dies ist vor allem der Entwicklung eines *in vitro*-Kultursystems zu verdanken, dessen Anfänge bis in die Mitte der 90er Jahre zurückreichen (Hemphill & Gottstein, 1995; Jura et al., 1996). Zwei Arten der

Kultivierung stehen zur Verfügung: die Co-Kultur mit Hepatoma-Zellen aus Ratten und die axenische Kultur, in welcher allerdings Faktoren aus Fütterzellen benötigt werden, um das Parasitenwachstum zu gewährleisten. Das Kulturmedium für die axenische Kultur wird daher mit Fütterzellen vorbehandelt. Der Ausschluss von Sauerstoff wird durch eine Stickstoff-Atmosphäre und die Zugabe von reduzierenden Agenzien sicher gestellt (Spiliotis et al., 2004).

Mit Hilfe der axenischen Kultur bestand erstmals die Möglichkeit, aus Metacestoden isolierte Primärzellen eigens zu kultivieren und einer genetischen Manipulation zugänglich zu (Brehm & Spiliotis, 2008). Dazu werden die Primärzellen unter den gleichen axenischen Kulturbedingungen und -medium gehalten wie schon die Metacestoden, aus denen sie extrahiert wurden. Der schädliche Einfluss einer sauerstoffreichen, nicht-reduzierenden Umgebung auf Primärzellen konnte gezeigt werden (Spiliotis et al. 2008). Eine Woche nach der Extraktion aus den Metacestoden bilden sich in der Regel erste Zellaggregate, was als guter Indikator für den Erfolg des Verfahrens gilt (Brehm & Spiliotis, 2009). Nach sechs bzw. unter verbesserten Bedingungen drei bis vier Wochen lässt sich die Bildung von ersten, neuen Metacestodenesikeln beobachten. Die Kultivierung von Primärzellen war die Voraussetzung für den Einsatz von RNAi bei *E. multilocularis*. Mittels Elektroporation lassen sich RNA-Stücke in die Zellen einbringen, welche auf post-transkriptionaler Ebene mit der Zielgenaktivität interferieren. Dies entspricht der Imitation einer „loss of function“-Mutante (Spiliotis et al., 2010).

1.2.3 Molekularbiologie und Genomik

Ein Meilenstein in der Erforschung der parasitären Helminthen war die vollständige Sequenzierung der Genome von *E. multilocularis* und *E. granulosus* (Tsai et al., 2013).

Gemeinsam mit den publizierten Analysen zum Transkriptom von *E. granulosus* (Parkinson et al., 2012) und den Genexpressionsprofilen in Oncosphären und Metacestoden von *E. multilocularis* (Huang et al., 2016) stellen die erhobenen Daten mächtige Werkzeuge zur Erforschung der Molekularbiologie der beiden Bandwürmer dar. Seit kurzem stehen nun auch umfangreiche Untersuchungen des Transkriptoms von *E. multilocularis* zur Verfügung (Herz & Brehm, Manuskript in Vorbereitung), welche weitere Einblicke in die Entwicklung des Parasiten und seine Anpassung an verschiedene Umwelten versprechen.

Während Genom und Teile des Transkriptoms von *E. multilocularis* mittlerweile bekannt sind, fehlen Möglichkeiten zur genetischen Manipulation des Organismus weitgehend. Eine genetische Veränderung des Bandwurmes ist bisher nur durch RNA-Interferenz bei Primärzellen (Spiliotis et al., 2010) und *Protoscolices* (Mizukami et al., 2010) möglich.

1.2.4 Wirt-Parasit-Interaktionen

Die Interaktion zwischen Wirt und Parasit ist ein komplexes Geschehen, das den direkten Kontakt beider Organismen ebenso einschließt wie Austausch auf zellulärer und molekularer Ebene. Direkter Kontakt zwischen dem Metacestoden von *E. multilocularis* und dem Lebergewebe des Wirts besteht zum Beispiel durch die sogenannte Laminatschicht. Diese azelluläre Schicht besteht vor allem aus Mucinen und wird von der synzytialen Germinalschicht sezerniert (Díaz et al., 2011). Vieles spricht dafür, dass Elemente der Laminatschicht tolerogen gegenüber Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Leber, sind (Díaz et al., 2015).

Eine andere Form der Wirt-Parasit-Interaktion betrifft evolutionär konservierte Signalwege. So konnte gezeigt werden, dass der Insulin-Rezeptor von *E. multilocularis* humanes Insulin bindet und für die Larvenentwicklung wichtige Signalwege aktiviert

(Hemer et al., 2014). Andere konservierte Signalwege der Wirt-Parasit-Interaktion betreffen beispielsweise den TGF- β /BMP- oder den FGF-Signalweg (Brehm & Koziol, 2017; Förster et al., 2019).

1.2.5 Stammzellsystem

Analog zu frei lebenden Plattwürmern besitzen auch die parasitären Cestoden eine besondere Zellpopulation, die als „germinative cells“ oder Germinalzellen bezeichnet worden ist: Es konnte gezeigt werden, dass sie die einzige Zellpopulation in *E. multilocularis* darstellt, die zur Teilung fähig ist; alle differenzierten Zelltypen müssen also aus ihnen hervorgehen (Koziol et al., 2014). Die Regenerationsfähigkeit des Organismus beruht auf diesem Zelltyp; im *in vitro*-Versuch war die Regeneration eines Metacestoden ausgehend von wenigen Zellen innerhalb von zehn Wochen zu beobachten (Spiliotis et al., 2008). Vor diesem Hintergrund erscheint es als wahrscheinlich, dass Stammzellen für beobachtete Rezidive der AE verantwortlich sind. Das wiederum gab Anlass zu der Vermutung, die gängige Therapie mit Benzimidazolen würde die entscheidende Stammzellpopulation aussparen. Es wurde daher betont, dass neue, potenziell parasitozide Substanzen immer auch auf ihre Wirksamkeit auf Stammzellen getestet werden sollten (Brehm & Koziol, 2014).

1.2.6 Phylogenetik

Die Gattung *Echinococcus* zählt zur Klasse der Bandwürmer (Cestoda). Anhand morphologischer und molekularer Merkmale konnte belegt werden, dass es sich dabei um ein monophyletisches Taxon handelt (Ehlers, 1986; Waeschenbach et al., 2012). Innerhalb des Stammes der Plathelminthes bilden die Cestoda gemeinsam mit den Klassen Trematoda (Saugwürmer) und Monogenea (Hakensaugwürmer) die Gruppe der ebenfalls monophyletischen Neodermata (Neuhäuter) (Egger et al., 2015; Koziol, 2017).

Der Name dieses Taxons leitet sich von der Neodermis ab, einem syncytialen Tegument, welche die larvale Epidermis nach Infektion des ersten Wirtes ersetzt (Ehlers, 1986; Tyler & Tyler, 1997) Die Entstehung der parasitären Neodermata wurde als der erfolgreichste Übergang zur parasitären Lebensform im Tierreich bezeichnet (Koziol, 2017). Die Klasse der Turbellaria (Strudelwürmer) markiert dagegen eine Gruppe freilebender Plattwürmer. Wichtige Vertreter sind *Schmidtea mediterranea* und *Dugesia japonica*, welche die klassischen Modelle für die wissenschaftliche Untersuchung von Geweberegeneration darstellen und als nicht parasitäre Referenzorganismen zu den Neodermata fungieren (Koziol, 2017).

Die Plathelminthes selbst sind eine Unterordnung der Protostomia (Urmünder) und werden mit anderen Phyla zum Überstamm der Lophotrochozoa – aufgrund einer spiralförmigen Morphologie in ihrer frühen Entwicklung auch Spiralia genannt – zusammengefasst (Koziol, 2017; Vgl. Abbildung 3).

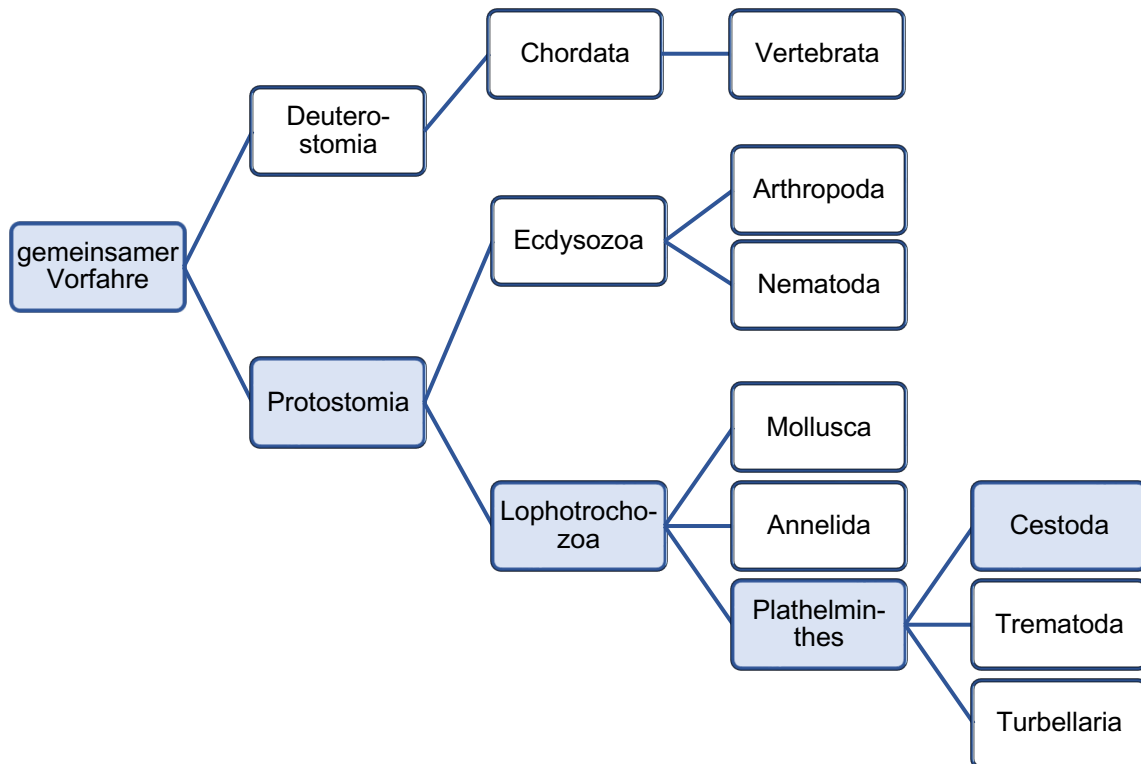


Abbildung 3: Überblick zur phylogenetischen Position der Bandwürmer (Cestoda)

Eigene Abbildung.

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und *E. multilocularis*

1.3.1 Oxidativer Stress/Sauerstoffstress

Zellstress in Folge von Sauerstoffeinfluss ist in der Biomedizin ein zentraler Forschungsgegenstand. Seine Beteiligung an der Entstehung neoplastischer, kardiovaskulärer, neurodegenerativer und metabolischer Erkrankungen des Menschen wird intensiv diskutiert (Pisoschi & Pop, 2015). Oxidativer Stress ist daher ein viel bemühtes Konzept, welches in den letzten Jahren mehrere Aktualisierungen erfuhr (Sies, 2018). Beschrieb die gängige Definition oxidativen Stress 1985 noch als „a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former“ (Sies, 1985), versucht die neue Definition als „an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the

oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage” (Sies & Jones, 2007) einer erhöhten Komplexität Rechnung zu tragen.

In Abhängigkeit von der Intensität oxidativen Stresses lässt sich in der Folge dieses Paradigmenwechsels besser von physiologischem oxidativem Eustress und toxischem oxidativem Distress sprechen. Während die Zelle sich gegen oxidativen Distress zur Wehr setzen muss, ist wird oxidativer Eustress mittlerweile als Teil physiologischer Signaltransduktionswege und der Regulation der Genexpression verstanden (Sies et al., 2017). Die Intensität oxidativen Stresses bemisst sich dabei in der Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die – von innen oder außen – auf die Zelle einwirken. Andere „reaktive Spezies“ wie zum Beispiel reaktive Stickstoff- oder Schwefelspezies (RNS/RSS) seien hier nur erwähnt, ohne dass an dieser Stelle weiter auf sie eingegangen werden kann.

Die Gruppe der ROS umfasst freie Radikale und chemisch stabile Verbindungen, die in der Lage sind, Lipide der Zellmembran, Proteine oder RNA und DNA zu oxidieren. Die am häufigsten genannten Vertreter sind das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und das stabile Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (vgl. Abbildung 4). Diese Moleküle entstehen physiologisch im Zuge aerober Prozesse wie der Zellatmung, aber auch bei immunologischen Reaktionen zur Abwehr des Parasiten durch den Wirt oder in Reaktion auf Umweltfaktoren wie Temperatur, Salzgehalt, pH-Wert oder Sauerstoffmangel (Pisoschi & Pop, 2015; Tomanek, 2015). Vor allem die Bedeutung von Wasserstoffperoxid bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren wie NRF2 oder NF- κ B und als Signalmolekül im Rahmen von oxidativem Eustress wird in der Literatur immer wieder hervorgehoben (Marinho et al., 2014; Sies, 2017).

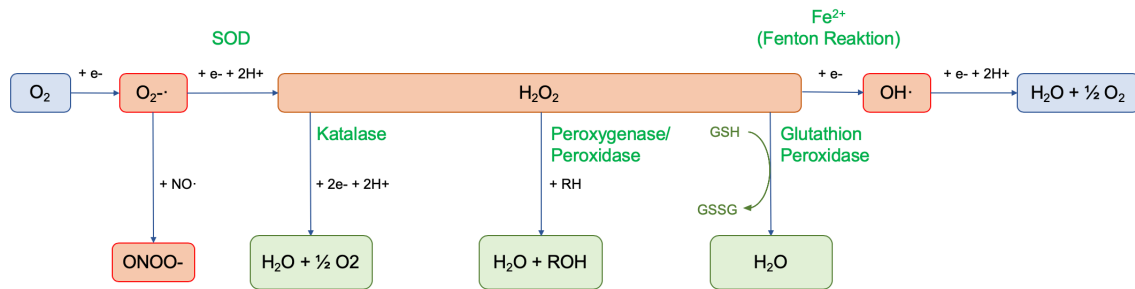
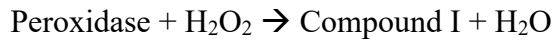


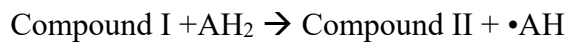
Abbildung 4: Überblick über die Entstehung und Abwehr von oxidativem Stress.

Die Abbildung zeigt eine Auswahl der Reaktionen, die zur Entstehung und der Bekämpfung oxidativen Stresses beitragen. In roter Farbe sind dabei die ROS Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) sowie RNS (nur Peroxynitrit $ONOO^-$) dargestellt. In grüner Schrift finden sich wichtige, an der Detoxifikation beteiligte Enzyme: Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Peroxygenase/Peroxidase und Glutathion-Peroxidase (Gpx), welche die Entgiftung über das nicht enzymatische Antioxidans Glutathion (GSH) unterstützt. Auch das zweiwertige Eisen ist an den entsprechenden Reaktionen beteiligt. Abbildung modifiziert nach Tomanek, 2015.

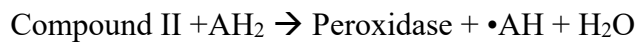
Den oxidativen Systemen stehen die antioxidativen Systeme der Zelle gegenüber. Unter Antioxidantien werden Moleküle oder Molekülgruppen verstanden, die die Oxidierung möglicher Substrate verzögern oder verhindern können, selbst wenn sie selbst in geringeren Konzentrationen vorliegen (Pisoschi & Pop, 2015). Die antioxidative Aktivität dieser Systeme beruht sowohl auf enzymatischen als auch nicht enzymatischen Mechanismen. Enzymatisch kann beispielsweise die Detoxifikation des Superoxid Anions zu Wasserstoffperoxid durch die Superoxid-Dismutase (SOD) erfolgen. (Häm-) Peroxidasen dagegen oxidieren Substrate wie zum Beispiel Proteine und reduzieren Wasserstoffperoxid dabei zu Wasser. Die typische Peroxidase-Reaktion erfolgt in drei Schritten:



(Reaktion 1)



(Reaktion 2)



(Reaktion 3)

Als wichtigster nicht enzymatischer Elektronenfänger ist die reduzierte Form des Glutathion (GSH) zu nennen.

1.3.2 Sauerstoffstress bei Plathelminthes und *Echinococcus spp.*

Die Entgiftungsmechanismen von ROS im Stamm der Plathelminthes weisen einige Besonderheiten auf. Den nicht-enzymatischen Systemen kommt dabei eine größere Bedeutung zu, darunter besonders den kleinen Molekülen Glutathion (GSH, GSSG in oxidierte Form), Thioredoxin (Trx) und Glutaredoxin (Grx), welche über die Schwefelatome von Cystein reduziert bzw. oxidiert werden können (Guevara-Flores et al., 2017). Diese Systeme unterscheiden sich in frei lebenden Plattwürmern wie den Turbellaria und den parasitären Neodermata: Parasitären Plattwürmern fehlen die beiden Enzyme Glutathion-Reduktase (GR) und Thioredoxin-Reduktase (TR), welche bei Planarien vorhanden und maßgeblich für die Regeneration von GSH, Trx und Grx verantwortlich sind (Otero et al., 2010). Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass TR und GR beim Übergang zur parasitären Lebensweise verloren gingen. Stattdessen findet sich in den Neodermata ein Enzym, welches als Selen-abhängige Thioredoxin-Glutathion-Reduktase (TGR) beschrieben wurde und beide Funktionen in einem Enzym vereinigt (Salinas et al., 2004; Rendón et al., 2004). Neben der Reduktion von GSSG und Trx liegt außerdem eine Deglutathionierungsaktivität vor, wobei Aktivität und die

Reaktion durchführende Domäne vom GSSG/GSH-Verhältnis in der Zelle abhängen (Bonilla et al., 2011).

Eine Katalase für die Dismutation von Wasserstoffperoxid bei Neodermata ist nicht beschrieben und konnte weder durch biochemische Methoden (Mkoji et al., 1988; Williams et al., 2013) noch in den Genomuntersuchungen nachgewiesen werden. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auf die Entgiftungskapazitäten bereits genannter Enzyme oder der Peroxiredoxine (Prxs) hingewiesen (Gretes et al., 2012). Bei Planarien wie *Dugesia japonica* und *Schmidtea mediterranea* konnten dagegen spezifische Katalasen nachgewiesen werden; interessanterweise bilden sie eine eigene phylogenetische Gruppe, welche sich von den Katalasen anderer Invertebraten unterscheidet (Zhang et al., 2018).

Für *E. multilocularis* konnte gezeigt werden, dass hohe Mengen H_2O_2 in Metacestodenvesikeln Apoptose auslösen (Cheng et al., 2015a). Untersuchungen proteomischer Veränderungen unter Einfluss unterschiedlicher Mengen von H_2O_2 bei *E. granulosus* zeichneten dagegen ein differenzierteres Bild. Überraschenderweise kam es unter H_2O_2 - Einfluss zu keinem Anstieg der klassischen Enzyme des antioxidativen Systems wie zum Beispiel der SOD (Cancela et al., 2019). Eine besondere Rolle in der Regulierung der Antwort auf oxidativen Stress scheint der Tumorsuppressor Emp53 („Wächter des Genoms“) zu spielen: Es wird vermutet, dass seine verstärkte Expression in der frühen Antwort auf Sauerstoffstress auch bei *E. multilocularis* die Expression antioxidativer Enzyme reguliert (Cheng et al., 2015b; Liu & Xu, 2011)

1.4 Peroxidasen vom DyP-Typ

Peroxidasen sind Gegenstand der Forschung seit über 80 Jahren. Viele von ihnen, wie zum Beispiel die Horseradish-Peroxidase (HRP), haben längst den Weg in die alltägliche,

biotechnologische Anwendung gefunden (Veitch, 2004). Die Mehrzahl dieser Oxidoreduktasen benötigen ein Häm-Molekül als prosthetische Gruppe (Banci, 1997). Traditionell teilte man die Häm-Peroxidasen in zwei Gruppen auf: in die Gruppe der Pflanzen-Peroxidasen und die der Tier-Peroxidasen (Welinder et al., 1992). 1999 stellte die Entdeckung einer neuartigen Klasse von Peroxidasen im Pilz *Bjerkandera adusta*, den Peroxidasen vom Dye-decolorizing Peroxidase-Typ (DyP-Typ), die bisherigen Klassifikationssysteme in Frage (Kim & Shoda, 1999). Zahlreiche DyP-Peroxidasen aus Archaeen, Pilzen und Bakterien wurden seitdem charakterisiert. Eingehendere Untersuchungen von DyP-Peroxidasen aus dem Tierreich fehlen dagegen bis heute.

DyP-Peroxidasen zählen zur Superfamilie der Chlorit-Dismutase/Peroxidase, welche die Chlorit-Dismutasen (Cld), die DyP-Peroxidasen sowie evolutionäre Zwischenstufen umfasst (Goblirsch et al., 2011; Zámocký et al., 2015). Die DyP-Peroxidasen selbst untergliedern sich in die vier Unterfamilien A, B, C und D. Angesichts mangelnder Kriterien für die Zuordnung zu und der geringen Übereinstimmung der Sequenzen zwischen den Klassen haben Yoshida und Sugano 2015 eine neue Einteilung vorgeschlagen, in der die Klassen C und D unter dem Kürzel V zusammengefasst werden; A wird zu I und B wird zu P (Yoshida & Sugano, 2015). In dieser Arbeit werden – soweit möglich – beide Klassen angegeben.

Der phylogenetische Ursprung der Superfamilie scheint in Unterfamilie DyP-A/I bei thermophilen fakultativ anaeroben Prokaryoten zu liegen. DyP-Peroxidasen von Eukaryoten befinden sich in der Unterfamilie DyP-B/P: Hinsichtlich ihrer Differenzierung postulieren Zámocký et al. einen wiederholten horizontalen Gentransfer (HGT) ausgehend von Proteobakterien. Das Vorhandensein von (bisher nicht charakterisierten) DyP-Peroxidasen in Plathelminthes erklären sie durch einen

horizontalen Transfer von niedrigeren eukaryoten Organismen auf höhere Eukaryoten wie zum Beispiel dem Stamm der Plathelminthes (Zámocký et al., 2015) (vgl. Abbildung 5).

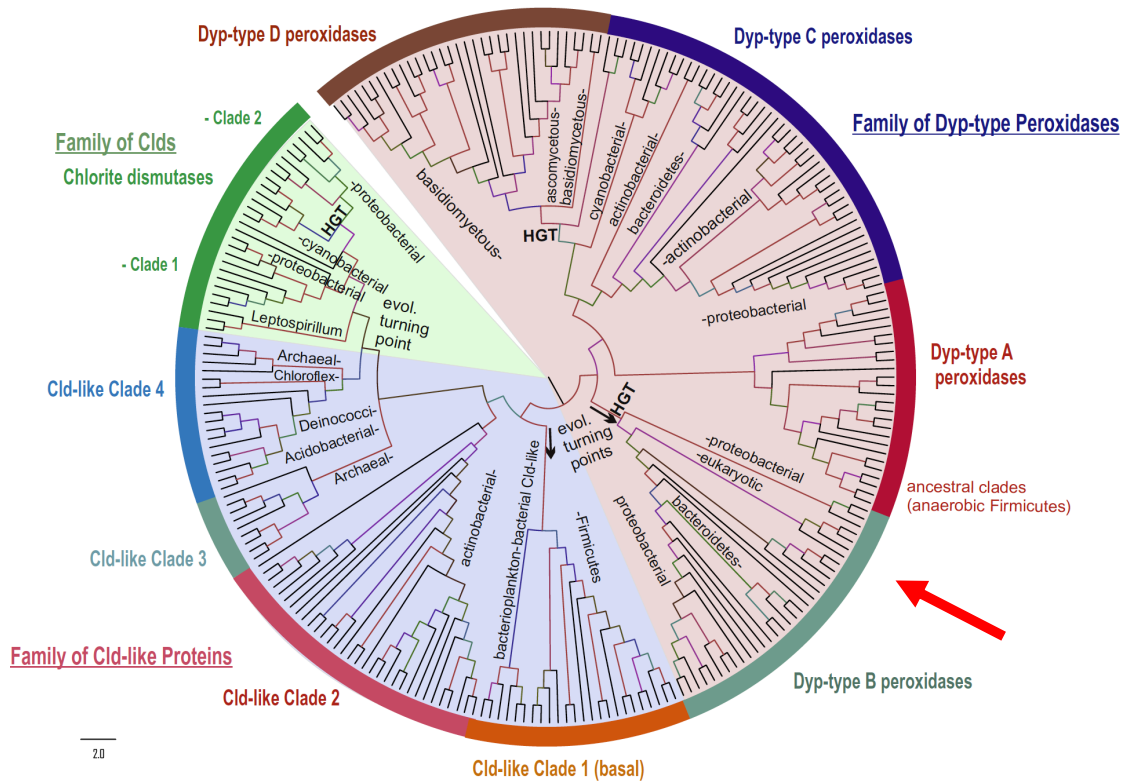


Abbildung 5: Phylogenetik der Cld-Superfamilie.

Der eingefügte rote Pfeil markiert die Position der eukaryotischen DyP-Peroxidasen in der DyP-B Unterfamilie. Außerdem nachzuvollziehen ist der eingezeichnete HGT, mit welchem die Autoren das Vorhandensein von DyP-Peroxidasen bei Eukaryoten erklären. Die Abbildung entstammt Zámocký et al., 2015.

Neben der phylogenetischen Zugehörigkeit lassen sich auch funktionelle Gemeinsamkeiten von DyP-Peroxidasen feststellen: Außer einem breiten Spektrum an Substraten zeigen DyP-Peroxidasen die Besonderheit, auch bei weit im sauren Milieu liegenden pH-Werten funktionsfähig zu bleiben (Yoshida & Sugano, 2015). Das Optimum von DyP, der ersten berichteten DyP-Peroxidase, liegt sogar bei pH 3,2 (Kim & Shoda, 1999). Außerdem scheinen DyP-Peroxidasen die einzige Gruppe an Peroxidasen zu sein, die in der Lage sind, Farbstoffe der Anthraquinon-Gruppe

abzubauen. Immer wieder wurde in diesem Zusammenhang auf ihr biotechnologisches Potential verwiesen (Colpa et al., 2014).

Während immer mehr DyP-Peroxidasen charakterisiert werden, bleibt ihre physiologische Rolle weiterhin unklar. Die fungalen Enzyme mit hocheffizienter Peroxidaseaktivität der Klasse D/V werden in der Regel sezerniert, was Anlass zur Vermutung gab, sie könnten eine Rolle in der Biokatalyse von Lignin spielen (Singh & Eltis, 2015; Liers et al., 2013). Neuere Erkenntnisse weisen außerdem auf eine Rolle im Abbau antifungaler Pflanzenstoffe hin (Sugawara et al., 2019). Interessanterweise wurde beim Archaeobakterium *Halobacterium salinarum* die Induktion einer DyP-Peroxidase als Antwort auf oxidativen Stress beobachtet (Kaur et al., 2010). Die entsprechenden Untersuchungen zeigten, dass diese DyP-Peroxidase in Abwesenheit anderer Peroxidasen an der Entgiftung von ROS beteiligt zu sein scheint und das Überleben in einer H₂O₂ reichen Umgebung verlängert.

Besondere Aufmerksamkeit erfuhren die beiden 2005 charakterisierten Proteine YfeX (YcdO) und EfeB (YcdB) von *Escherichia Coli*, von denen ersteres im Zytoplasma, zweiteres außerhalb der Zelle zu finden ist. EfeB scheint dabei vom bakteriellen Twin-Arginin Translocation-System (Tat) abhängig zu sein (Sturm et al., 2006). Ihre physiologische Bedeutung sahen Létoffé et al. in der Aufnahme von Eisenmolekülen aus dem Häm des Wirtes – und das ohne Zerstörung des Tetrapyrrol-Rings, was einer bisher unbekanntem und einzigartigen Fähigkeit entspräche (Létoffé et al., 2009). Diese Behauptung konnte nach den Arbeiten von Dailey et al. so nicht mehr aufrecht erhalten werden (Dailey et al., 2011). Wahrscheinlicher ist die von den gleichen Autoren vermutete Verbindung zu den Enzymen der Zellatmung unter anaeroben Bedingungen, unter welchen auch die höchste Induktion des Enzyms zu beobachten war (Dailey et al.,

2011). Eine weitere Vermutung sah die physiologische Bedeutung von EfeB in seiner Funktion als Peroxidase unter sauren Bedingungen (Sturm et al., 2006). Neuere Untersuchungen der Tat-abhängigen EfeB-Peroxidase bei *Streptococcus thermophilus* weisen wiederum auf eine Rolle der DyP-Peroxidase beim Schutz vor ROS hin (Zhang et al., 2015).

1.5 Zielsetzung

E. multilocularis ist der Erreger der potenziell tödlichen AE. Trotz der hohen Letalität der Parasitose ist die vorhandene Chemotherapie eine aus klinischer Sicht unzureichende Therapieoption; neue Chemotherapeutika werden dringend benötigt. In diesem Zusammenhang wurden unter anderem die Schutzmechanismen des Parasiten gegen ROS als vielversprechende pharmakologische Zielstrukturen beschrieben (Perbandt et al., 2014).

Eine wichtige Enzymgruppe bei der Entgiftung von ROS sind Katalasen. In Übereinstimmung mit den Genomen anderer parasitärer Plattwürmer konnte im Genom von *E. multilocularis* kein klassisches Katalase-Gen identifiziert werden. Die Hauptrolle in der Entgiftung von ROS bei *E. multilocularis* wird einer kombinierten TGR und dem Peroxiredoxin-System zugeschrieben (Gretes et al., 2012; Salinas et al., 2004).

Die Analysen des Genoms von *E. multilocularis* (Tsai et al, 2013) ergaben unter anderem ein Gen, welches Datenbankanalysen zur Folge für eine Peroxidase vom DyP-Typ codiert. Analysen des Transkriptoms (Brehm, mündliche Mitteilung) ergaben hohe Unterschiede in der Transkription dieses Gens in Abhängigkeit vom Stadium des Parasiten; vor allem der Anstieg in aktivierten Protoscolices sowie das Vorliegen von Transkripten im Metacestoden und ihr Rückgang bei Stammzelldepletion weckten das Interesse an der Peroxidase als potenzieller pharmakologischer Zielstruktur.

Unter Rückgriff auf bioinformatische, molekularbiologische und biochemische Methoden soll in dieser Arbeit ein Einblick in die Expression des codierenden Gens und die Biochemie der DyP-Typ Peroxidase von *E. multilocularis* erlangt werden. Es handelt sich dabei um die erste Charakterisierung einer DyP-Typ Peroxidase bei Tieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Software und Online-Tools

Im Rahmen der bioinformatischen Analysen kamen verschiedene Programme und Online-Anwendungen zum Einsatz. Auch zum Design geeigneter Primer wurde auf entsprechende Tools zurückgegriffen. Während die genaue Verwendung bei den entsprechenden Methoden besprochen wird, möchte Tabelle 1 einen Überblick über benutzte Software und Tools geben.

Tabelle 1: Software und Online-Tools

Bezeichnung	URL/Referenz [Zugriff im Februar 2020]
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Blast Local Alignment Search Tool	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
WormBase ParaSite	https://parasite.wormbase.org/index.html (Howe et al., 2016)
SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/ (Letunic & Bork, 2018)
Reverse Complement	https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Multiple Primer Analyzer	https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html
T-Coffee Multiple Alignment Tool	http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular
BoxShade (Bearbeitung von Alignments)	https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html
Protein molecular weight calculator	https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm
Protein isoelectric point calculator	http://isoelectric.org/calculate.php
Integrative Genomics Viewer	https://software.broadinstitute.org/software/igv/ (Robinson et al., 2017)

BioEdit (Biological sequence alignment editor)	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
MEGA X	https://www.megasoftware.net/ (Kumar et al., 2018)
SoftMax Pro 7.2	https://www.moleculardevices.com/en/assets/tutorials-videos/br/softmax-pro-7-software
StepOne™/StepOne Plus™ 2.3	Applied Biosystems
ImageJ	https://imagej.net/Welcome
PFAM	http://pfam.xfam.org/ , (El-Gebali et al., 2019)
UniProt	https://www.uniprot.org/ , UniProt Consortium, 2019)
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

2.1.2 Geräte

Verschiedene Geräte kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Sie wurden in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Modell und Hersteller
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T-Gradient (Biometra)
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
ChemiDoc	MP Imaging-System (Biorad)
Brutschränke	Incubat (Melag)
	Verschiedene (Heraeus, Thermo Electron, Langenselbold)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 (peqlab)
	SpectraMax® iD3 (Molecular devices)
Light-Cycler	Real-Time PCR (Applied Biosystems)
Schüttelinkubator	TH30 (Edmund Bühler)
Mikroskop	Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)
pH-Meter	Typ 530 (WTW)
Zentrifugen	Kühlzentrifuge RC 58+ (Heraeus, Thermo Electron, Langenselbold)
	Megafuge 1.OR (Heraeus, Thermo Electron, Langenselbold)
	Tischzentrifuge EBA 12 (Hettich)

Vortexer	REAX 2000 (Heidolph)
Heizblock	Liebisch, Bielefeld

2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterialien

Verschiedene Kits kamen in dieser Arbeit zum Einsatz. Sie sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Verbrauchsmaterialien, die nicht Teil der Kits waren, wurden in Tabelle 4 aufgeführt

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
KOD Hot Start DNA Polymerase	MERCK
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
PureLink™ RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific
Click-it™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kit	Invitrogen
SuperScript® IV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher
Pierce® ECL Western Blotting Substrate Kit	Thermo Fisher Scientific
5x HOT FIREPol® EvaGreen® RT-PCR Mix Plus	Solis Biodyne
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher
Direct-zol RNA Miniprep R2052	ZymoResearch
Pierce™ DAB Substrate Kit	Thermo Fisher
ProBond™ Resin	invitrogen
PD-10 Desalting Column	GE Healthcare

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Modell und Hersteller
Deckgläser	50x24 mm, Assistent
Objektträger	76x26x1 mm, Marienfeld
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Kanülen	Verschiedene, Braun
Spritzen	Verschiedene, Braun
Sterilfilter	S0.2, Nunc, Roskilde
Greiner-Röhrchen	Greiner, Nürtingen
Safe-Lock-Tubes	Eppendorf, Hamburg
96-Wellplatten	Greiner, Nürtingen

2.1.4 Vektoren und Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Bakterien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Für die entsprechenden Genkarten der verwendeten Plasmide sei auf Abbildung 6 und Abbildung 8 verwiesen.

Tabelle 5: Verwendete Vektoren und Bakterien

Vektor/Bakterium	Hersteller
pJET1.2/blunt Cloning Vector	Thermo Fisher Scientific
pET151D-TOPO (modifiziert)	Thermo Fisher Scientific
One Shot TOP10 Chemisch kompetente <i>E. Coli</i>	Thermo Fisher Scientific
BL21(DE3)	NEB

2.1.5 Stämme und Isolate von *E. multilocularis*

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit fanden unterschiedliche, im Labor kultivierte Isolate von *E. multilocularis* Verwendung (vgl. Tabelle 6). Wenn nicht anders angegeben entstammten alle Isolate ursprünglich einer infizierten *Macaca mulatta* und wurden bis zur Verwendung *ex vivo* in *Meriones unguiculatus* oder unter Kulturbedingungen gehalten.

Tabelle 6: Verwendete Isolate von *E. multilocularis*

Isolat	Entnommen am	Stadium/Verwendung
SUMA16		Metacestoden <i>ex vivo</i> aus dem Peritoneum/RT-PCR
H95	19/12/19	Metacestoden <i>ex vivo</i> aus infizierter Leber/RT-PCR
H95	14/6/19	Metacestoden <i>ex vitro</i> /14 Tage axenisch bzw. aerob kultiviert, dann WMISH und RT-PCR
RD15		Aktivierte Protoscolices/WMISH
GH09+H95+MB17		Primärzellen/WMISH
SUMA16		Aktivierte Protoscolices RNA/RT-PCR
LCS18	9/1/2020	Protoscolices/Katalase-Aktivitätsgel
H95	9/7/2019	Metacestoden <i>ex vitro</i> /Katalase-Aktivitätsgel
BN19 (Mensch)	28/1/2019	Metacestoden <i>ex vivo</i> aus Peritoneum/Katalase-Aktivitätsgel
(GH09	13/3/10	Primärzellen/RNAi-Versuch)

2.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma Sigma-Aldrich. Die Konzentration der Primer-Stammlösung betrug 50 µM. Die Konzentration von Primerstocks für die RT-PCR betrug 100 µM. Beim Design der Primer wurde auf eine Annäherung an die Schmelztemperatur von 58 °C geachtet (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Primer

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Erwartete Schmelztemperatur
IPOX +G forward	GATGATTACCAAATTGTCCG	59,3°C
IPOX WMISH F	GATGAAGACAACGAGTTGATAG	57,9°C
IPOX R2 +G	GTTACAGCAGGCTAAAACG	57,6°C
IPOX +G forward2	GATGAGTTACTCGAGTCG	57,5°C
IPOX qPCR F	ATTCGTCGATGGCCAGCA	68,0°C
IPOX qPCR R	GGAGGCAATCTTCTTCATGTCCG	66,9°C
IPOX qPCR F2	GTCAAACGTGATGCTGCG	64,4°C
IPOX qPCR R2	GATTTGAGGTGACTTTGTGTAGGC	64,7°C

xIPOX f	GAAAACCTGTATTTTCAGGGTAG	80,1°C
	TTACTCGAGTCGCCTGACAGA	
xIPOX r	GAAATCAGTTTCTGTTCTAGTTAC	78,3°C
	AGCAGGCTAAAACGCTTTCCA	

2.2 Bioinformatische Methoden

2.2.1 Analyse von Gen- und Proteinstruktur

Ein erster Eindruck über Länge, Lokalisierung und Struktur der Genvorhersage EmuJ_001133900 wurde mit Hilfe der Daten von WormBase ParaSite (WBPS) gewonnen. Das Ergebnis der Vorhersage wurde im Integrative Genomics Viewer mit den Transkriptomdaten (Herz & Brehm, Manuskript in Vorbereitung; Tsai et al., 2013) aus aktivierten *Protoscolices* und axenisch kultivierten Metacestoden verglichen.

Zur Analyse der Protein-Primärstruktur wurde das SMART-Tool der Universität Heidelberg eingesetzt. Um genauere Informationen zu aktiven Proteindomänen zu erhalten, wurde auf die PFAM- und Uniprot-Datenbanken zurückgegriffen.

2.2.2 Phylogenetische Analysen

Protein- und Gensequenzvergleiche wurden für alle Plathelminthes ebenfalls auf WBPS durchgeführt. Für andere Spezies wurde auf das Blast Local Alignment Search Tool des National Center for Biotechnology Information zurückgegriffen. Zur Bestimmung von homologen Genen und Proteinen waren ein kleiner e-value und eine ähnliche Länge der zu vergleichenden Sequenzen ausschlaggebend. Als Treffer akzeptiert wurde eine Sequenz immer dann, wenn sie in der SMART Analyse eine DyP-Domäne nach PFAM aufwies. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit MEGA X (Kumar et al., 2018) erstellt. Dies erfolgte nach der Neighbor-Joining Methode (Saitou & Nei, 1987) unter

Verwendung eines Bootstrap-Tests (Felsenstein, 1985) mit 500 Replikaten. Distanzen wurden nach der Poisson-Methode berechnet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Stücke wurden mit Hilfe von PCR amplifiziert. Verwendet wurde dafür das KOD Hot Start DNA Polymerase Kit (MERCK). Die Reaktion verlief nach unten stehendem Ansatz (vgl. Tabelle 8). Dabei wurde die Polymerase über 2 min bei 95°C aktiviert. Die Denaturierung erfolgte über 20 Sekunden bei 95°C. Zur Primerhybridisierung wurde die niedrigste Schmelztemperatur der beteiligten Primer gewählt (siehe 2.1.6), die Dauer betrug in der Regel 10 Sekunden. Zur Extension wurde eine Dauer entsprechend den zu synthetisierenden Basenpaaren gewählt: 20 s/kbp bei 70°C. Die finale Elongation erfolgte über 5 min ebenfalls bei 70°C. Die Anzahl der Zyklen betrug in der Regel 35.

Tabelle 8: Ansatz für PCR mit KOD Polymerase

Ansatz	Menge
10x Hot Start Buffer für KOD Polymerase	5 µl
25mM MgSO ₄	3 µl
2mM dNTPs	5µl
5'-Primer (10µM)	1,5 µl
3'-Primer (10 µM)	1,5 µl
cDNA	1 µl
KOD Polymerase	1 µl
dH ₂ O	Auf 50 µl auffüllen

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese dient dem Auftrennen von Nukleinsäure-Strängen in Abhängigkeit ihrer Größe und Masse. Dazu wurden 9 µl PCR-Produkt mit 1µl Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH) und 2 µl DNA Loading Dye (New England Biolabs) vermischt und auf 1% Agarose-Gel geladen. Als Puffer wurde

1x TAE Puffer verwendet. Zur Identifikation der Bandengröße wurden 10 µl des Markers SmartLadder (Eurogentec) mit 1 µl Midori Green gemischt und ebenfalls auf das Gel geladen. Alle Proben liefen anschließend bei einer Spannung von 150 Volt über 20 min.

2.3.3 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey Nagel). Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch im NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (peqlab). Als Blank diente der NE Buffer des Kits.

2.3.4 Ligation in Plasmid

Die Ligation der aufgereinigten DNA-Stücke in pJET 1.2/blunt (für die Genkarte des Vektors vgl. Abbildung6) erfolgte im Allgemeinen mit Hilfe des CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fischer). Einzige Ausnahme war die Klonierung mit dem Ziel der Proteinexpression (siehe 2.6, dort beschrieben).

Der untenstehende Ansatz (vgl. Tabelle 9) wurde auf Eis pipettiert, anschließend gemischt und für wenige Sekunden zentrifugiert. Die Ligation fand über 30 min bei Raumtemperatur (RT) statt.

Tabelle 9: Ansatz für die Ligation in pJET1.2/blunt

Komponente	Volumen
2x Reaction Buffer	10 µl
Aufgereinigtes PCR Produkt	100 ng
pJET1.2/blunt Cloning Vector (50ng/µl)	1 µl
Nuklease-freies H ₂ O	Auf 19 µl auffüllen
T4 DNA Ligase	1 µl
gesamt	20 µl

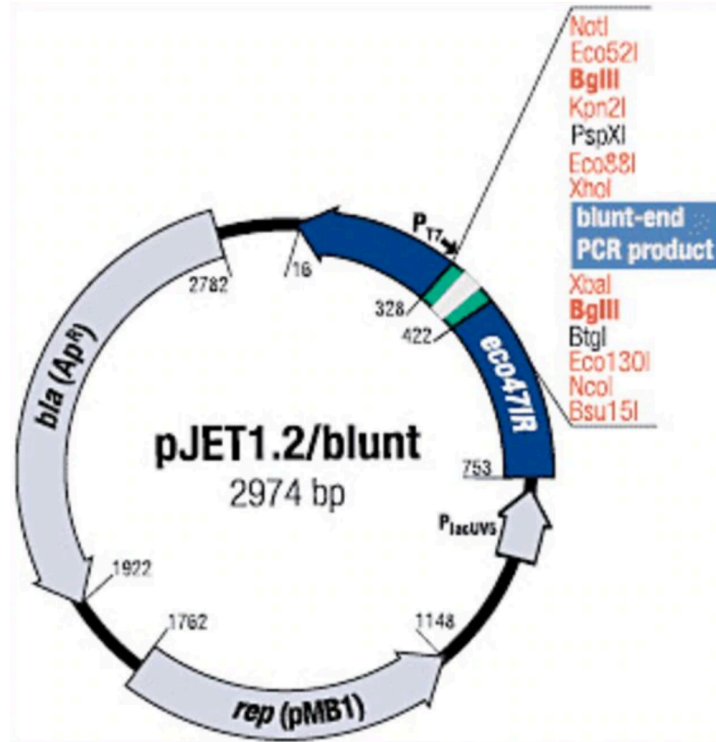


Abbildung 6: Genkarte des Vektors pJET 1.2/blunt (ThermoFisher). Die Abbildung stammt von der Seite des Herstellers: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231#/K1231> [Zugriff am 1.2.2020]

2.3.5 Transformation von chemisch kompetenten *E. Coli*

Direkt im Anschluss an die Ligation erfolgte die Transformation von chemisch kompetenten TOP10 *Escherichia Coli* (Thermo Fischer) mit dem Plasmid. Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut. Der Ansatz für die Ligation (siehe Tabelle 9) wurde anschließend zu den Bakterienzellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 45 sekundiger Hitzeschock bei 42°C und die erneute Inkubation auf Eis über 2 min. Abschließend wurde Soc-Medium (im Haus hergestellt) zu den Zellen gegeben und diese auf mit Carbapenicillin behandelten Agarplatten ausplattiert.

2.3.6 Klontest-PCR

Die Erfolgskontrolle von Ligation und Transformation erfolgte mittels Klontest-PCR. Dazu wurde ein Klon auf eine Pipettenspitze aufgenommen und beides in $30\ \mu\text{l}$ dH_2O

über 10 min bei RT geschüttelt. Die PCR auf dieses Klonwasser folgte dem unten aufgeführten Ansatz (vgl. Tabelle 10). Dabei wurde die Polymerase über 2 min bei 94°C aktiviert. Die Denaturierung erfolgte über 30 Sekunden bei 94°C. Zur Primerhybridisierung wurde eine Temperatur von 58°C gewählt, die Dauer betrug 30 Sekunden. Zur Extension bei 72°C wurde eine Dauer entsprechend den zu synthetisierenden Basenpaaren gewählt: 1 min für 1000 bp. Die Anzahl der Zyklen betrug in der Regel 25.

Tabelle 10: Ansatz für Klontest-PCR mit Taq-Polymerase

Ansatz	Menge
5x Green GoTaq Reaction Buffer (PROMEGA)	2 µl
20mM dNTPs	0,1µl
5'-Primer (50µM)	0,1 µl
3'-Primer (50 µM)	0,1 µl
Klonwasser	1 µl
Taq Polymerase	0,1 µl
dH ₂ O	Auf 10 µl auffüllen

2.3.7 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung/Mini erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits nach dem Protokoll für „Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.Coli*“. Die eluierte Menge wurde anschließend im NanoDrop ND-1000 (peqlab) spektrophotometrisch bestimmt. Als Blank diente der AE Buffer des Kits.

2.3.8 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen erfolgten im externen DNA-Labor. Zur Vorbereitung wurden 500 ng DNA mit 5 µM des entsprechenden Primers (T7 bzw. SP6 für pJET) gemischt und die Lösung mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software BioEdit und MEGA X.

2.3.9 Quantitative Realtime PCR

Die quantitative Realtime PCR (RT-PCR) eignet sich zur Quantifizierung von Nucleinsäuren. Während der Amplifikation entsteht ein Fluoreszenzsignal, welches vom Gerät, einer Kombination von Thermocycler, Lichtquelle und Lichtdetektionsmodul, gemessen wird.

Alle RT-PCR Untersuchungen wurden mit Hilfe des StepOne Plus Realtime PCR-Systems durchgeführt. Als Farbmix wurde 5x HOT FIREPol® EvaGreen® RT-PCR Mix Plus verwendet. Als Primer kam sowohl das Paar IPOX qPCR F und IPOX qPCR R, als auch IPOX qPCR F2 und IPOX qPCR R2 zum Einsatz. Vor dem Einsatz wurde mit jedem Primerpaar ein Effizienzlauf auf eine cDNA-Probe in den Verdünnungen 1:5, 1:25 und 1:125 durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde eine Standardkurve (lineare Regression) gebildet. Ein Primerpaar wurde akzeptiert, wenn seine Effizienz zwischen 90% und 110% lag. Weitere Voraussetzung war eine hohe Reliabilität und Präzision der Regression, welche sich durch einen Koeffizienten $R^2 > 0,98$ ausdrückte (vgl. Abbildung 7).

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die Genexpression mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu quantifizieren. Die Normalisierung des Zielgens erfolgte mit Hilfe eines internen Referenzgens, dem Housekeeping-Gen *emelp* (vgl. Leitschuh, 2014). Die Etablierung dieses Verfahrens im Labor geht auf Uriel Koziol zurück. Die Untersuchungen selbst erfolgte in Triplets und mit doppelter Negativkontrolle.

Das PCR-Programm umfasste 40 Zyklen mit unten angegeben Versuchsansatz (vgl. Tabelle 11). Dabei wurde die Polymerase über 15 min bei 95°C aktiviert. Die Denaturierung erfolgte über 15 Sekunden bei 95°C. Zur Primerhybridisierung wurde für beide Primerpaar die in den Effizienzläufen ermittelte Temperatur von 58°C gewählt, die

Dauer betrug in der Regel 20 Sekunden. Die Extension erfolgte über 20 Sekunden bei 72°C.

Die Auswertung erfolgte in StepOne™/StepOne Plus™ 2.3.

Tabelle 11: Ansatz für RT-PCR

Ansatz	Menge
cDNA 1:5	1,2 µl
5x HOT FIREPol® EvaGreen® RT-PCR Mix Plus	2,4µl
Primer 1	0,72 µl
Primer 2	0,72 µl
dH ₂ O	Auf 12 µl auffüllen; davon 10 µl pro Well

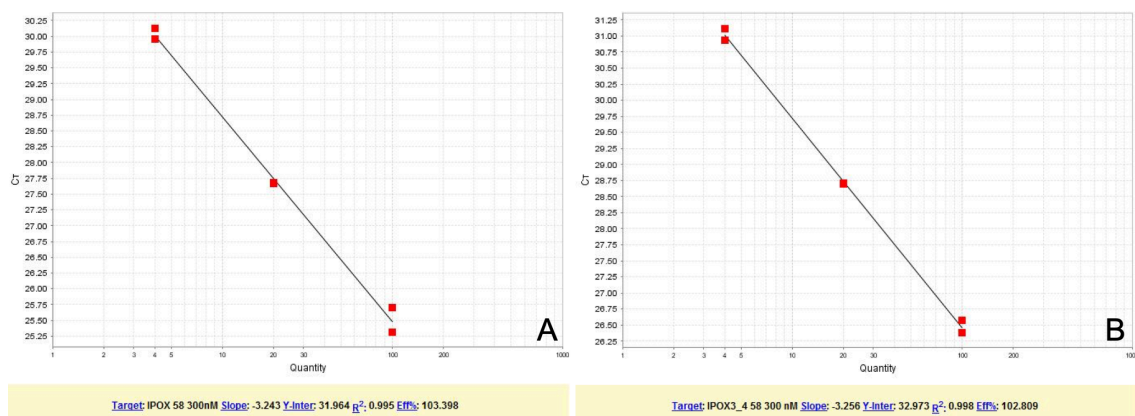


Abbildung 7: Standardkurven aus den Primer-Effizienzläufen in StepOne™/StepOne Plus™ 2.3. A: Standardkurve für die Primer IPOX qPCR F und IPOX qPCR R; die Effizienz beträgt 103,4% bei R²=0,995. B: Standardkurve für die Primer IPOX qPCR F2 und IPOX qPCR R2; die Effizienz beträgt 102,8% bei R²=0,998.

2.4 Arbeiten mit Parasitenmaterial

2.4.1 Isolierung von RNA aus Metacestoden

Die Isolierung von RNA aus Metacestoden erfolgte mit Hilfe des Direct-zol RNA Miniprep R2052 Kits (ZymoResearch). Die Vesikel waren zuvor über 14 Tage unter axenischen oder aeroben Kulturbedingungen gehalten worden. Aus je 2 ml Vesikel wurde

RNA nach dem im Labor etablierten Protokoll isoliert. 250 ng RNA wurden anschließend in cDNA umgeschrieben.

2.4.2 Isolierung von RNA aus mit *E. multilocularis* infizierter Leber von *M. unguiculatus*

Die Isolierung von RNA aus einer mit *E. multilocularis* infizierten Gerbilleber erfolgte mit Hilfe des TRIzol™ Reagent Kits (Thermo Fisher). 250 ng RNA wurden anschließend in cDNA umgeschrieben.

2.4.3 Umschrieb isolierter RNA in cDNA

Der Umschrieb von isolierter RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des SuperScript® IV Reverse Transcriptase Kits (Thermo Fisher) nach dem im Labor etablierten Protokoll.

2.4.4 Aktivierung von Proscolices

30 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wurde mit 250 µl HCL auf pH 2 gebracht. Dem Medium wurden 15 mg Pepsin, was einer Konzentration von 0,05% entspricht, zugegeben und die Lösung anschließend steril filtriert. Die zu aktivierenden Proscolices wurden in die Lösung gegeben über 30 Minuten bei 37° C und 125 RPM geschüttelt.

Nach der Inkubation wurde die Probe dreimal in PBS gewaschen, indem man das organische Material absinken ließ und den Überstand durch neues PBS ersetzte. Parallel wurde eine basische Lösung vorbereitet: Dazu wurden 60 mg Na-Taurocholat (0,02%) in 30 ml DMEM gelöst und anschließend steril filtriert. Der pH-Wert der Lösung sollte 7,4 betragen. Die Proscolices wurden in dieser Lösung über 3 Stunden bei 37°C und 125 RPM geschüttelt.

2.5 Whole-Mount *In Situ*-Hybridisierung

Die Whole-Mount *In Situ*-Hybridisierung (WMISH) dient dem Nachweis von RNA in Gewebeproben. Im Gegensatz zur konventionellen *In Situ* Hybridisierung ist es hier nicht

nötig, dünne Gewebeschnitte anzufertigen; Primärzellen, Protoscolices und Metacestoden können als Ganzes begutachtet werden. Eigens hergestellte RNA Sonden, die zum Transkript des Zielgens komplementär sind, binden die entsprechende mRNA. Mittels immunohistochemischer bzw. Fluoreszenz-Reaktionen kann schließlich das Gentranskript lokalisiert und beurteilt werden.

2.5.1 Herstellung und Aufreinigung von RNA-Sonden durch *In vitro* Transkription

Die RNA-Sonden wurden mit Hilfe der in 2.3.1 bis 2.3.8 beschriebenen Verfahren hergestellt. Als Primer dienten IPOX WMISH F und IPOX R 2 +G. Zur Herstellung der RNA-Sonden aus dem Plasmid mittels *In vitro*-Transkription wurde das in Tabelle 12 aufgeführte Protokoll verwendet.

Tabelle 12: Ansatz zur *In vitro* Transkription

Ansatz	Reaktionsbedingungen
2 µl 10x RNA Polymerase Reaction Puffer (thermo Fisher)	37°C über 2 Stunden
2 µl Dig RNA Labeling Mix (Roche)	
2 µl 10% BSA	
1 µg DNA	
2 µl T7 RNA Polymerase/SP6 Polymerase (Sigma-aldrich)	
0,5 µl RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (400 U/µl)	
20 µl dH ₂ O	

Übrig gebliebene DNA wurde nach 2 Stunden mit 1 µl RQI RNase freier DNase (Promega) bei 37°C über 15 Minuten verdaut. Die Aufreinigung der Proben erfolgte unter Verwendung des PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific).

2.5.2 Konzentrationsbestimmung der DIG-markierten RNA-Sonden mittels Dot blot

Vor Beginn der eigentlichen *In Situ*-Hybridisierung sollte die gewonnene Konzentration der Digoxigenin-markierten (DIG) RNA-Sonden überprüft werden. Diese Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Dot blot. Dazu wurden die Proben sowie eine

DIG-markierte Kontroll-RNA (Roche) auf Konzentrationen von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt. Je 2 μ l der Lösungen wurden auf eine Hybond N+ Membran (Amersham) pipettiert. Der Blot wurde eine Stunde bei 70°C und anschließend unter UV-Licht 1 min quervernetzt. In einer Petrischale erfolgte die weiteren Waschschriffe unter leichtem Schütteln. Der Blot wurde über 5 min in 5 ml Puffer B1 gewaschen und anschließend in 10 ml Puffer B2 über 20 min blockiert. Nach Entfernung des Puffers wurden 2 ml Puffer B1 zusammen mit Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragments (Roche) in einer 1:2000 Verdünnung auf den Blot pipettiert. Dieser wurde so für 20 min inkubiert. Der Blot wurde zweimal in 10 ml Puffer B1 gewaschen und dann einmal in Puffer B3. Anschließend wurde 1 ml Puffer B3 mit 20 μ l NBT-BCIP® Lösung (Sigma-Aldrich) auf den Blot gegeben und erneut über 5 min im Dunkeln inkubiert (für die Zusammensetzung der Puffer vgl. Tabelle 13). Abschließend wurde der Blot mit dH₂O gewaschen und getrocknet. In der *In Situ*-Hybridisierung kamen die RNA-Sonden in einer Konzentration von 0,2-1 ng/ μ l zum Einsatz.

Tabelle 13: Reagenzien zur Herstellung und Entwicklung des Dot blots

Reagens	Zusammensetzung
Puffer B1	100 mM TRIS HCl 100 mM NaCl pH 7,5
Puffer B2	Puffer B1 mit 0,5% Blockierreagens (Roche)
Puffer B3	100 mM TRIS HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ pH 9,5

2.5.3 EdU-Färbung und Prozessierung der Metacestoden für WMISH

Um sich in Teilung befindende Zellen im Parasitengewebe nachweisen zu können, wurde es mit 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) behandelt. Dazu wurde das Gewebe über 5 Stunden mit 50 µl EdU inkubiert. Anschließend wurde zweimal in PBS (mit DEPC Wasser) gewaschen. Im Falle der Metacestoden wurde das Gewebe folgendermaßen weiter prozessiert: Die Vesikel wurden in eine Petrischale gegeben und mit zwei scharfen Pinzetten sukzessive eröffnet. Anschließen wurden sie in ein 15 ml Greiner Röhrchen überführt. PBS (DEPC) wurde durch 10 ml 4%PFA/PBS (DEPC) ersetzt und die Vesikel wurden über Nacht bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Vesikel über 10 min und bei RT in 100% Methanol gewaschen und dann in frischem 100% Methanol bei -20°C eingefroren.

2.5.4 Nachweis der Ziel-mRNA mittels WMISH

Die WMISH wurde mit Primärzellen, aktivierten Protoscolices und Metacestoden-Vesikeln durchgeführt. Nachfolgend wird das Verfahren für die WMISH auf Metacestoden-Vesikel beschrieben (vgl. Tabelle 14). Wo das Protokoll für Primärzellen bzw. Protoscolices davon abweicht, wird gesondert darauf hingewiesen. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Waschschrte bei RT auf einem Schüttler bei 150 RPM oder bei abweichender Temperatur im Eppendorf thermomixer bei 600 RPM durchgeführt. Im Fall von Primärzellen oder Protoscolices folgte jedem Waschschrte eine Zentrifugation für 1 min bei 100g.

Am ersten Tag der WMISH wurden die Proben in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 5 min in 100% EtOH, 10 min in 75% EtOH/H₂O und 10 min in 50% EtOH/H₂O. Es folgte drei Waschschrte über je 5 min in PBS-T. Anschließend wurden die Proben über 10 min in PBS-T mit 0,015µg/µl Proteinase K (Fermentas) bei RT und

ohne Schütteln inkubiert. Die Proteinase wurde durch zweimaliges Waschen in 0,1 M Triethanolamin (TEA) über 5 min bei pH 7,8 und mehrmaligem Invertieren der Proben entfernt. Zum zweiten Waschschrift wurden 12,5 µl Acetanhydrid hinzugegeben. Danach folgten weitere 12,5 µl Acetanhydrid. Nach 5 min Inkubation wurde zwei Mal unter leichtem Schütteln in PBS-T gewaschen. Die Proben wurden im Anschluss an den Proteinase vermittelten Verdau erneut fixiert. Dies erfolgte in 4% PFA/PBS-T über eine Dauer von 20 min unter leichtem Schütteln und gefolgt von erneutem fünfmaligem Waschen in PBS-T über je 5 min. Zu je 2 ml PBS-T wurden 500 µl Hybridisierungspuffer gegeben und die Proben in unterschiedliche Gefäße aufgeteilt. Es folgte ein Waschschrift in 500 µl Hybridisierungspuffer und eine Inkubation in frischem Hybridisierungspuffer bei 60°C über 10 min bei 600 RPM. Der Hybridisierungspuffer wurde durch neuen Hybridisierungspuffer ersetzt, welcher zuvor auf die Temperatur von 60°C erwärmt worden war. Darin verblieben die Proben über Nacht bei 60°C und 600 RPM.

Am zweiten Tag wurde die DIG-markierte RNA-Sonde (0,2-1 ng/µl, wie im dot blot gemessen) 3 min lang bei 80°C denaturiert, auf Eis heruntergekühlt und dann in 495 µl auf 58°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer gegeben. Im Falle der wiederholten Benutzung der gleichen Sonde erfolgte ebenfalls eine Denaturierung, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei 58°C. Anschließend wurde die Sonde zu den Proben gegeben, welche über Nacht bei 58°C und 600 RPM zur Hybridisierung belassen wurden.

Am dritten Tag wurde der Hybridisierungspuffer mit der Sonde entfernt und bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden zweimal in 1 ml auf 58°C vorgewärmtem Hybridisierungspuffer gewaschen, je 10 min bei 600 RPM. Die Proben wurden anschließend dreimal in 1 ml auf 58 °C vorgewärmtem 2x SSC + 0,1% Tween-20 bei 58°C gewaschen, je 20 min bei 600 RPM. Es folgten erneut drei Waschschrift in 1 ml

auf 58°C vorgewärmtem 0,2x SSC + 0,1% Tween, je 30 min bei 600 RPM. Die Proben wurden in der Folge zweimal für 15 min bei RT in 1 ml MAB-T + 1% Blockierreagens gewaschen und anschließend in 500 µl MAB-T + 1% Blockierreagens + 5% Schafsserum bei RT für 2 Stunden unter leichtem Schütteln blockiert. Diese Blockierlösung war vorher für 30 min auf 60°C erhitzt worden, um das Schafsserum zu inaktivieren. Vor der Zugabe zu den Proben war es auf Eis wieder heruntergekühlt worden. Nach dem Blocken wurden die Proben über Nacht bei 4°C und 600 RPM mit 500 µl MAB-T + 1% Blockierreagens sowie einer 1:50 Verdünnung des Roche Anti-DIG Peroxidase (POD) Konjugats inkubiert.

Am vierten Tag schließlich wurde der Antikörper entfernt und die Proben wurden viermal über 5 min in 1 ml MAB-T gewaschen, sowie weitere dreimal über 1 Stunde. Die Proben wurden einmal über 3 min in PBS + 0,1 M Imidazol, pH 7,6, sowie ein weiteres Mal über 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Proben über 5 min im Dunkeln und bei RT in folgender Färbelösung inkubiert: PBS + 0,1 M Imidazol, pH 7,6 mit Fluorescein Tyramide in einer Verdünnung von 1:100 und 0,001% H₂O₂. Dabei wurden die Proben nicht geschüttelt, sondern lediglich durch vorsichtiges, zehnmaliges Kippen durchmischt. Der Farbreaktion folgten fünf Waschschrte in PBS-T über 5 min bei RT und im Dunkeln. Optional folgten nun die EdU-Detektierung (siehe 2.5.5) und das Anfärben mit 4',6-Diaminidino-2-Phenylindol (DAPI) (siehe 2.5.6). Das Aufdecken der Proben erfolgte mittels Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich) und die Deckgläschen wurden mit Nagellack versiegelt.

Tabelle 14: Herstellung der Reagenzien für die WMISH

Reagens	Herstellung
H ₂ O (DEPC)	dH ₂ O 0,1% DEPC Das DEPC behandelte Wasser wurde über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert.
PBS (DEPC)	PBS, sonst wie H ₂ O (DEPC)
4% PFA in PBS (DEPC)	2g Paraformaldehyd Dazu 50 ml PBS (DEPC)
PBS-T	PBS (DEPC) 0,1% Tween-20
10% Tween-20	1 ml Tween-20 (Sigma-Aldrich) Dazu 10 ml H ₂ O (DEPC)
Proteinase K (Fermentas, Thermo Scientific)	
0,1 M Triethanolamin (TEA), pH 7-8	0,1 M TEA pH mithilfe von HCl auf 7-8 eingestellt dazu 50 ml H ₂ O (DEPC)
Acetanhydrid (Sigma-Aldrich)	
Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5x SSC (Stock: 20x SSC) Torula RNA (1mg/ml; Stock 100mg/ml) 1x Denhardt-Lösung 0,1% Tween-20 (Stock: 10%) 0,1% CHAPS (Stock: 20%) Dazu 50 ml H ₂ O (DEPC)
Formamid	
20x SSC	175,3g NaCl (Sigma-Aldrich) 88,2 Trinatriumcitrat (Sigma-Aldrich) pH auf 7,0 0,1% DEPC Dazu 1000 ml H ₂ O (DEPC) Das 20x SSC wurde über Nacht verrührt und zweimal autoklaviert.
2x SSC	5 ml 20x SSC Dazu 50 ml H ₂ O (DEPC)
0,2x SSC	0,5 ml 20x SSC

	Dazu 50 ml H ₂ O (DEPC)
Torula RNA	(siehe unten)
3 M Natriumacetat, pH 5,2	24,6 g Natriumacetat pH auf 5,2 dazu 100 ml H ₂ O (DEPC)
Heparin (50mg/ml) stock (Sigma-Aldrich)	0,25 g Heparin Dazu 5 ml steriles H ₂ O
Denhardt-Lösung, 50x Konzentrat (Sigma-Aldrich)	
20% CHAPS (Sigma-Aldrich)	10 g CHAPS Dazu 50 ml H ₂ O (DEPC)
Maleinsäure Puffer + 0,1% Tween 20 (MAB-T)	8,77 g NaCl 11,6 g Maleinsäure Der pH wurde auf 7,5 eingestellt. 1000 ml H ₂ O (DEPC) wurden hinzugegeben. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Zu den 50 ml Greinergefäßen bei RT wurden 0,1% Tween-20 zugegeben.
MAB-T + 1% Blockierreagens (Roche)	
MAB-T + 1% Blockierreagens (Roche)+ 5% Schafsserum (Sigma-Aldrich)	
Anti-Digoxigenin-POD, Fab Fragments (Roche)	
PBS + 0,1 M Imidazol, pH 7,6	6,8 g Imidazol Dazu 1000 ml PBS (DEPC) Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Die Torula RNA wurde wie folgt hergestellt: 1 g Torula RNA wurde in 50 ml H₂O (DEPC) gelöst und auf 4 50 ml Greiner Röhren aufgeteilt. Zu jedem Röhren wurden 12,5ml einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung in einem Verhältnis von 25:24:1 gegeben. Die Lösungen wurden gut durchmischt und über 20 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue Röhren überführt, zu denen 12,5 ml Chloroform gegeben wurde. Die neue Lösung wurde erneut über 20

min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Noch einmal wurde der Überstand in neue Röhren überführt, zu denen nun 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat bei pH 5,2 sowie 2,5 Volumen an 100% EtOH gegeben wurden. Wieder wurde über 20 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Nun wurden die Pellets mit der Pipettenspitze in frische 15 ml Greiner Röhren überführt und zweimal in 5 ml 75% EtOH gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation über 10 min bei 10000 g und 4°C. Der EtOH wurde entfernt und die Pellets bei 42°C über 20 min getrocknet. Im Anschluss wurden die Pellets in 1 ml H₂O (DEPC) gelöst. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nanodrop ND-1000 (peqlab). Abschließend wurde die Lösung auf 100mg/ml verdünnt.

2.5.5 EdU-Detektierung

Im Rahmen der Zellteilung eingelagertes EdU wurde mithilfe des Click-it™ EdU Alexa Fluor™ 555 Imaging Kits (Invitrogen) detektiert. Hierzu wurden die Proben zweimal über 10 min in 1 ml 3% BSA/PBS gewaschen und anschließend über 20 min in 1 ml PBS mit 0,5% Triton X-100 durchlässig gemacht. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 1 ml 3% BSA/PBS über 10 min. Die eigentliche Detektierung erfolgte in der in Tabelle 15 genauer beschriebenen Click-iT Reaktion. Die entsprechenden Komponenten wurden wie vom Hersteller vorgegeben in der genannten Reihenfolge zugegeben. Die Proben wurden also über 10 min in 500 µl Click-iT Ansatz belassen (vgl. Tabelle 15). Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift in 3% BSA/PBS.

Tabelle 15: Ansatz der Click-iT Reaktion

Reaktionskomponente	Volumen
1x Click-iT reaction buffer	430 µl
CuSO ₄ (Component E)	20 µl
Alexa 555 Fluor azide	1,2 µl
Reaction buffer additive	50 µl

2.5.6 Anfärben mit DAPI

Nach der EdU Detektierung (siehe 2.5.5) wurden die Proben mit DAPI angefärbt. Dazu wurden sie unter leichtem Schütteln über 10 min in 1 ml PBS-T mit $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DAPI inkubiert. Um überschüssiges DAPI zu entfernen, wurde anschließend viermal über 10 min mit PBS-T gewaschen.

2.5.7 Aufnahme und Auswertung der Bilder

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), die Auswertung dann mit Hilfe der Software ImageJ (Fiji). Dazu diente die sense-Probe als Kontrolle: Im Color Balance-Menü wurde die Intensität des Farbkanals für die sense-Probe so weit heruntergedreht, bis das Signal für die Ziel-mRNA auf den sense-Bildern nicht mehr oder kaum noch zu erkennen war. Die gleiche Intensitätseinstellung wurde dann für die Aufnahmen mit der antisense-Probe übernommen.

Die Auswertung erfolgte zum einen qualitativ, zum anderen quantitativ durch Auszählung. Zu Grunde lagen die Fotos und Ausschnitte, welche Monika Bergmann aufgenommen hatte. Die Aufnahmen waren in Schnittebenen im Abstand von $2\mu\text{m}$ erfolgt. Die Auszählung selbst erfolgte dagegen in Schnittebenen im Abstand von $4\mu\text{m}$, da manche Signale $2\mu\text{m}$ durchschienen und so doppelt gezählt worden wären. Es wurden sechs *Protoscolices* ($0,2\text{ mm}^2$), sowie $0,32\text{ mm}^2$ an Vesikeln und $0,28\text{ mm}^2$ an Primärzellen ausgezählt. Die Bestimmung der Fläche erfolgte in ImageJ mit Hilfe des Lasso-Tools und Strg-M.

2.6 Genexpression, Proteinaufreinigung und -nachweis

2.6.1 Aquacloning in modifizierten pET151D-TOPO-Vektor und TOP10

Mit Hilfe der Primer xIPOX f und xIPOX r wurde das später als *emipox* benannte Gen amplifiziert und das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (vgl. 2.3.1 bis 2.3.3). Die Ligation und Transformation erfolgten mit der von Beyer et al. beschriebenen Methode des Aquacloning (Beyer et al., 2015) in einen im Labor von Markus Spiliotis modifizierten pET151D-TOPO-Vektor (thermo fisher) und chemisch kompetenten TOP10-Bakterienzellen (thermo fisher). Die Veränderungen des Vektors wurden in Abbildung 8 dargestellt. Die durchgestrichene Region wurde durch die unten angegebene Basensequenz ersetzt.

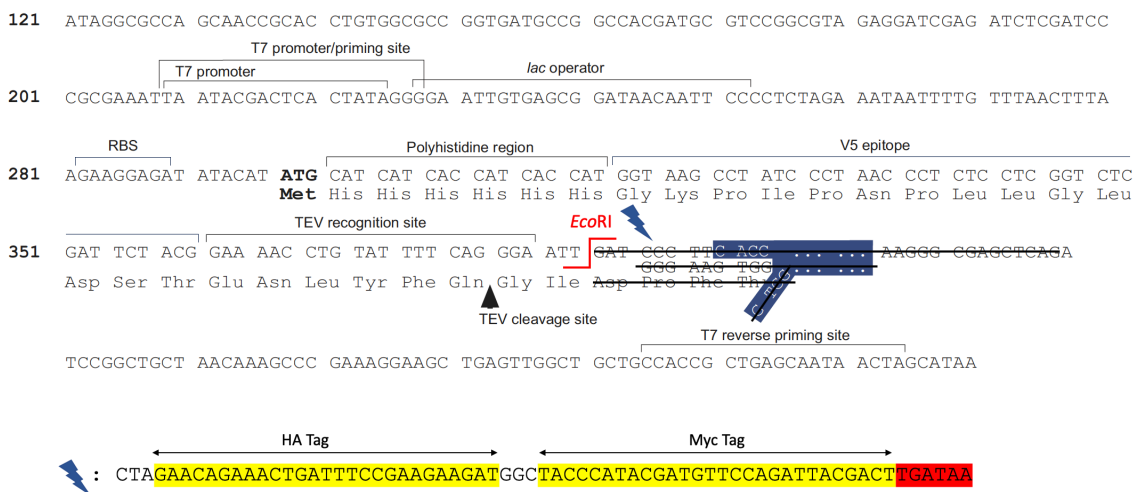


Abbildung 8: Modifizierter pET151D-TOPO-Vektor zu Genexpression.

Auf die ausplattierten Bakterienzellen erfolgten Klontest-PCR, Plasmidisolierung und Sequenzierung positiver Klone wie in 2.3.6 bis 2.3.8 beschrieben.

2.6.2 Umtransformation in BL21 (DE3) und Induktion der Genexpression

Plasmide mit positivem Sequenzierungsergebnis wurden mit BL21 (DE3) (NEB) transformiert und die Bakterienzellen ausplattiert. Die Transformation erfolgte analog zu

der in 2.3.5 beschriebenen Transformation von chemisch kompetenten TOP10 Zellen. Die Platten mit BL21 (DE3) wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Klone mit einer Pipettenspitze abgenommen und mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) (1:1000) in 50 ml LB -Medium gegeben. Die Mischung verblieb über 3 Stunden bei 37°C im Schüttler. Anschließend wurde sie in 1,5ml große Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Der Nachweis der Induktion erfolgte mittels SDS-PAGE und Western blot wie unten beschrieben.

Alle weiteren Induktionen der Genexpression erfolgten mit Hilfe der in Tabelle 16 beschriebenen Induktionsmedia. Dazu wurden 10 ml Induktionsmedium B und 500 ml Induktionsmedium A mit den entsprechenden Klonen in einen großen Erlenmeyerkolben gegeben (vgl. Tabelle 16). Das Gemisch wurde über fünf Stunden bei 37°C mit 150 RPM geschüttelt; anschließend wurde auf 120 RPM verringert und bis zum nächsten Morgen weiter geschüttelt.

Die resultierende Bakteriensuspension wurde in 50 ml Greiner-Röhrchen aliquotiert und bei 22 000g über 10 min abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Tabelle 16: Induktionsmedia für Genexpression in BL21 (DE3)

Induktionsmedium	Zusammensetzung	Menge
Induktionsmedium A	Phosphat Buffer (pH 7,2):	
	Na ₂ HOP ₄	6g
	KH ₂ PO ₄	3g
	Pepton	20g
	Hefe-Extrakt	5g
	NaCl	5g
	H ₂ O	Auf 1L auffüllen
Induktionsmedium B	Glycerol	25g
	H ₂ O	73ml
	Glucose	2,5g
	α -Lactose Monohydrat	10g

2.6.3 Proteinaufreinigung

Die Lyse der BL21 (DE3)-Zellen und die Aufreinigung des Proteins folgten über weite Strecken dem von Liu et al. veröffentlichten Protokoll (vgl. Liu et al., 2011).

Die aufgetauten Bakterienpellets wurden in Lyse-Puffer (vgl. Tabelle 17) gelöst. Die Lyse erfolgte durch Ultraschall über 60 Sekunden bei einer Amplitude von 60%. 100 mg Häm (Sigma Aldrich) wurden in 6 ml NaOH gelöst und lichtgeschützt verpackt. 10 ml der Lysesuspension wurden mit 20 µl der Hämlösung über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein leichter Farbumschlag ins Rote war ersichtlich. Anschließend wurde die Suspension in 2ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und über 20 min bei 28 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht mit ProBond™ Resin (invitrogen) bei -4°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Proben über 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert und der Überstand erneut abpipettiert. Das Pellet wurde in Lysepuffer gelöst und in eine PD-10 Desalting Column (GE Healthcare) transferiert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem mitgelieferten Gravity Protocol, wobei anstelle eines Waschpuffers der Lysepuffer eingesetzt wurde. Eluiert wurde das Protein schließlich mit Elutionspuffer.

Eine Konzentrationsbestimmung der eluierten Proteinlösung erfolgte im NanoDrop ND-1000 (peqlab). Als Blank diente der Elutionspuffer.

Das Protein konnte über den Zeitraum der Arbeit problemlos bei 4°C gelagert werden.

Tabelle 17: Zur Proteinaufreinigung verwendete Reagenzien

Reagens	Herstellung
Lysepuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8 200 mM NaCl 1 mM PMSF (in DMSO gelöst)
Elutionspuffer	Lysepuffer 250 mM Imidazol

2.6.4 Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinen wurden 10%-Polyacrylamidgele eingesetzt, die sich jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngelanteil zusammensetzten (vgl. Tabelle 18 und 19). Die mit IPTG behandelte Bakteriensuspension wurde 10 min bei 22 000g zentrifugiert, in 400 µg 2X STOP-Mix aufgenommen und über 5 Minuten gekocht. Anschließend wurde sie erneut 5 Minuten bei 22000 g zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen, das sich dazu im entsprechenden Laufpuffer befand. Zum Auftrennen der Proben wurde elektrischer Strom von 150V bei 36mA über eine Stunde angelegt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

	Sammelgel	Trenngel
Upper TRIS	1,3 ml	-
Lower TRIS	-	3,75 ml
Acrylamid-Stammlösung 30%	750 µl	6,25 ml
Wasser	3,3 ml	4,75 ml
APS 10%	35 µl	80 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Anschließend wurde das Gel aus seiner Halterung entnommen und für 15 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung bei leichtem Schütteln inkubiert. Das Gel wurde solange in Wasser entfärbt, bis die entsprechenden Banden sichtbar wurden.

Tabelle 19: Für die Herstellung der Polyacrylamidgele verwendete Reagenzien

Reagens	Herstellung
Lower TRIS	1,5 M Tri(hydroxymethyl)-aminomethan 0,4% SDS Der pH wurde auf 8,8 eingestellt, 1000ml Wasser hinzugegeben.
Upper TRIS	0,5 M Tri(hydroxymethyl)-aminomethan 0,4% SDS Der pH wurde auf 6,8 eingestellt, 1000ml Wasser hinzugegeben.
10% APS	0,5 g Ammoniumpersulfat 5 ml Wasser wurden hinzugegeben.
Laufpuffer	100 ml 10X Laemmli 10 ml 10% SDS 1000 ml Wasser wurden hinzugegeben. Der Laufpuffer wurde nicht öfter als drei Mal verwendet.
10X Laemmli	1,92 M Glycin 250 mM TRIS 1000 ml Wasser wurden hinzugegeben.
Probenpuffer (2X STOP Mix)	10 ml 250 mM TRIS, pH 6,8 4 ml Glycerol 4 ml 20% SDS 2 ml beta-Mercaptoethanol 0,02 % Bromphenolblau

2.6.5 Proteinnachweis mittels Western-Blot

Durch das Anlegen von horizontalem, elektrischen Strom mit einer Spannung von 141 Volt und einer Stromstärke von 350 mA wurde das Protein im entsprechenden Blotting Puffer (vgl. Tabelle 20) auf eine Porablot Nitrocellulose Membran (Macherey-Nagel) gebロットet. Die Membran wurde anschließend in einer Lösung aus 5%-Magermilch in TBS-T 1 Stunde bei RT und unter leichtem Schütteln blockiert. Zusammen mit einer Lösung aus 2 ml TBST/Magermilch und 0,8 µl Anti-V5-AP Antikörper (invitrogen)

wurde die Membran eingeschweißt und über Nacht bei 4°C und unter leichtem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran aus der Folie entnommen und 5-mal für je 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Band wurde durch Zugaben von 3 ml Puffer B3 (siehe 2.5.2) mit 30µl NBT-BCIP® (Sigma) (als Substrat der Alkalischen Phosphatase) sichtbar gemacht.

Tabelle 20: Für den Western Blot verwendete Reagenzien und Antikörper

Reagens/Antikörper	Herstellung
Blotting Puffer	80 ml 10X Laemmli Puffer 200 ml Methanol Mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen
5% BSA/TBS-T	2,5 g Albumin FractionV (pH 7,0) BSA (BSA, Applichem) Mit TBS auf 50 ml auffüllen
10X TBS	200 mM Tris-HCl pH 8,0
1X TBS-T	1,5 M NaCl 1X TBS 0,05% Tween-20
Anti-V5-AP (1:2000 v/v) (invitrogen)	
NBT-BCIP® (Sigma)	

2.7 Spektrophotometrie und Aktivitätsassays

Alle spektrophotometrischen Untersuchungen wurden am SpectraMax® iD3 unter Zuhilfenahme der Software SoftMax Pro 7.2 durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten in Triplets.

2.7.1 Makroskopische Einschätzung der Reaktion mit RB19

Um das für den Nachweis von DyP-Peroxidasen etablierte Substrat RB19 zu testen, wurde folgender Versuchsaufbau verwendet: Zu 30 µl 25 mM TRIS Puffer, welcher auf den pH4,2 eingestellt worden war, wurden 1,5 µl einer 20 mM RB19-Lösung und 1 µl

einer 30 %-H₂O₂- Lösung gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl aufgereinigtem Enzym in der Konzentration 8,4 mg/ml gestartet.

Das Ergebnis wurde makroskopisch (Entfärbung?) beurteilt.

2.7.2 Spektrophotometrische Messung der Extinktion bei der Reaktion mit DAB

Zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität mittels Spektrophotometrie wurde das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eingesetzt. Da DAB nach der Oxidation einen in Wasser unlöslichen, braunen Farbstoff bildet, wurde die Messung nach dem von Fahimi und Herzog beschriebenen Verfahren (Fahimi & Herzog, 1973; Herzog & Fahimi, 1973) in 0,1%-Gelatine durchgeführt (vgl. Tabelle 21). Die Autoren führen an, dass das Absorptionsspektrum des Oxidationsprodukts pH-abhängig zwischen 465 nm und 445 nm liegt. Die Gelatinelösung mit DAB zeige keine Absorption im Bereich zwischen 400 nm und 700 nm.

150 mg Gelatine (MERCK) wurden in 75 ml auf 70°C erhitztem, destilliertem Wasser gelöst. Unter konstantem Rühren kühlte die Lösung bei Raumtemperatur ab, bevor 20 mg DAB Tetrahydrochlorid (Carl Roth) in die Lösung gegeben wurden. Das Gefäß wurde in Alufolie verpackt, um Lichteinstrahlung zu vermeiden. Mit einem 25mM TRIS-HCl 200mM NaCl pH8 Puffer wurde auf 150 ml aufgefüllt. Der Substratpuffer sollte bei 4°C und nur für wenige Tage gelagert werden. Nach ca. einer Woche lässt sich bereits eine Rotfärbung der ursprünglich farblosen Lösung erkennen, welche die Probe unbrauchbar macht.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Substratpuffers

Reagens	Volumen
Gelatine	150 mg
Dest. Wasser	75 ml
DAB Tetrahydrochlorid	20 mg
Puffer	25 mM Tris-HCl 200 mM NaCl pH 8
gesamt	150 ml

Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt. Je 30 µl des Substratpuffers wurde in einem Well einer 96-Well-Platte gegeben. Zu 30 µl Substratpuffer und jeweils 0/5/10/20/30 µg aufgereinigtem Enzym wurden 20 µl einer 30%-H₂O₂- Lösung gegeben und die Reaktion so gestartet. Die Absorption wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 5 Minuten im Abstand von 1 sec bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen.

2.7.3 Spektrophotometrische Bestimmung des pH-Spektrums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte spektrophotometrisch anhand der Absorption von DAB in 0,1%-Gelatine-Lösung. Der fertige Substratpuffer wurde wie in 2.7.2 beschrieben hergestellt und mit HCl auf die pH-Werte 2, 4, 6 und 8 eingestellt.

Zu je 30 µl Substratpuffer und jeweils 20 µg aufgereinigtem Enzym wurden 20 µl einer 30%-H₂O₂- Lösung gegeben und die Reaktion so gestartet. Die Absorption wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 5 Minuten im Abstand von 1 sec bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen. Als Maß der Aktivität wurde die maximale Veränderung der Absorption verwendet.

2.7.4 Messung der Chemilumineszenz bei Reaktion mit Luminol

Am Spektrophotometer wurde die Chemilumineszenz des vom Enzym umgesetzten Luminols gemessen. Die Reaktion erfolgte mithilfe des Pierce® ECL Western Blotting

Substrate Kits (Thermo Fisher) auf einer 96-Well-Platte. Zu 20 µl der Substrat-Lösung und jeweils 0/5/10/20/30 µg aufgereinigtem Enzym wurden 20 µl der Peroxid-Lösung des Kits gegeben und die Reaktion so gestartet. Die Chemilumineszenz wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 32 Sekunden im Abstand von 500 msec gemessen. Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt.

Die katalysierte Reaktion entspricht der Umwandlung von Luminol in 3-Aminophthalat (3-APA): $\text{Luminol} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 3\text{-APA} + \text{Licht}$

2.7.5 Natives Katalase-Aktivitätsgel

Die semiquantitative Aktivitätsbestimmung der Katalase erfolgte im nativen Katalase-Aktivitätsgel (Woodbury et al., 1971; Wayne & Diaz, 1986): In einem 6,25% nativen Polyacrylamid-Gel (PAA) wurde das aufgereinigte Enzym sowie die Lysate verschiedener Larvenstadien von *E. multilocularis* aufgetragen und aufgetrennt. Das Gel wird mit Wasserstoffperoxid inkubiert und anschließend mit Kalium-Eisen(III)-Cyanid gefärbt. Im Gel vorhandenes Wasserstoffperoxid reduziert Kalium-Eisen(III)-Cyanid zu Kalium-Eisen(II)-Cyanid, welches mit Eisenchlorid bläuliche Komplexe bildet. Sind im Gel Enzyme mit Katalase-Aktivität vorhanden, reagieren sie mit Wasserstoffperoxid und bauen dieses zu Wasser und Sauerstoff ab. Die anschließende Blaufärbung findet nicht statt und das Gel bleibt an diesen Stellen transparent. Die Durchführung folgte im Wesentlichen dem von Klaus Brehm in seiner Diplomarbeit (Brehm, 1990) und Promotion (Brehm, 1995) verfassten Protokoll.

2.7.5.1 Herstellung des nativen Polyacrylamidgels und der nicht-denaturierenden Puffer

Im Unterschied zum nicht nativen Proteingel muss hier unbedingt auf die Verwendung von SDS und Mercaptoethanol verzichtet werden. Beide Substanzen hätten einen Verlust der funktionellen Aktivität des Enzyms zur Folge. Daraus ergeben sich eine andere

Zusammensetzung der verwendeten Proteingele sowie der Proben- und Laufpuffer (vgl. Tabelle 22 und 23).

Tabelle 22: Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels (Mengenangaben für zwei Gele)

	Sammelgel	Trenngel
4x Sammelgelpuffer	2,5 ml	-
4x Trenngelpuffer	-	3,75 ml
Acrylamid-Stammlösung 30%	1,9 ml	6,25 ml
Wasser	5,8 ml	4,75 ml
APS 10%	50 µl	80 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung der nicht denaturierenden Lauf- und Probenpuffer

Reagens	Herstellung
Laufpuffer	30,3 g TRIS 144 g Glycin Mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.
Probenpuffer	2 ml 86% Glycerin 375 µl 2M Tris-HCl, pH 6,8 5 mg Bromphenolblau Mit dest. Wasser auf 5 ml auffüllen.

2.7.5.2 Herstellung der Lysate

Ein Teil der am 9.1.2020 aus *M. unguiculatus* entnommenen Protoscolices des Isolats LCS18 wurden nach dem im Labor etablierten Protokoll mit Hilfe von Pepsin und Natriumtaurocholat aktiviert. Beide, aktivierte und nicht aktivierte, Protoscolices wurden anschließend in Lysepuffer (siehe 2.6.3) aufgenommen und für 3x 30 Sekunden im Ultraschall mit einer Amplitude von 50% beschallt. Zwischendurch wurden sie in einem Eisbad heruntergekühlt, um die Denaturierung des Enzyms zu vermeiden.

Metacestoden aus der *in vitro*-Kultur (Isolat H95 9.7.2019, seit zwei Tagen axenisch) wurden geöffnet und in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie 10 Minuten bei 600g

zentrifugiert und erneut in PBS gewaschen, um die restliche Hydatidenflüssigkeit zu entfernen. Die Vesikel wurden in Lysepuffer (siehe 2.6.3) aufgenommen und für 3x 30 Sekunden im Ultraschall mit einer Amplitude von 50% beschallt. Zwischendurch wurden sie in einem Eisbad heruntergekühlt, um die Denaturierung des Enzyms zu vermeiden.

Metacestoden des Isolats BN19 (ursprünglich Mensch) wurden am 28.1.2020 aus dem Bauchraum von *M. unguiculatus* entnommen. Sie wurden in einer Petrischale zerkleinert und anschließend über 5 Minuten bei 700 RCF zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das übrig gebliebene Material wurde in Lysepuffer (siehe 2.6.3) aufgenommen und 6-mal für 30 Sekunden mit einer Amplitude von 50% beschallt. Zwischendurch wurden es in einem Eisbad heruntergekühlt, um die Denaturierung des Enzyms zu vermeiden.

Nach erfolgter Lyse wurden alle Proben für 10 Minuten bei 15 000 RCF zentrifugiert und eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt.

2.7.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten erfolgte mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher). Die im Kit mitgelieferten Proben wurde in den angegebenen Mengen auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die Zellysate aus aktivierten und nicht aktivierten Protoscolices, aus *in vitro* kultivierten Metacestoden und aus *ex vivo* entnommenen Metacestoden wurden jeweils in Konzentrationen von 1:5 und 1:10 in weitere Wells pipettiert. Die Messung selbst wurde mittels Spektrophotometer durchgeführt. Aus den Eichproben wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe schließlich auch die Proteinkonzentrationen der Lysate berechnet werden konnten. Dabei erfolgte für jede Konzentration eine Doppelbestimmung aus deren Mittelwert sich die finale Proteinkonzentration errechnete. Nach Bestimmung der

Proteinkonzentration wurden alle Proben im Verhältnis von 1:1 in nicht denaturierenden Probenpuffer (siehe 2.7.5.1) aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

2.7.5.4 Färben und Entwickeln des nativen Katalase-Aktivitätsgels

Vor dem Beladen des Gels wurden über 30 Minuten 100 Volt angelegt. Anschließend wurden alle Proben im Verhältnis von 1:1 in nicht denaturierendem Probenpuffer auf die Spuren aufgetragen. Die Proteinmenge pro Spur betrug somit $12\ \mu\text{g}$. Die Differenz der Volumina zwischen den Proben wurde mit nicht-denaturierendem Probenpuffer auf $18\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Einzige Abweichung war hier das aufgereinigte Protein, von dem in einer separaten Spur einmal $31,5\ \mu\text{g}$ aufgetragen wurden.

Das Gel lief bei 100 Volt so lange, bis die blaue Lauffront den unteren Rand des Gels überschritt. Anschließend wurde das Gel unter leichtem Schütteln über 10 Minuten in destilliertem Wasser bei RT gewaschen. Das Wasser wurde entfernt und durch 100 ml destilliertem Wasser + $45\ \mu\text{l}$ 30% H_2O_2 -Lösung ersetzt, in der das Gel ebenfalls 10 Minuten bei RT verblieb. Die Peroxid-Lösung wurde entfernt und das Gel für 10 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden gleichzeitig die beiden frisch zubereiteten Färbelösungen zugegeben:

Eisen-Chlorid Lösung: $833\ \text{mg FeCl}_3 + 6\ \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml Wasser (Sigma)

Kaliumhexacyanoferrat-Lösung: $500\ \text{mg K}_3(\text{FeCN})_6$ in 50 ml Wasser (Fluka BioChemika)

Wenn das Gel eine grün-bläuliche Färbung angenommen hat, werden die Färbelösungen entfernt und durch dest. Wasser ersetzt. Die Reaktion sollte nach einem kurzen Moment zum Erliegen kommen und das Gel mit den Katalasebanden kann nun fotografiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Genstruktur

Das Genom von *E. multilocularis* enthalte nach Vorhersage von WBPS ein Gen (EmuJ_001133900), welches laut Annotation für eine Iron dependent peroxidase codiere. Dieses Gen wurde mit bioinformatischen und molekularbiologischen Methoden untersucht; Unterschiede zwischen der Genvorhersage auf WBPS, Analysen des Transkriptoms (Herz & Brehm, Manuskript in Vorbereitung) und den eigenen Ergebnissen wurden herausgearbeitet (vgl. Tabelle 24).

3.1.1 Abweichungen der Genstruktur aus der Genvorhersage von den Transkriptomdaten

Um erste Information über die Struktur des in WBPS als EmuJ_001133900 bezeichneten Gens zu erhalten, wurde seine Lage auf dem Genom von *E. multilocularis* genauer untersucht. Bei besagtem Genomabschnitt handelt es sich um ein 6 447 Basenpaare (bp) langes Gen, welches in sense-Ausrichtung auf dem in WBPS als forward-Strang

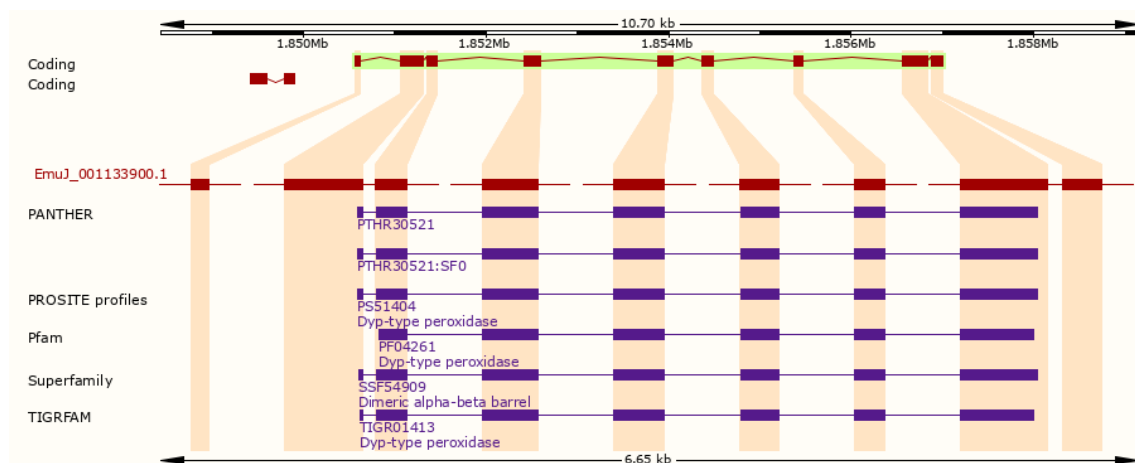


Abbildung 9: Genstruktur von EmuJ_001133900 in der Vorhersage auf WBPS.

Die Darstellung der Genstruktur von EmuJ_001133900 auf WBPS unterscheidet Exons (dicke Balken) und Introns (dünne Balken) und zeigt ihre Positionierung auf dem Genom (schwarz-weißer Balken oben) an. Die rote Struktur zeigt das gesamte Gen aus der Vorhersage, während die blauen Strukturen Sequenzen hervorheben, die in den aufgeführten Datenbanken Treffer für bekannte Basenfolgen erzielten. So zeigen hier die Datenbanken Pfam, Superfamily und TIGRFAM beispielsweise Übereinstimmungen mit Dyp-Peroxidasen auf.

bezeichneten Strang liegt. EmuJ_001133900 bestehe aus neun Exons, die zusammen eine Länge von 1368 bp aufweisen (vgl. Abbildung 9). Die resultierenden acht Introns weisen hinsichtlich ihres Umfangs eine große Bandbreite auf; das kleinste Intron besitze nur 43 bp, während sich die Länge des größten Introns auf 1 285 bp belaufe. Alle Introns besitzen die charakteristischen GT-AG- Dinukleotidsequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende. Laut der Vorhersage fände kein alternatives Spleißen statt. Die benachbarten Gene liegen beide auf dem als reverse-Strang bezeichneten Strang: Im Abstand von 664 bp in 3'-Richtung befindet sich EmuJ_00113400, welches mutmaßlich für ein nicht näher bezeichnetes Protein kodiert. In 5'-Richtung liegt das Gen EmuJ_001133800 in 13 784 bp Entfernung. Laut Annotation codiert es für eine Receptor type tyrosine phosphatase. Der automatische Abgleich von EmuJ_001133900 mit verschiedenen Proteindatenbanken wies Übereinstimmungen mit einer DyP-Typ Peroxidase auf.

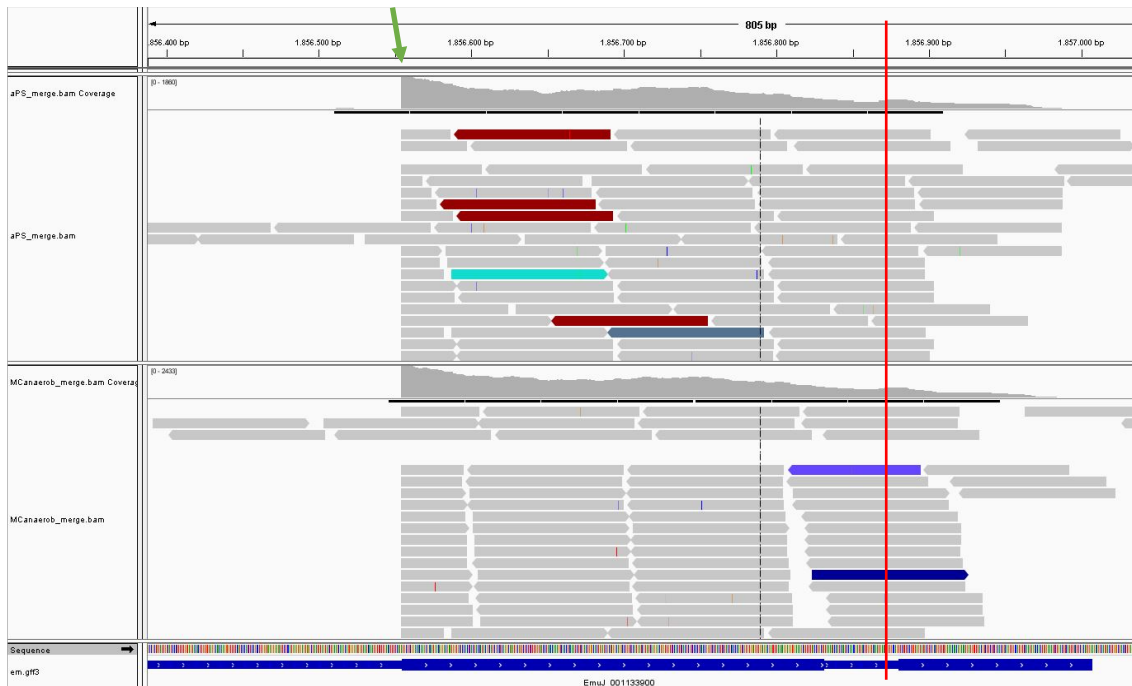


Abbildung 10: Abgleich der Genvorhersage von WBPS mit den Transkriptomdaten im IG-Viewer. Im IG-Viewer wurde die WBPS-Genvorhersage für EmuJ_001133900 mit den aus den Untersuchungen des Transkriptoms von *E. multilocularis* bekannten, tatsächlich vorliegenden Transkripten verglichen. Die Graphik zeigt den hinteren Genabschnitt von EmuJ_001133900 gemäß der Genvorhersage von WBPS (blauer Balken unten; dicke Stellen: Exon, dünne Stellen: Intron). In der oberen Hälfte des Bildes werden Daten aus dem Transkriptom in aktivierten Protoscolices (graue Kurve oben), in der unteren Hälfte aus axenisch kultivierten Metacestoden (graue Kurve unten) abgebildet. In beiden Fällen ist zu sehen, dass die grauen Reads über das in WBPS als letztes prognostiziertes Intron hinweggehen (vgl. Abbruch der Reads beim vorherigen Intron links zum Vergleich, grüner Pfeil).

Durch die Verlängerung des transkribierten Bereichs entsteht ein veränderter Leserahmen. Daraus ergibt sich ein neues Stoppcodon, dessen Position durch die rote Linie markiert wird.

Der Abgleich dieser Informationen mit den Transkriptomdaten für EmuJ_001133900 ergab einige Abweichungen zur Genprognose auf WBPS. Während im Genom ein achttes, 49 bp langes Intron prognostiziert wird, ist den Transkriptomdaten zu entnehmen, dass dieser Bereich ebenfalls transkribiert wird. Das Transkriptionseende verschiebt sich damit aufgrund des veränderten Leserahmens um 120 Basenpaare in 5'-Richtung und befindet sich zu Beginn des vorhergesagten Introns (vgl. Abbildung 10).

Eine weitere Abweichung zwischen der Vorhersage und den Transkriptomdaten konnte mit Hilfe von Sashimi-Plots der Transkripte mehrerer Larvenstadien von *E. multilocularis* ermittelt werden. Die Analyse der Plots ergab, dass die ersten 63 Basenpaare, welche dem jeweils ersten vorhergesagten Exon und Intron entsprechen, im

Vergleich zu den anderen transkribierten Genregionen viel seltener transkribiert werden (vgl. Abbildung 11). Zwischen den Larvenstadien lassen sich dabei leichte Unterschiede ausmachen; am häufigsten liegt das längere der beiden Transkripte des Gens in aktivierten *Protoscolices* vor.

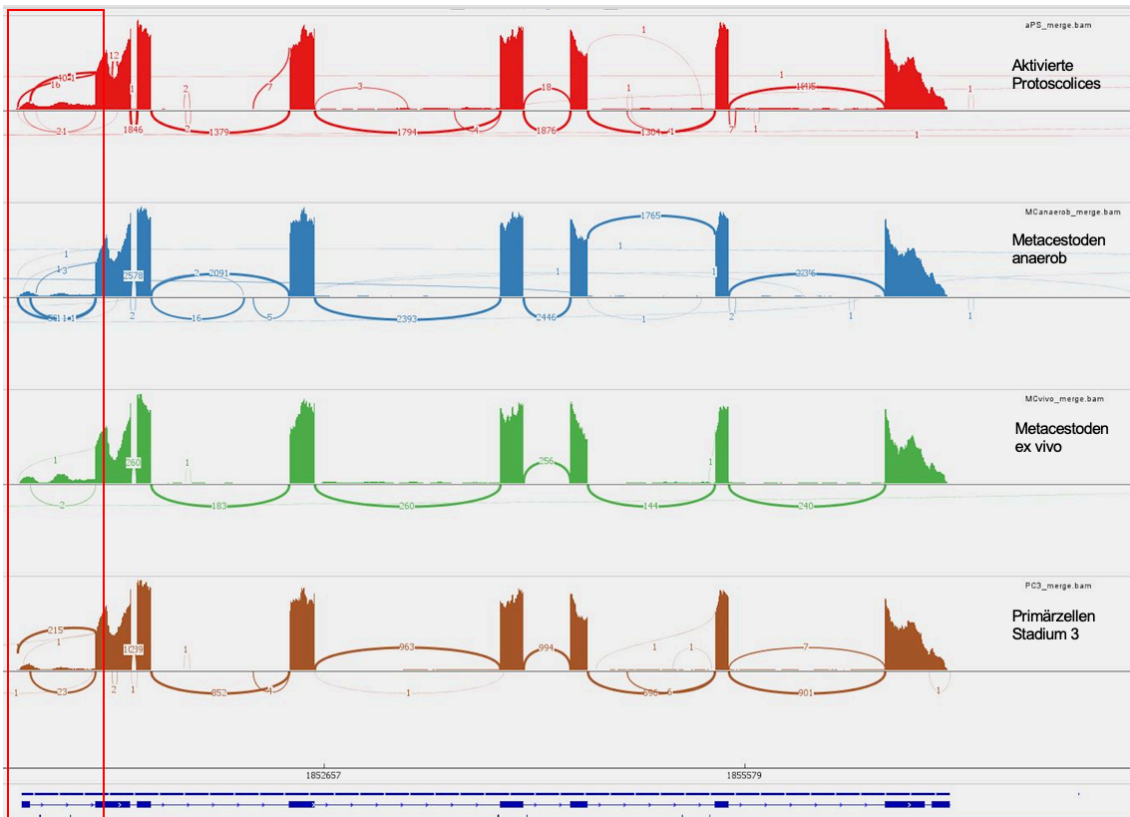


Abbildung 11: Vergleich der Sashimi-Plots aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *E. multilocularis* im IGV-Viewer.

Im IGV-Viewer wurden die Transkripte von EmuJ_001133900 in verschiedenen Entwicklungsstadien von *E. multilocularis* miteinander verglichen. Die Graphik zeigt einen Vergleich der Transkripte verschiedener Entwicklungsstadien untereinander und mit der Genvorhersage für EmuJ_001133900 auf WBPS (blauer Balken unten; dicke Stellen: Exon, dünne Stellen: Intron). Jeder Plot korrespondiert mit der Transkription des Gens in den verschiedenen Stadien (rot – aktivierte *Protoscolices*, blau – *Metacestoden anaerob*, grün – *Metacestoden ex vivo*, braun – *Primärzellen Stadium 3*). Der rote Kasten markiert den Anfangsbereich des Transkripts von EmuJ_001133900. Die Höhe der Säulen zeigt die Menge an Transkripten der jeweiligen Genregion.

Es lässt sich erkennen, dass der erste als Exon ausgewiesene Genabschnitt im Vergleich zu den anderen Exons viel weniger transkribiert wird. Die Unterschiede zwischen den Stadien erscheinen gering.

Durch die Untersuchung der Transkriptomdaten konnten Abweichungen zu der von WBPS für EmuJ_001133900 vorhergesagten Genstruktur festgestellt werden. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 24 zusammengefasst.

3.1.2 Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung

Mittels PCR (Primer: IPOX +G forward und IPOX R2 +G) konnte die aus dem Abgleich mit den Transkriptomdaten resultierte Form des auf WBPS als EmuJ_001133900 bezeichneten Gens amplifiziert werden (vgl. Abbildung 12). Alle Reverse-Primer, die weiter in 3'-Richtung lagen als das neue, nach vorne verlagerte Stopp-Codon, erbrachten kein verwertbares PCR-Produkt. Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Peroxidase-Aktivität des entsprechenden Proteins bestätigt werden konnte, wird das codierende Gen, wie es aus dem Abgleich von EmuJ_001133900 mit den Transkriptomdaten resultierte, von hier an als *emipox* bezeichnet.

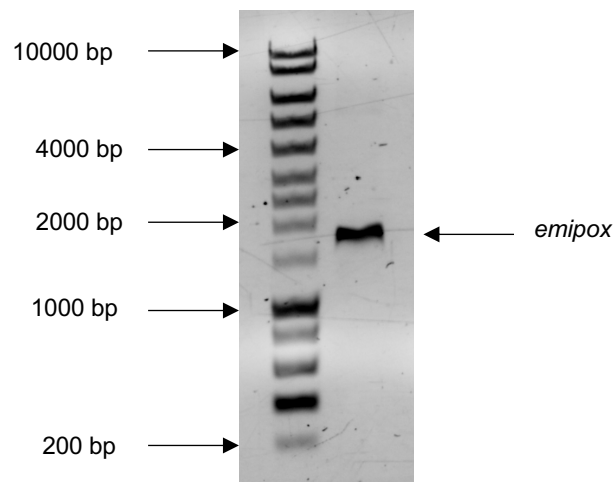


Abbildung 12: *emipox*-Bande im Agarose-Gel.

Mittels PCR wurde das Gen *emipox* amplifiziert und im Agarose-Gel aufgetragen. Dazu wurden 9 μ l PCR-Produkt mit 1 μ l Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH) und 2 μ l DNA Loading Dye (New England Biolabs) vermischt und auf ein 1% Agarose-Gel geladen (rechte Spalte). Zur Identifikation der Bandengröße wurden 10 μ l des Markers SmartLadder (Eurogentec) mit 1 μ l Midori Green gemischt und ebenfalls auf das Gel geladen (linke Spalte). Alle Proben liefen anschließend bei einer Spannung von 150 Volt über 20 min. Die für *emipox* resultierende Bande erscheint größer als die eigentlich erwarteten 1245 bp. Dieser Bandenshift hin zur größeren Molekülgröße ist ein bekannter Nebeneffekt bei der Verwendung von Midori.

Das PCR-Produkt wurde in pJET 2.1/blunt kloniert und anschließend sequenziert. Die resultierende Sequenz entsprach den Ergebnissen aus der Analyse der Transkriptomdaten (vgl. Tabelle 24).

Tabelle 24: Gegenüberstellung der Daten von WBPS und der eigenen Untersuchung.

	Genom- vorhersage	Transkriptomdaten/ Eigene Sequenzierung
Länge des codierenden Bereichs	1368 bp	1245 bp bzw. 1182 bp
Anzahl Exons	9	8 bzw. 7
Anzahl Introns	8	7 bzw. 6
Transkripte	-	2
Größe des erwarteten Proteins	455 aa	415 aa bzw. 394 aa
Position der DyP-type Peroxidase Domäne (PFAM)	100-400	100-400 bzw. 79-379

3.2 Analyse der Proteinstruktur

3.2.1 Analyse der Primärstruktur

Um Aussagen über die Primärstruktur des aus *emipox* resultierenden Proteins treffen zu können, wurde das längere der beiden Transkripte von *emipox* in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und mit bioinformatischen Methoden untersucht.

Neben einer DyP-Typ Peroxidase Sequenz (Aminosäure 100 bis 400) identifizierte das SMART-Tool eine Transmembranhelix an Position 7 bis 26 des Proteins (vgl. Abbildung 13). Der Bereich korreliert mit einem Teil der nur selten transkribierten Anfangsregion von *emipox*.

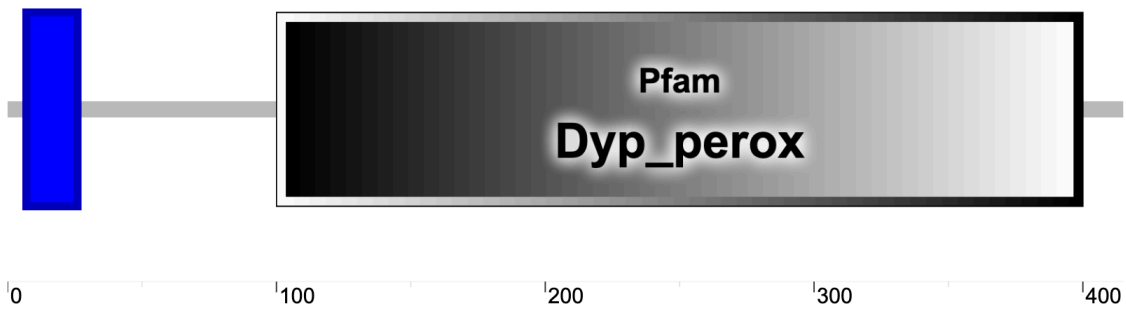


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Proteinstruktur im SMART-Tool.

Mit Hilfe des SMART-Tools erfolgte ein Abgleich der für *emipox* theoretisch resultierenden Aminosäuresequenz mit Protein-Datenbanken. Es ergab sich eine Übereinstimmung mit der DyP-Typ Peroxidase-Sequenz aus der PFAM-Datenbank (schwarzer Kasten). Das integrierte TMHMM v2.0 Programm identifizierte eine Transmembranhelix (blauer Kasten), welche genau den Bereich des Gens betraf, dessen Transkription sich in 3.1.1 als verringert herausgestellt hatte.

Die als Transmembranhelix beschriebene Sequenz wurde genauer betrachtet: Ihre N-terminale Lokalisation sowie eine Häufung an hydrophoben Aminosäuren (vor allem Alanin, Leucin und Valin) in der Mitte der Domäne weisen auf ein Signalpeptid bzw. eine Signalankersequenz hin (*N*-VCYLTAALVVYYFIKMSYSS-C).

Die Analyse der gesamten Aminosäuresequenz ergab weiterhin bestimmte, speziell bei DyP-Peroxidasen beschriebene Motive: Das von Yoshida und Sugano angeführte, in DyP-Peroxidasen konservierte GXXDG-Motiv findet sich an Position 245 bis 249. Ebenso lassen sich das charakteristische Histidin für die Bindung der prosthetischen Häm-Gruppe und die vier Aminosäuren der Wasserstoffperoxid-Bindungstasche aufzeigen (vgl. Yoshida & Sugano, 2015; vgl. Abbildung 14). Interessanterweise weist das resultierende Protein an Position 40/41 die für EfeB/YcdB (*Escherichia Coli*) und Homologe beschriebene Tat-Sequenz (Sturm et al., 2006) auf (vgl. dazu Abbildung 15).

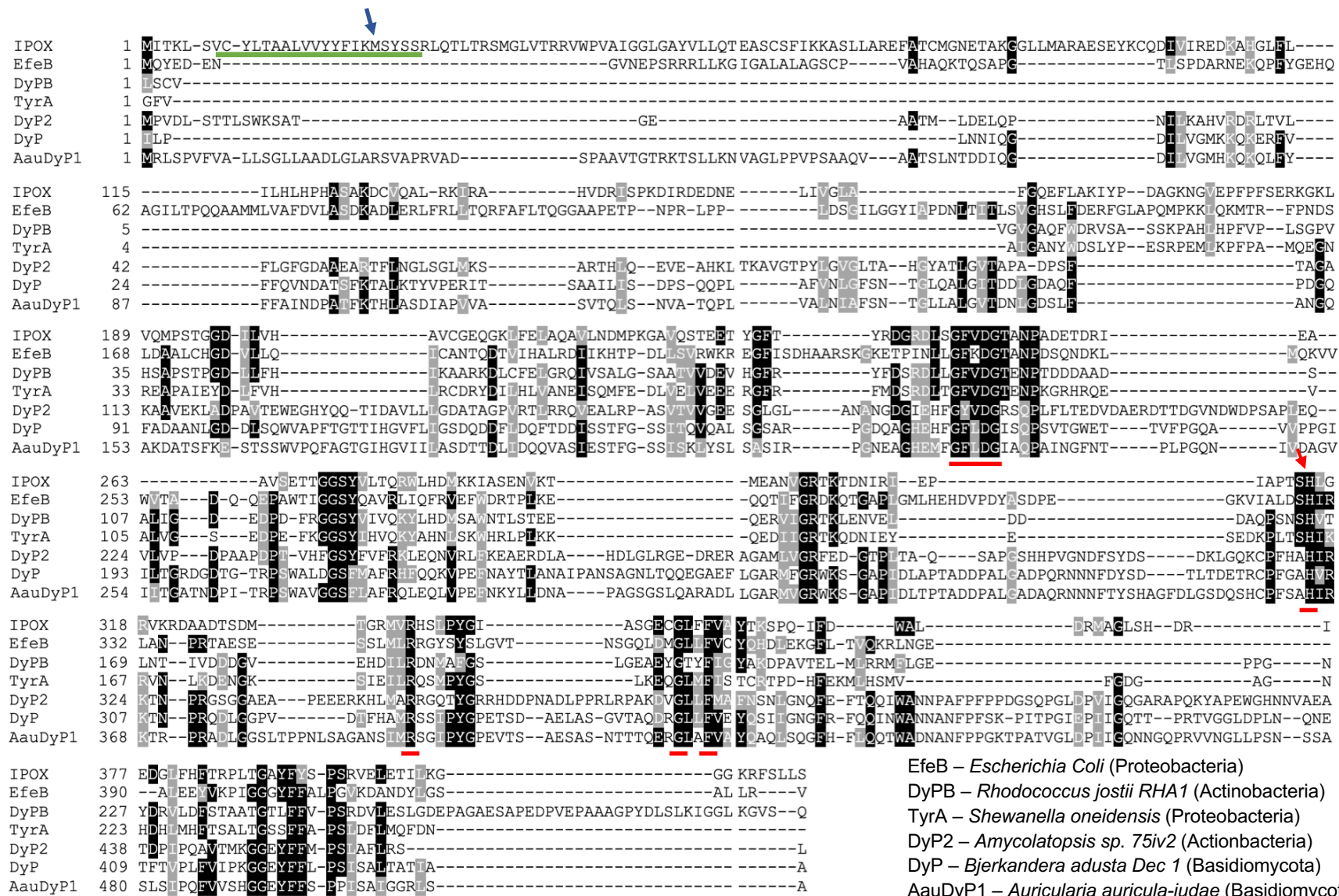


Abbildung 14: Alignment der Primärstruktur des von *emipox* codierten Proteins mit den Primärstrukturen bakterieller und fungaler DyP-Peroxidasen unterschiedlicher Klassen mit Hilfe des T-Coffee Multiple Alignment Tool.

Mit Hilfe des T-Coffee Multiple Alignment Tools wurde die für *emipox* theoretisch resultierende Aminosäuresequenz (IPOX) mit anderen bakteriellen und fungalen DyP-Peroxidasen verglichen. Der Zugriff auf die Aminosäuresequenzen erfolgte im Februar 2020 über die Proteindatenbank des National Centers for Biotechnology Information. Mit grün wurde die von SMART identifizierte Transmembranhelix markiert. Der blaue Pfeil weist auf den Beginn des mit der kürzeren Transkriptvariante von *emipox* korrelierenden Proteins hin. Die rot markierten Bereiche sind hoch konserviert, darunter das GXXDG-Motiv der DyP-Peroxidasen und die Aminosäuren der Wasserstoffperoxid-Bindungstasche. Mit einem zusätzlichen roten Pfeil wurde das Histidin markiert, welches die prosthetische Hämgruppe bindet. Die Abbildung wurde in Analogie zu der Abbildung in Yoshida & Sugano, 2015 erstellt.

```

E. coli      MQYKDENG-VNE-----PSRRR---LLKVI GALALA---GSCP-VVHA---QKT-----Q
R. capsulatus  MSP-----S-----PSRRA---VLGGI GLGLAA---CPFS-LCLA---RAE-----T
B. fungorum   MAND-RP---PR-----PSRRG---FLKAGGA AVAA---GASLGACLA---AP-----Q
S. coelicolor  MTDTDSPAPAPS-----PSRRS---LTGWG GAGLAL---GAAA-ACGA---VA-----M
E. multilocularis MSYSSRLQ-TLIRSMGLVIRRVWVPVAIGGI GAYVLLQTEASCS-FIKKASLLAREFATCMG

```

Abbildung 15: Alignment der Signalsequenzen von YcdB-Homologen und dem als Signalsequenz prognostizierten Bereichs des von *emipox* codierten Proteins mit Hilfe des T-Coffee Multiple Alignment Tool.

Mit Hilfe des T-Coffee Multiple Alignment Tools wurden die Signalsequenzen von YcdB-Homologen und dem als Signalsequenz prognostizierten Bereichs des von *emipox* codierten Proteins (*E. multilocularis*) verglichen. Mit rot wurden die beiden konservierten Arginine markiert, welche einer bakteriellen Tat-Sequenz entsprechen und auch für das von *emipox* codierte Protein prognostiziert werden. Die Abbildung orientiert sich an Sturm et al., 2006.

Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt des resultierenden Proteins wurden bestimmt (vgl. Tabelle 25).

In der Untersuchung der Primärstruktur konnte das Vorhandensein charakteristischer Strukturmerkmale einer DyP-Typ Peroxidase bestätigt werden. Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Peroxidase-Aktivität des von *emipox* codierten Proteins auch experimentell bestätigt werden konnte, wird das entsprechende Protein als EmIPOX bezeichnet.

3.2.2 Heterologe Expression von EmIPOX

Das kürzere Transkript von *emipox* wurde mittels PCR amplifiziert (Primer: xIPOX f und xIPOX r) und mitsamt eines His- und eines V5-Tags in den Expressionsvektor PET151D kloniert. Die heterologe Expression von EmIPOX in *E. Coli* BL21 (DE3) wurde mit IPTG induziert. Mittels SDS-PAGE und Western Blot konnte der Erfolg der Expression des Proteins nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 16).

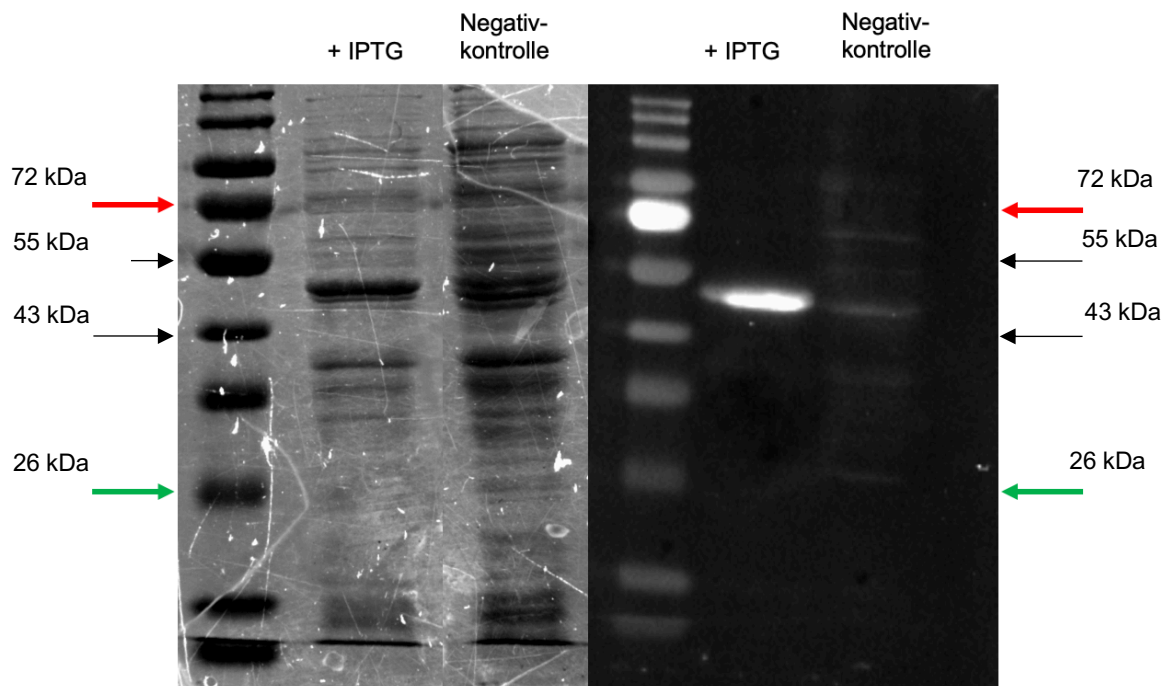


Abbildung 16: Bestätigung der heterologen Expression von EmIPOX mittels SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts).

Das von *emipox* codierte Protein EmIPOX konnte in *E. Coli* heterolog exprimiert und die Expression experimentell bestätigt werden.

Links: Zum Nachweis von Proteinen wurden 10%-Polyacrylamidgele eingesetzt. Die zur Induktion der Expression mit IPTG behandelte Bakteriensuspension wurde nach Lyse auf das Gel aufgetragen (mittlere Spur). Als Negativkontrolle dienten Bakterienzellen, in denen keine Expressionsinduktion stattgefunden hatte (rechte Spalte). Nach einer Stunde bei 150V/36mA wurde das Gel aus seiner Halterung entnommen und für 15 Minuten in einer Coomassie-Färbelösung bei leichtem Schütteln inkubiert. Das Gel wurde so lange in Wasser entfärbt, bis die entsprechenden Banden sichtbar wurden.

Als Proteinmarker wurde #P7719 (NEB) verwendet. Der rote Pfeil markiert eine Masse von 72kDa, der grüne Pfeil zeigt auf 26kDa. Die dicke Bande in der mittleren Spalte liegt damit zwischen 55 und 43kDa, was dem vorhergesagten Gewicht (45,53 kDa incl. Tags, siehe auch Tabelle 25) von EmIPOX entspricht.

Rechts: Der spezifische Nachweis von EmIPOX erfolgte mittels Anti-V5-AP Antikörper im Western Blot. Dabei entsprechen die Spuren des Blots denen des SDS-PAGE der linken Seite. Mittels enzymatischer Reaktion (NBT-BCIP®, Sigma, als Substrat der am Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase) konnte die heterologe Expression von EmIPOX bestätigt werden.

Tabelle 25: Merkmale und Eigenschaften von EmIPOX

	Merkmal	Referenz
Länge (ohne Tags)	394 aa	
Länge (inklusive His-Tag/V5-Epitop)	414 aa	
Molekulargewicht (ohne Tags)	43,41 kDa	https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm
Molekulargewicht (inklusive His-Tag/V5-Epitop)	45,53 kDa	
Isolelektrischer Punkt	6,75	http://isoelectric.org/calculate.php
Isolelektrischer Punkt (inklusive His-Tag/V5-Epitop)	6,84	

3.3 Beziehung von EmIPOX zu den DyP-Peroxidasen anderer Eukaryoten

Diese Arbeit ist die erste Charakterisierung einer Peroxidase vom DyP-Typ bei Tieren. Um die phylogenetische Position von EmIPOX besser einschätzen und Aussagen über seine Bedeutung für *E. multilocularis* treffen zu können, wurde ihre Beziehung zu anderen DyP-Typ Peroxidasen im Tierreich mit bioinformatischen Methoden näher bestimmt.

Ein Abgleich der Aminosäuresequenz von EmIPOX mit dem Genom von *E. multilocularis* mithilfe des Blast Local Alignment Search Tool (BlastP) ergab keine weiteren Übereinstimmungen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass EmIPOX die einzige DyP-Peroxidase des Bandwurms ist. Der Abgleich mit den bekannten Genomen von Deuterostomiern erzielte sechs Treffer, von denen sich die größte Verwandtschaft mit *Saccoglossus kowalevskii* aus dem Phylum der Hemichordata ergab (e-value $7e-83$, Percent identity 41,86%). Interessanterweise scheint auch der Rotlachs, *Oncorhynchus nerka*, ein ähnliches Protein zu besitzen (e-value $2e-29$, Percent identity 34,67%). Bereits ab den Euarchontoglires – und damit bei Nagern ebenso wenig wie bei Primaten – lassen sich im BlastP-Abgleich keine Treffer mehr erzielen. Beim Menschen,

Homo sapiens, konnte somit keine verwandte DyP-Typ Peroxidase nachgewiesen werden.

Im Superphylum der Ecdysozoa sind ähnliche Proteine in verschiedenen Organismen vorhanden. Die höchste Übereinstimmung erzielten *Priapulius caudatus* (e-value $3e-73$, Percent identity 38,36%) und der Nematode *Trichuris suis* (e-value $7e-66$, Percent identity 37,22%).

Innerhalb des Stammes der Plattwürmer finden sich ähnliche Gene sowohl unter den parasitären Neodermata wie auch unter den freilebenden Turbellaria: So weisen zum Beispiel *Schmidtea mediterranea* und *Macrostomum lignano* je ein zu EmIPOX verwandtes Protein auf. Das Vorliegen von DyP-Typ Peroxidasen ist unter den Plathelminthen also weder auf eine Klasse noch auf das Taxon der Neodermata begrenzt (vgl. Abbildung 17).

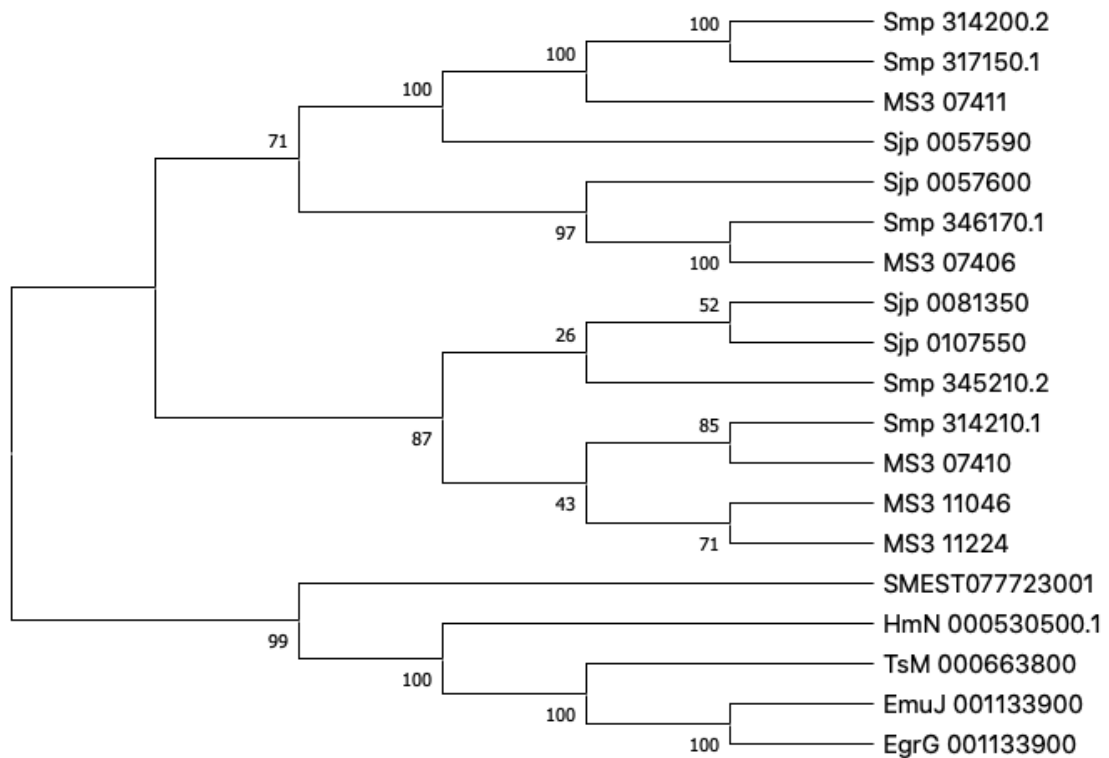


Abbildung 17: Phylogenetischer Stammbaum ausgehend von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz von EmIPOX innerhalb des Stammes der Plathelminthes.

Die Verwandtschaft des Proteins EmIPOX zu ähnlichen Proteinen im Proteom anderer Plattwürmer konnte mit bioinformatischen Methoden nachvollzogen werden. Verwendet wurden die Proteindatensätze der Plathelminthes von WBPS. Der Zugriff erfolgte im Dezember 2019, Version 14.0. Der Vergleich (BLASTP) erfolgte mit den ganzen Proteinlängen. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit MEGA X (Kumar et al., 2018) erstellt. Dies erfolgte nach der Neighbor-Joining Methode (Saitou & Nei, 1987) unter Verwendung eines Bootstrap-Tests (Felsenstein, 1985) mit 500 Replikaten. Distanzen wurden nach der Poisson-Methode berechnet.

Verwendete Arten und Datensätze: EmuJ (PRJEB122) – *E. multilocularis*, EgrG (PRJEB121) – *E. granulosus*, TsM (PRJNA170813) – *Taenia solium*, HmN (PRJEB124) – *Hymenolepis microstoma*, SMEST (PRJNA 379262) – *Schmidtea mediterranea*, MS3 (PRJNA78265) – *Schistosoma haematobium*, Smp (PRJEA36577) – *Schistosoma mansoni*, Sjp (PRJEA34885) – *Schistosoma japonicum*.

Hinsichtlich *emipox* verwandter Gene unterscheidet sich die Klasse der Trematoda von den anderen Klassen der Plathelminthes. So weist das Genom von *Schistosoma haematobium* fünf Varianten entsprechender, für Peroxidasen codierender Gene auf. Auch *Schistosoma japonicum* besitzt vier Gene für ähnliche Proteine, von denen zwei, Sjp_0057590 und Sjp_0057600 aufeinander folgend auf dem als forward-Strang

ausgewiesenen Strang zu finden sind. *Schistosoma mansoni* schließlich besitzt ebenfalls fünf Genvarianten, zwei davon ebenfalls unmittelbar benachbart.

Aus der phylogenetischen Analyse lässt sich folgern, dass DyP-Peroxidasen bei Plathelminthen unabhängig von der parasitären Lebensweise vorhanden sind, bei potenziellen (Fehl-) Zwischenwirten von *E. multilocularis*, wie Nagetieren oder dem Menschen, jedoch fehlen.

3.4 *emipox*-Transkripte in verschiedenen Larvenstadien

Um besser zu verstehen, welche Faktoren die Induktion von EmIPOX bedingen, wurde das Transkriptom verschiedener Larvenstadien von *E. multilocularis* mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Als Primer kamen sowohl das Paar IPOX qPCR F und IPOX qPCR R, als auch IPOX qPCR F2 und IPOX qPCR R2 zum Einsatz. Mit jedem Primerpaar wurde ein Effizienzlauf durchgeführt und eine Standardkurve (lineare Regression) erstellt. Als endogene Kontrolle diente bei allen Läufen das housekeeping-Gen *emelp*.

3.4.1 Die Aktivierung von Protoscolices induziert die Expression von EmIPOX

Für die Untersuchung des quantitativen Unterschieds der Transkripte von *emipox* bei aktivierten und nicht aktivierten Protoscolices wurde cDNA des Isolats SUMA16 verwendet. Die relative Quantifizierung ergab 30-mal mehr Transkripte in den Protoscolices, welche zuvor nach dem im Labor gängigen Verfahren aktiviert worden waren (vgl. für die Verfahren 2.4.4., für die Ergebnisse Abbildung 18).

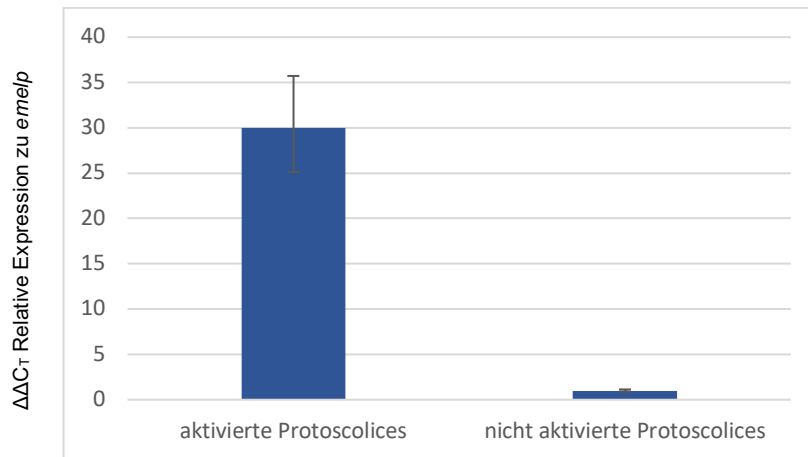


Abbildung 18: Quantifizierung der Transkripte von *emipox* mittels quantitativer RT-PCR bei aktivierten und nicht aktivierten Protoscolices.

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die Genexpression von *emipox* mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu quantifizieren. Die Normalisierung des Zielgens erfolgte mit Hilfe eines internen Referenzgens, dem Housekeeping-Gen *emelp*. Die Untersuchungen erfolgten in Triplets und mit doppelter Negativkontrolle. Der schwarze Balken zeigt die Standardabweichung an. Es wurde cDNA des Isolats SUMA 16 verwendet, welches vorher von RNA auf cDNA umgeschrieben worden war. Als Primer kamen IPOX qPCR F und IPOX qPCR R zum Einsatz.

Alle RT-PCR Untersuchungen wurden mit Hilfe des StepOne Plus Realtime PCR-Systems durchgeführt. Als Farbmix wurde 5x HOT FIREPol® EvaGreen® RT-PCR Mix Plus verwendet. Die Auswertung erfolgte in StepOne™/StepOne Plus™ 2.3. Die Graphiken wurden mit Microsoft Excel erstellt.

3.4.2 Aerobe Kulturbedingungen induzieren die Expression von EmIPOX im Vergleich zu axenischen Bedingungen

Von besonderem Interesse war die Induktion von EmIPOX in Metacestoden, da diese dem Larvenstadium in der infizierten Leber entsprechen. Metacestoden des Isolats H95 wurden daher 14 Tage parallel unter axenischen (anaeroben) und aeroben Kulturbedingungen gehalten. Die Transkriptmenge wurde anschließend mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter aeroben Bedingungen ungefähr dreimal so viele Transkripte von *emipox* vorliegen als dies in unter axenischen Kulturbedingungen gehaltenen Metacestoden der Fall war (vgl. Abbildung 19).

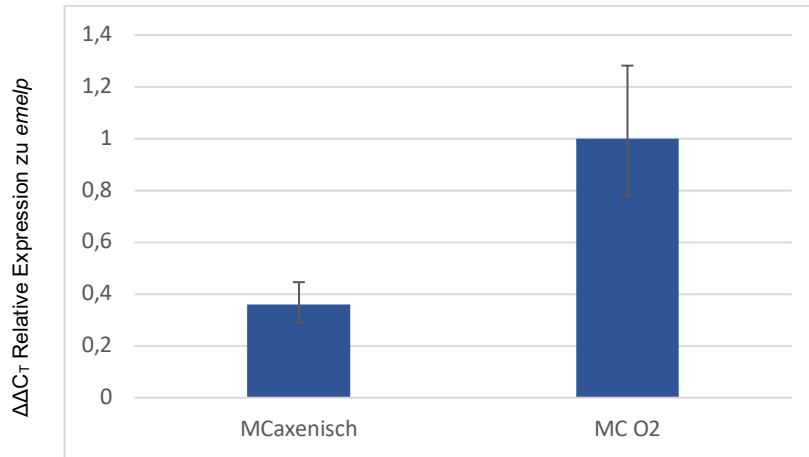


Abbildung 19: Quantifizierung der Transkripte von *emipox* in aerob und anaerob kultivierten Metacestodenesikeln.

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die Genexpression von *emipox* mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu quantifizieren. Die interne Kontrolle erfolgte wieder über das *emelp*-Gen. Die Untersuchungen erfolgten in Triplets und mit doppelter Negativkontrolle. Der schwarze Balken zeigt die Standardabweichung an.

Vor Durchführung des Experiments waren die Metacestoden 14 Tage lang parallel unter aeroben und axenischen Bedingungen kultiviert worden. Anschließend war RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben worden. Zugrunde lag Parasitenmaterial des Isolats H95, welches am 14.6.19 aus *M. unguiculatus* entnommen und in die Kultur gegeben worden war. Als Primer kamen IPOX qPCR F2 und IPOX qPCR R2 zum Einsatz.

3.4.3 Die Expression von EmIPOX in Parasitenmaterial aus dem Peritoneum von *M. unguiculatus* ist nicht signifikant höher als bei Metacestoden aus dem Kultursystem

Kulturbedingungen stellen für Parasiten (und Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler) immer artifizielle Situationen dar. Das Interesse galt daher der Induktion von EmIPOX im Körper des Wirtes. Aus diesem Grund wurden Metacestoden des Isolates SUMA16 direkt aus dem Bauchraum von *M. unguiculatus* entnommen. Die Transkriptmenge wurde mit der in aerob und anaerob kultivierten Metacestoden verglichen.

Die Messung ergab, dass die Menge der Transkripte in Metacestoden aus dem Wirt die Menge der Transkripte unter aeroben Kulturbedingungen nicht signifikant übersteigt (vgl. Abbildung 20).

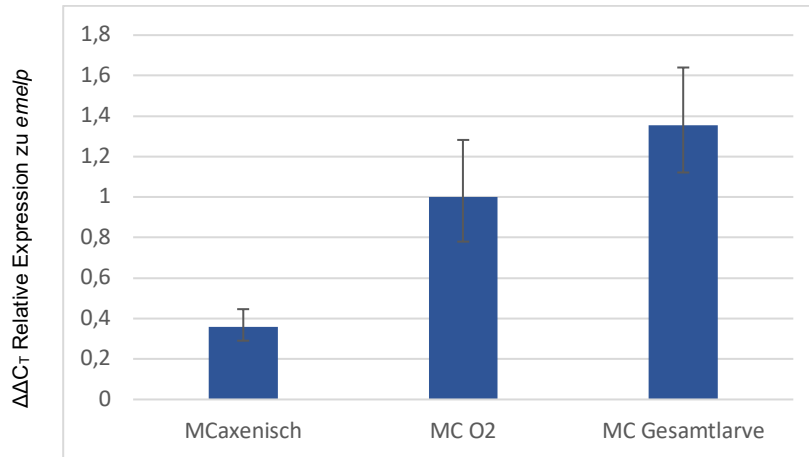


Abbildung 20: Quantifizierung der Transkripte von *emipox* in aerob/anaerob kultivierten Metacestoden und Metacestoden aus dem Bauchraum von *M. unguiculatus* entnommenem Parasitenmaterial (MC Gesamtlarve).

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die Genexpression von *emipox* mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu quantifizieren. Die interne Kontrolle erfolgte wieder über das *emelp*-Gen. Die Untersuchungen erfolgten in Triplets und mit doppelter Negativkontrolle. Der schwarze Balken zeigt die Standardabweichung an.

MCaxenisch und MC O2 entsprechen den Proben aus dem vorangegangenen Experiment (vgl. 3.4.2). MC Gesamtlarve entstammt Parasitenmaterial des Isolats SUMA16 aus dem Peritoneum von *M. unguiculatus*.

Als Primer kamen IPOX qPCR F2 und IPOX qPCR R2 zum Einsatz.

3.4.4 EmIPOX-Expression steigt in infiziertem Lebergewebe stark an

Um sich der physiologischen Situation des Metacestoden weiter näher anzunähern, wurde Parasitenmaterial (Isolat H95) aus einer infizierten Leber von *M. unguiculatus* entnommen und hinsichtlich der Transkripte von *emipox* mit den anderen Proben verglichen.

Interessanterweise übertraf die gemessene Menge an Transkripten die bei Metacestoden unter aeroben Kulturbedingungen um das 70-fache (vgl. Abbildung 21).

Um die Amplifikation eines PCR-Produkts aus dem Genom von *M. unguiculatus* auszuschließen, erfolgte eine Analyse der Schmelzkurven. Alle PCR-Produkte besaßen die gleiche Schmelztemperatur.

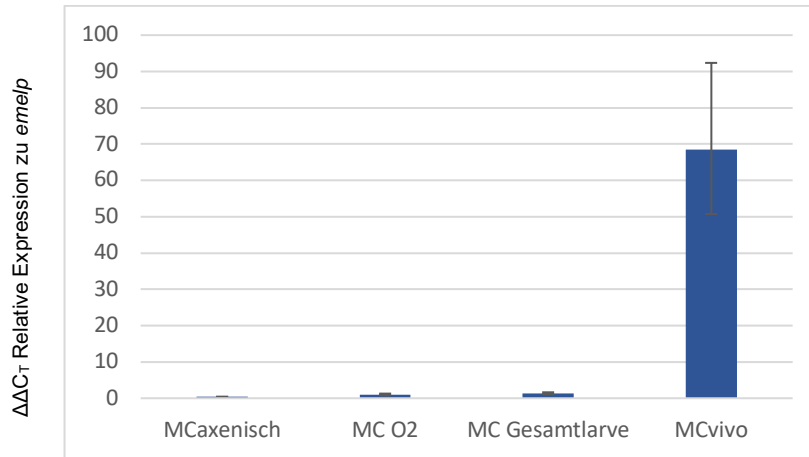


Abbildung 21: Quantifizierung der Transkripte von *emipox* in aerob/anerob kultivierten, aus dem Bauchraum von *M. unguiculatus* entnommenen (MC Gesamtlarve) und einer infizierten Leber von *M. unguiculatus* entnommenen Metacestoden (MCvivo).

Die RT-PCR wurde eingesetzt, um die Genexpression von *emipox* mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu quantifizieren. Die interne Kontrolle erfolgte wieder über das *emelp*-Gen. Die Untersuchungen erfolgten in Triplets und mit doppelter Negativkontrolle. Der schwarze Balken zeigt die Standardabweichung an.

MCaxenisch und MC O2 entsprechen den Proben aus dem vorangegangenen Experiment (vgl. 3.4.2). MC Gesamtlarve entspricht ebenfalls dem vorangegangenen Experiment (vgl. 3.4.3). MCvivo entstammt Parasitenmaterial des Isolats H95, welches am 19.12.19 direkt aus der Leber von *M. unguiculatus* entnommen und dessen extrahierte RNA anschließen in cDNA umgeschrieben worden war.

Als Primer kamen IPOX qPCR F2 und IPOX qPCR R2 zum Einsatz.

3.5 Lokalisation der Transkripte von *emipox* und ihr Bezug zu Stammzellen

Das Stammzellsystem von *E. multilocularis* wurde vor kurzem genauer charakterisiert (Koziol et al., 2014); die Bedeutung dieser einzigen zur Teilung fähigen Zellpopulation für potenzielle pharmakologische Zielstrukturen wurde herausgestellt (Brehm & Koziol, 2014). Um die Beziehung zwischen der Transkription von *emipox* und dem Stammzellsystem von *E. multilocularis* zu charakterisieren, wurde eine WMISH durchgeführt. Unterschiedliche Larvenstadien wurden über fünf Stunden mit EdU inkubiert, um in einem nächsten Schritt mittels Antikörper diejenigen Zellen rot darstellen zu können, die sich in der Teilung befanden. DNA wurde mit dem blauen DAPI- Farbstoff sichtbar gemacht. Die an das Transkript von *emipox* gebundene RNA-Sonde stellt sich auf den Bildern grün dar.

Die anschließende Auszählung der Signale erfolgte in Schnittebenen im Abstand von 4 μm . Es wurden sechs *Protoscolices* (entspricht $0,2 \text{ mm}^2$), sowie $0,32 \text{ mm}^2$ an Vesikeln und $0,28 \text{ mm}^2$ an Primärzellen ausgezählt, wobei in den Primärzellaggregaten auch der leere Bereich in der Mitte mitgezählt wurde. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Tabelle 26 dargestellt.

Wie die Auszählung erfolgte auch die qualitative Auswertung mit Primärzellen, axenisch und aerob kultivierten Metacestoden und aktivierten und nicht aktivierten *Protoscolices*. Das Transkript von *emipox* konnte dabei in allen Larvenstadien nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Transkripte von *emipox* vor allem in Primärzellen auch in den roten, EdU-positiven Zellen vorhanden sind (vgl. Abbildung 22 Bild A1, Primärzellen, sogenanntes Co-staining). Ebenso trat ein positives Signal in Zellen auf, die sich in unmittelbarer Nähe zu EdU-positiven Zellen befanden, was darauf hinweist, dass Transkripte von *emipox* auch in einigen postmitotischen Zellen oder Germinalzellen außerhalb der S-Phase vorliegen könnten (vgl. Abbildung 22 Bild A2, Primärzellen). Neben dieser Assoziation zur Stammzellpopulation ließen sich Signale für *emipox* auch in Zellen abseits EdU-positiver Zellen finden.

Tabelle 26: Anzahl der Signale in den jeweiligen WMISH-Aufnahmen

	Primärzellen	Metacestoden	Aktivierte <i>Protoscolices</i>
EdU +	1055/ mm^2	341/ mm^2	2249/ mm^2 (73 pro <i>Protoscolex</i>)
<i>emipox</i> +	169/ mm^2	246/ mm^2	1385/ mm^2 (45 pro <i>Protoscolex</i>)
Costaining +	18/ mm^2	0/ mm^2	0/ mm^2

Auffallend wenige Signale fanden sich in den 14 Tagen axenisch und aerob kultivierten Metacestoden. Ein Unterschied zwischen beiden Kulturbedingungen konnte hier nicht festgestellt werden. Dagegen ließ sich in manchen *Protoscolices* eine Häufung erkennen

(vgl. Abbildung 22 Bilder C1 und C2 unten). Diese Häufung erscheint unabhängig davon zu sein, ob der Protoscolex evaginiert oder invaginiert war (vgl. Abbildung 22 Bild C1 mit evaginiertem und invaginiertem Protoscolex). Eine Korrelation mit stark EdU-positiven Protoscolices als Maß einer allgemeinen hohen mitotischen Aktivität ließ sich hier nicht herstellen. Hinsichtlich der Lokalisation im Protoscolex erscheinen die Signale über die gesamte Larve verteilt zu sein, wobei sich in dem vom Hakenkranz abgewandten Teil eine höhere Dichte beobachten ließ. Auffallend war dabei, dass sie vermehrt in den Zellen an der Oberfläche des Protoscolex aufzutreten schienen.

Mit Hilfe der WMISH konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *emipox* zwar nicht ausschließlich, aber auch in den teilungsfähigen Stammzellen erfolgt; in einigen Protoscolices liegen überdurchschnittlich viele Transkripte vor.

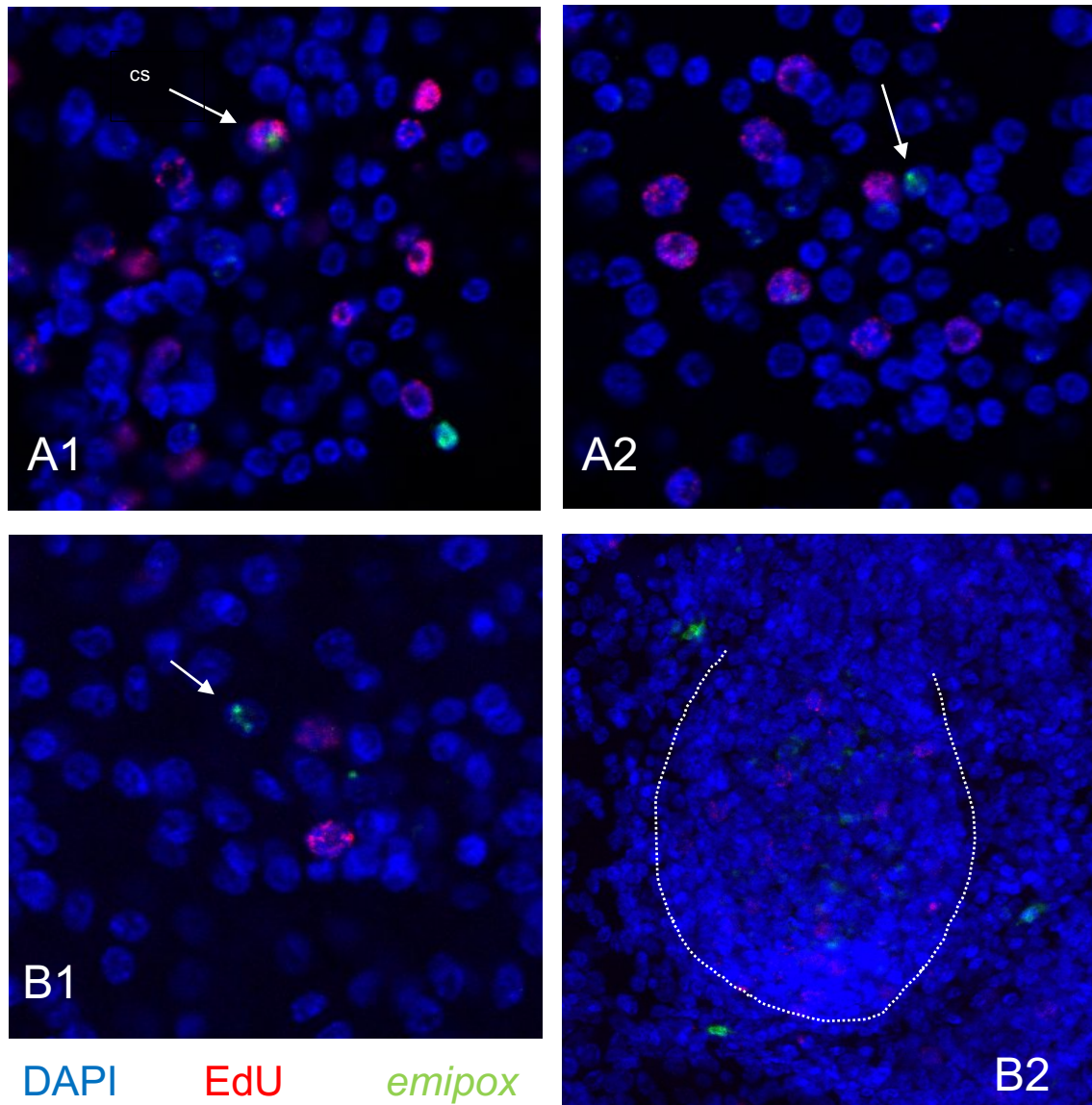


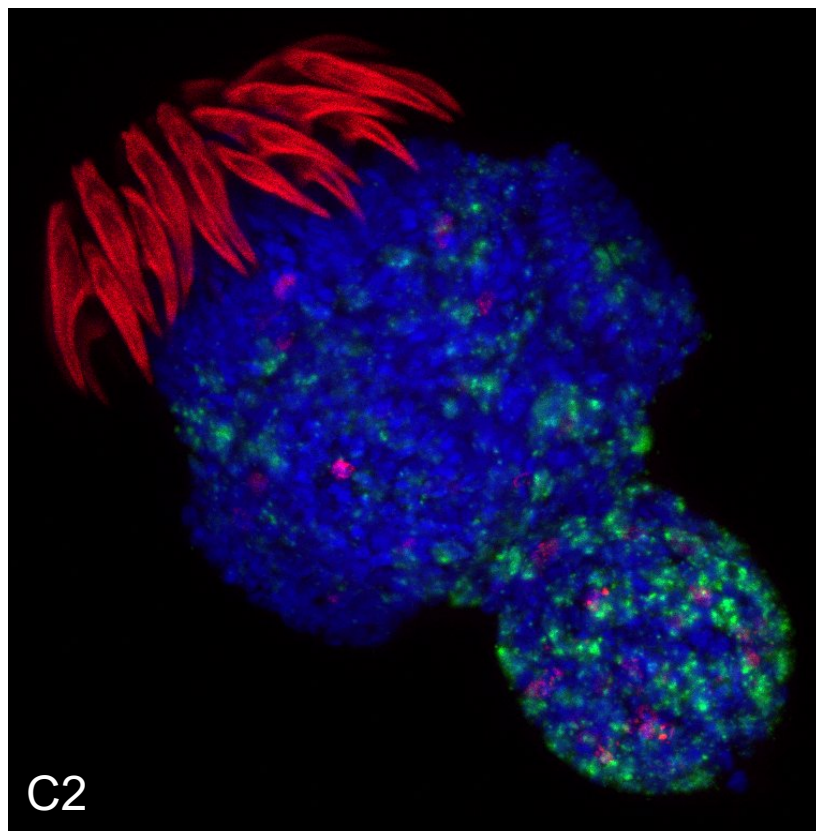
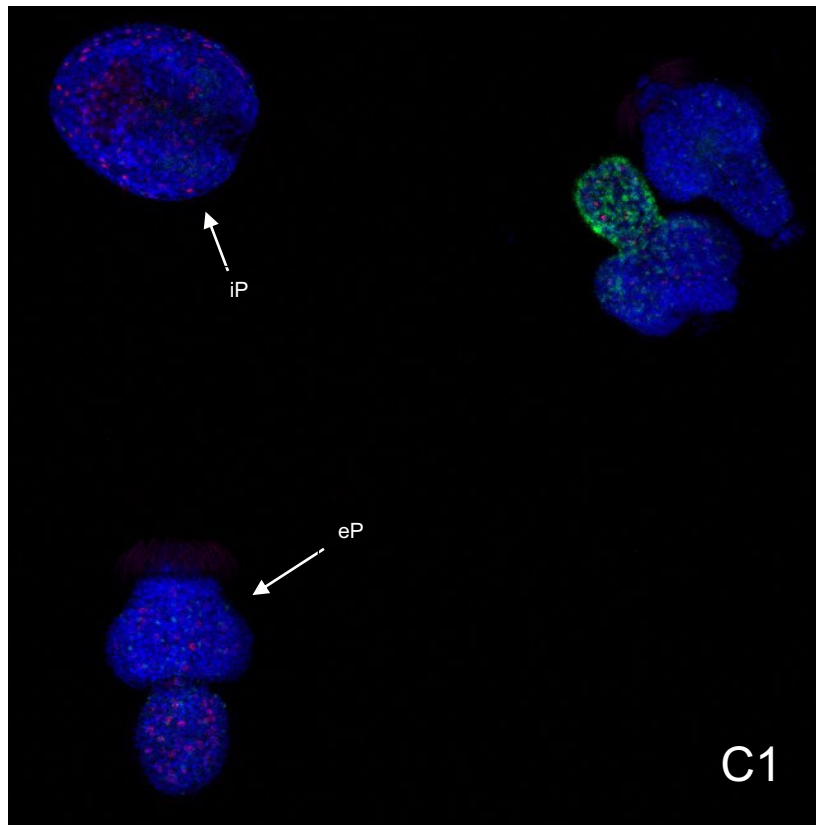
Abbildung 22: WMISH zur Darstellung der Lokalisation der *emipox*-Transkripte in den verschiedenen Stadien von *E. multilocularis*.

Um besser zu verstehen, wo im Organismus bzw. in welchem Zelltyp die Transkripte von *emipox* vorkommen, wurde eine WMISH durchgeführt. Eine mit DIG markierte RNA-Sonde zum Nachweis der *emipox*-Transkripte wurde mit Primärzellen (A), axenisch kultivierten Metacystodanvesikeln (B) und aktivierten Protoscolices (C) inkubiert.

A: Die dargestellten Primärzellen des Isolats H95 waren nach 4 Tagen in Kultur entnommen und für die WMISH vorbereitet worden. Dargestellt sind Costaining (cs), das heißt die Lokalisierung eines *emipox*-Transkripts in einer teilungsfähigen, EdU positiven Zelle. Außerdem zu sehen ist ein stark positives Signal im rechten unteren Bildrand von A1 in direkter Nachbarschaft zu einer EdU positiven Zelle. Diese enge topographische Beziehung kann auch in A2 nachvollzogen werden.

B: Deutlich weniger Signale fanden sich in über 14 Tage axenisch kultivierten Metacystodanvesikeln des Isolats H95. Ein Unterschied zwischen axenisch und aerob kultivierten Vesikeln zeigte sich nicht. Die weiß gestrichelte Linie in B2 deutet eine Brutkapsel in der Vesikelwand an.

Fortsetzung auf der nächsten Seite.



Fortsetzung von vorheriger Seite.

C: In aktivierten Protoscolices des Isolats RD15 fiel vor allem eine Häufung des Transkripts auf der vom Hakenkranz abgewandten Seite des Protoscolex auf. Die Transkripte von *emipox* traten gehäuft auf der Oberfläche auf. Parallel fanden sich auch Protoscolices ohne Signal (iP – invaginiertes Protoscolex; eP – evaginiertes Protoscolex).

3.6 Funktionelle Charakterisierung von EmIPOX

Um Aussagen über die physiologische Rolle von EmIPOX in *E. multilocularis* treffen zu können, wurde eine erste biochemische Charakterisierung vorgenommen. Davor war das Enzym heterolog exprimiert, aufgereinigt und mit Häm-inkubiert worden.

3.6.1 Remazol Brilliant Blue/RB19 ist kein Substrat von EmIPOX

Peroxidasen vom DyP-Typ sind bekannt für ihr breites Spektrum an Substraten. Es reicht von Lignin (vor allem fungale Peroxidasen) bis hin zu zahlreichen industriell eingesetzten Farbstoffen (Yoshida & Sugano, 2015). Besonders der Abbau von Remazol Brilliant Blue/RB19, zu dem die allermeisten Peroxidasen vom DyP-Typ in der Lage zu sein scheinen, fand in der Literatur Beachtung (Habib et al., 2019).

Um erste Rückschlüsse über eine mögliche Peroxidase-Aktivität von EmIPOX zu ziehen, wurde bei pH 4,2 eine 20 mM RB19-Lösung und eine 30 %-H₂O₂-Lösung mit aufgereinigtem Enzym versetzt. Das Ergebnis wurde makroskopisch auf eine stattgehabte Entfärbung hin beurteilt.

Interessanterweise konnte hier keine eine entfärbende Aktivität von EmIPOX in Anwesenheit von RB19 und Wasserstoffperoxid festgestellt werden (kein Bild). Eine spektrophotometrische Messung wurde durch starke Gasbildung erschwert. Es kann jedoch vermutet werden, dass das typische DyP-Substrat aus der Klasse der Anthrachinone nicht umgesetzt wird.

3.6.2 3,3'-Diaminobenzidin ist ein EmIPOX-Substrat

Um die Peroxidase-Aktivität von EmIPOX nachzuweisen, kamen gängige Peroxidase-Substrate zum Einsatz. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ist beispielsweise Teil des PierceTM DAB Substrate Kits zum chromogenen Nachweis der Horseradish-Peroxidase. Es ist

weiterhin bekannt für seinen Einsatz in unterschiedlichen histologischen Färbungen, besonders zur Sichtbarmachung von Peroxisomen.

In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und einer entsprechenden Peroxidase wird DAB oxidiert und fällt als unlösliches, bräunlich-flockiges Reaktionsprodukt aus. Auch EmIPOX war in der Lage, die entsprechende Reaktion zu katalysieren (vgl. Abbildung 23).

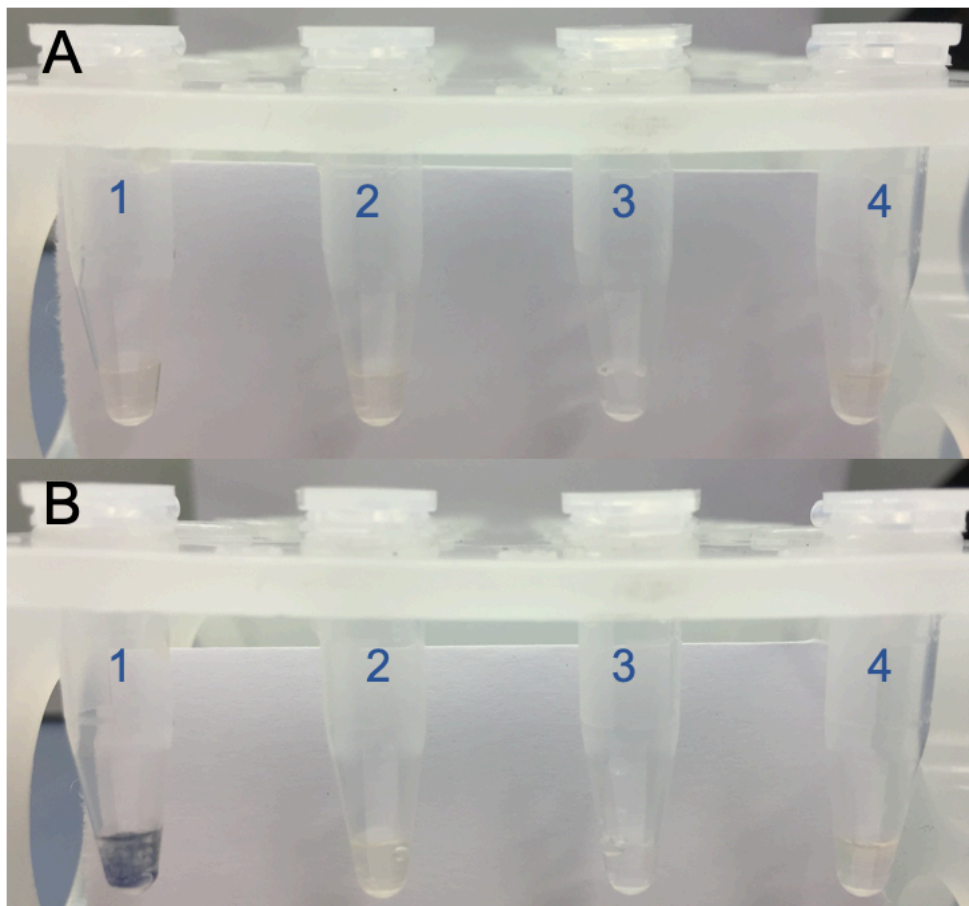


Abbildung 23: Makroskopischer Farbumschlag bei der Reaktion von EmIPOX mit DAB und H_2O_2 (Pierce™ DAB Substrate Kit)

Zum Nachweis der Peroxidase-Aktivität von EmIPOX wurde das Enzym zu DAB und H_2O_2 . ADie entsprechende Peroxidase ließ sich durch den Farbumschlag in B1 nachweisen. Zu sehen ist das wasserunlösliche Oxidationsprodukt.

A: 30 μ l Stable Peroxide Substrate Puffer wurden mit 3 μ l CN/DAB Substrate gemischt (1,4). Als Kontrolle dienten die Ansätze 2 und 3, in denen einmal Wasserstoffperoxid (2) und einmal die Substratlösung (3) durch gleiches Volumen an destilliertem Wasser ersetzt worden war.

B: 20 μ g aufgereinigtes EmIPOX (1-3) bzw. als Kontrolle das gleiche Volumen an destilliertem Wasser (4) wurden dem Ansatz aus A zugegeben. Das Foto wurde unmittelbar nach der Zugabe aufgenommen.

Das Ausfallen des Reaktionsprodukts macht eine Quantifizierung dieses Peroxidasenachweises schwierig. Mithilfe eines von Fahimi und Herzog beschriebenen Verfahrens (Fahimi & Herzog, 1973; Herzog & Fahimi, 1973), bei welchem DAB in 0,1%-Gelatine gelöst und so das Absinken des flockigen Präzipitats verhindert wird, wurde versucht, einen ersten Einblick das Maß der Enzymaktivität zu gewinnen.

Dabei wurden vier verschiedene Mengen Enzym (0/5/10/20 µg) in 30µl Substratpuffer (DAB in 0,1%-Gelatine) gegeben. Nach zwei Sekunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl einer 30%-Wasserstoffperoxid-Lösung gestartet. In Abhängigkeit von der Enzymmenge wurden unterschiedliche Mengen Substrat umgesetzt. In den Wells kam es zu unterschiedlich starker Gasbildung, was die photometrische Messung erschwerte. Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt, aufgeführt sind die Mittelwerte (vgl. Abbildung 24).

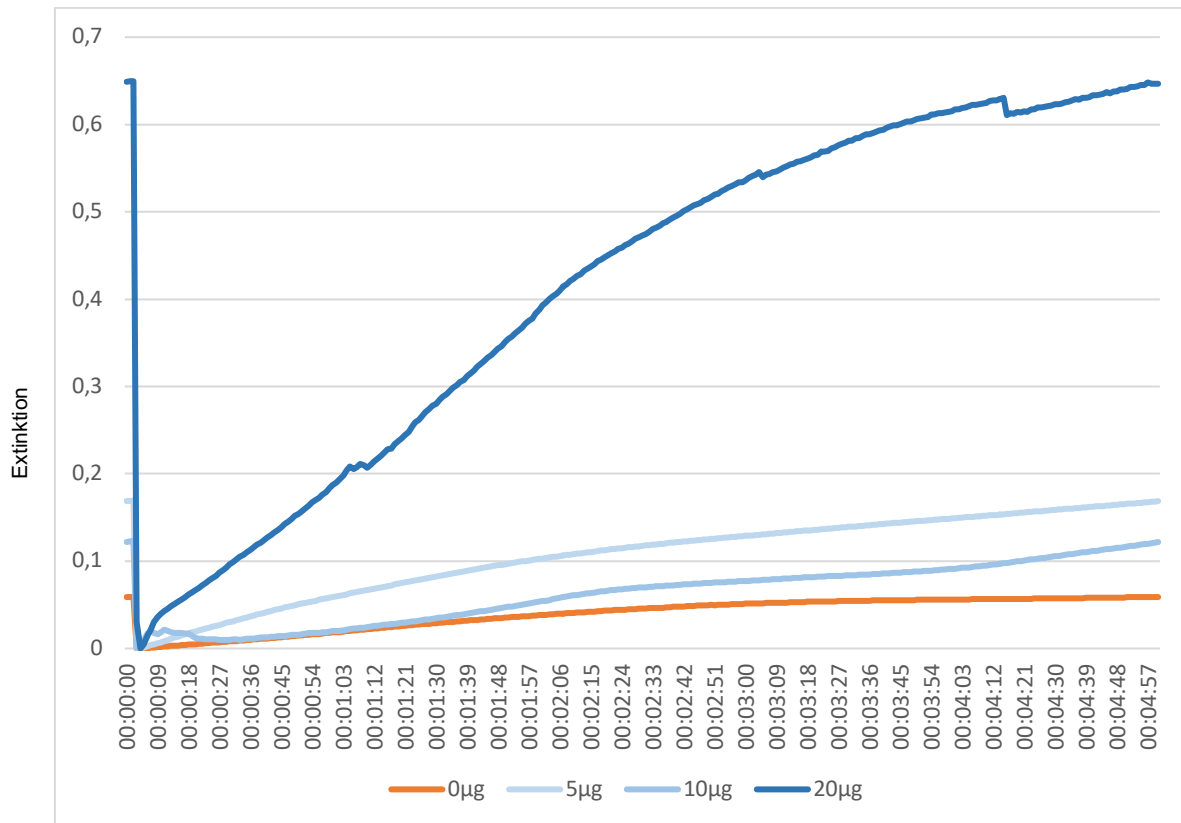


Abbildung 24: Zunahme der Extinktion bei der Oxidation von DAB mit unterschiedlichen Mengen von EmIPOX.

Je 30 µl des DAB- Substratpuffers (vgl. 2.7.2) und jeweils 0/5/10/20/30 µg an aufgereinigtem Enzym wurden in einen Well einer 96-Well-Platte gegeben. Durch die Zugabe von 20 µl einer 30%-H₂O₂- Lösung wurde die Reaktion gestartet. Die Extinktion wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 5 Minuten im Abstand von 1 sec bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen. Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde in dieser Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, sie kann jedoch in Abbildung 29 nachvollzogen werden. Ursächlich für die Streuung um den Mittelwert ist wohl vor allem die starke Gasbildung bei der Reaktion. Am Verlauf der Kurven ist zu erkennen, dass in Abhängigkeit von der Enzymmenge unterschiedliche Mengen Substrat umgesetzt wurden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Enzymmengen wurden für alle Reaktionen ein gemeinsamer Nullpunkt der Extinktion angenommen. Das Diagramm gibt somit keine Informationen über den absoluten Wert der Extinktion, wohl aber zum Verhältnis der Extinktionsänderung bei unterschiedlichen Enzymmengen.

3.6.3 EmIPOX ist bei saurem und basischem pH-Wert als Peroxidase aktiv

Als funktionelles Charakteristikum der DyP-Typ Peroxidasen wird in der Literatur neben dem breiten Substratspektrum oft ein Erhalt der Peroxidase-Aktivität bis weit ins saure Milieu hinein beschrieben (Yoshida & Sugano, 2015). Anhand des Assays mit DAB

wurde das pH-Spektrum von EmIPOX photometrisch ermittelt. Als Maß der Aktivität galt die maximale Veränderung der Extinktion über einen Zeitraum von fünf Minuten.

EmIPOX behält seine Peroxidase-Aktivität in einem pH-Spektrum, welches basische und saure Werte umfasst. Erst bei pH 2 konnte keine Oxidation von DAB mehr festgestellt werden (vgl. Abbildung 25).

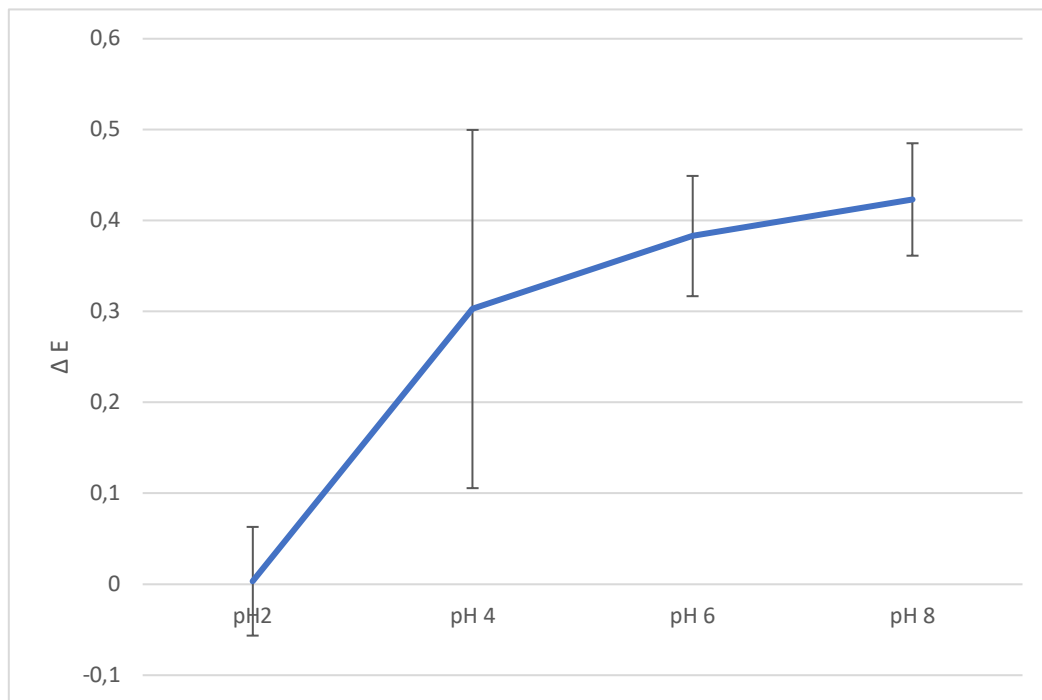


Abbildung 25: Maximale Veränderung der Extinktion bei der Oxidation von DAB durch EmIPOX bei unterschiedlichen pH-Werten.

Die Bestimmung des pH-Optimums von EmIPOX erfolgte spektrophotometrisch anhand der Absorption von DAB in 0,1%-Gelatine-Lösung. Der fertige Substratpuffer wurde wie in 2.7.2 beschrieben hergestellt und mit HCl auf die pH-Werte 2, 4, 6 und 8 eingestellt. Zu je 30 μ l Substratpuffer und jeweils 20 μ g aufgereinigtem Enzym wurden 20 μ l einer 30%-H₂O₂-Lösung gegeben und die Reaktion so gestartet. Die Absorption wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 5 Minuten im Abstand von 1 sec bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen. Als Maß der Aktivität wurde die maximale Veränderung der Extinktion verwendet. Die Untersuchung erfolgte in Triplets, der schwarze Balken beschreibt die Standardabweichung der Messungen. Auffallend ist eine breite Funktionalität des Enzyms bei unterschiedlichen pH-Werten, die sowohl das basische als auch das saure Milieu miteinschließen.

3.6.4 Luminol ist ein EmIPOX-Substrat

Als weiteres Substrat bot sich Luminol an, da seine Chemilumineszenz selbst bei Gasbildung problemlos messbar ist. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Pierce® ECL Western Blotting Substrate Kits (ThermoFisher) durchgeführt. Zu einer festen Menge Substrat/Enzym-Gemisch wurde 30%-Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben, um die Reaktion zu starten. EmIPOX zeigte sich auch hier als aktive Peroxidase, welche Luminol entsprechend der Menge an eingesetztem Enzym oxidierte (vgl. Abbildung 26).

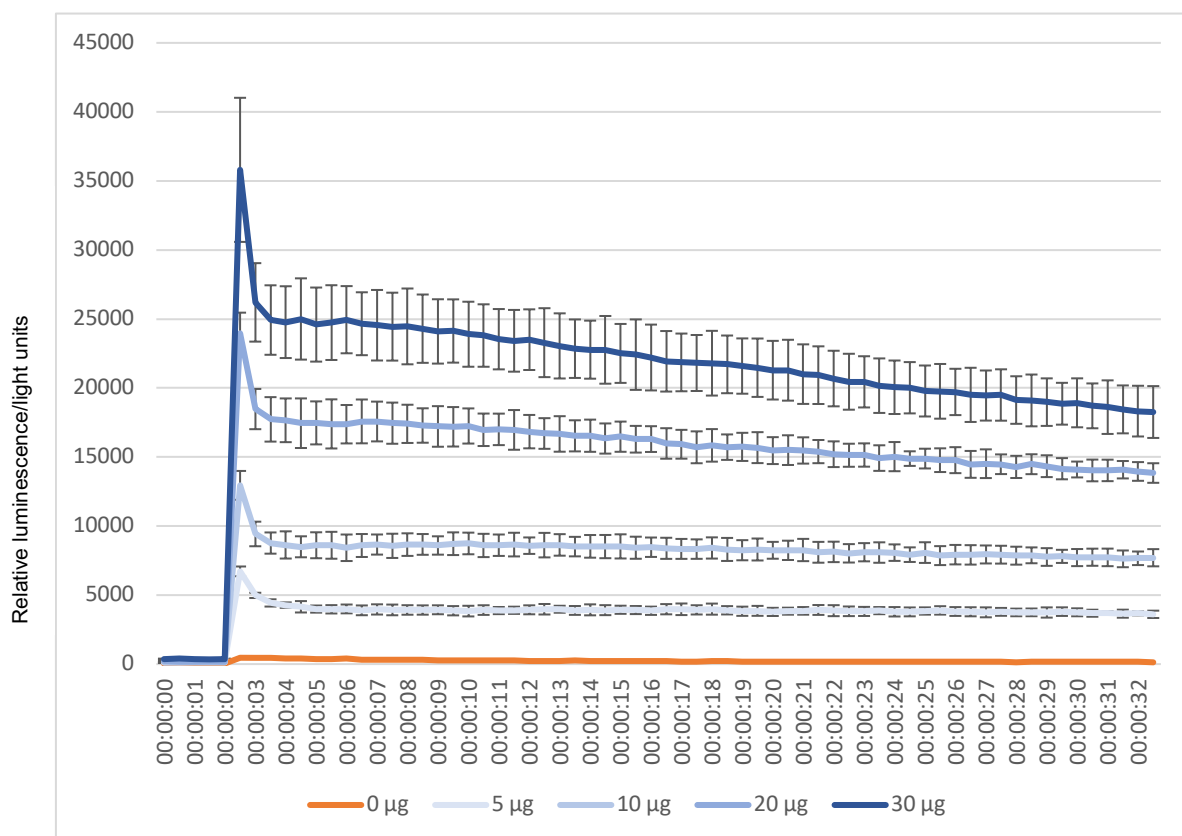


Abbildung 26: Oxidation von Luminol durch EmIPOX im zeitlichen Verlauf.

Ein weiterer Nachweis der Peroxidase-Aktivität erfolgte anhand der spektrophotometrisch gemessenen Chemilumineszenz des von EmIPOX umgesetzten Substrats Luminol. Die Reaktion erfolgte mithilfe des Pierce® ECL Western Blotting Substrate Kits (Thermo Fisher) auf einer 96-Well-Platte. Zu 20 µl der Substrat-Lösung und jeweils 0/5/10/20/30 µg aufgereinigtem Enzym wurden 20 µl der Peroxid-Lösung des Kits gegeben und die Reaktion so gestartet. Die Chemilumineszenz wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 32 Sekunden im Abstand von 500 msec gemessen. Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt. Die schwarzen Balken entsprechen den Standardabweichungen der Messungen.

3.6.5 EmIPOX besitzt Katalase-Aktivität

Bei den photometrischen Untersuchungen der Peroxidase-Aktivität von EmIPOX in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid fiel eine starke Gasbildung auf. In den Genvorhersagen für *E. multilocularis* findet sich kein Gen, das für eine Katalase kodieren würde. In einem Katalase-Aktivitäts-Gel wurde überprüft, ob EmIPOX neben der belegten Peroxidase-Funktion auch eine Katalase-Funktion besitzt.

Das Katalase-Aktivitäts-Gel zeichnet sich dadurch aus, dass sich Stellen, an denen Wasserstoffperoxid umgesetzt wird, nicht anfärben lassen. Der Abbau von Wasserstoffperoxid in Abwesenheit potenzieller Substrate konnte nachgewiesen werden. Mittels Western blot konnte zudem bestätigt werden, dass es sich bei als Katalase aktiven Protein um EmIPOX handelt (vgl. Abbildung 27).

Interessanterweise wurden nach der negativen Farbreaktion auf dem Gel Doppelbanden sichtbar. Diese Doppelbande konnte auf dem Western blot nicht nachvollzogen werden. Es handelt sich wahrscheinlich um ein anders gefaltetes Isoenzym von EmIPOX, welches im denaturierenden Western blot-Puffer seine Konfiguration verlor.

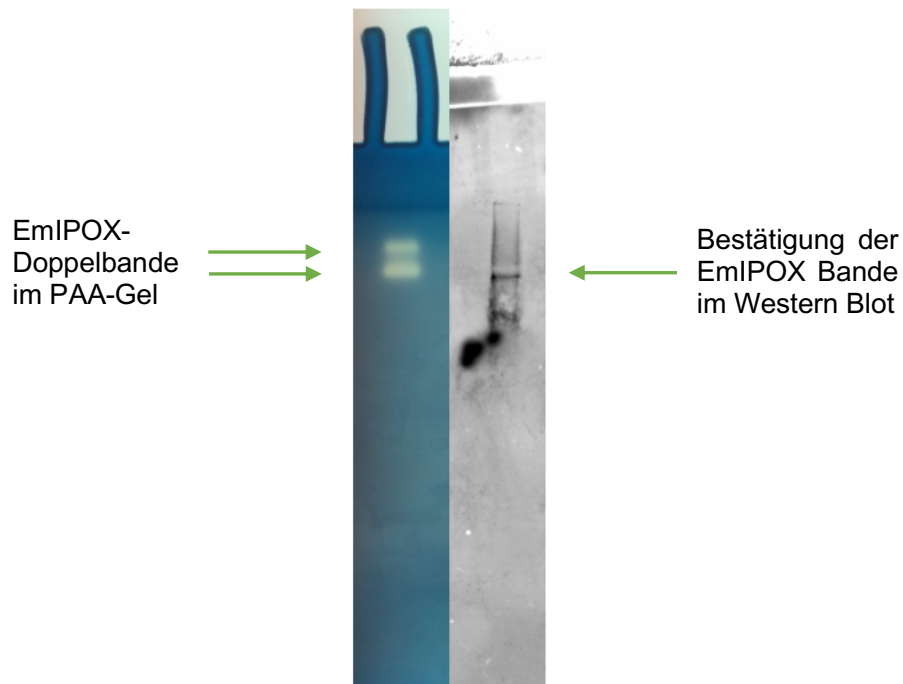


Abbildung 27: Nachweis der Katalase-Funktion von EmIPOX im Katalase-Aktivitätsgel.

Links: Die semiquantitative Bestimmung der Katalase-Aktivität erfolgte in einem 6,25% nativen PAA-Gel. Dafür wurden 31,5 µg des in *E. Coli* exprimierten und nativ aufgereinigten Enzyms 2,5 µl Laufpuffer aufgetragen und 100 Volt elektrischen Stroms angelegt. Das Gel wurde anschließend mit Wasserstoffperoxid inkubiert und mit Kalium-Eisen(III)-Cyanid gefärbt. Im Gel vorhandenes Wasserstoffperoxid reduziert Kalium-Eisen(III)-Cyanid zu Kalium-Eisen(II)-Cyanid, welches mit Eisenchlorid bläuliche Komplexe bildet. Sind im Gel Enzyme mit Katalase-Aktivität vorhanden, reagieren sie mit Wasserstoffperoxid und bauen dieses zu Wasser und Sauerstoff ab. Die anschließende Blaufärbung findet nicht statt und das Gel bleibt an diesen Stellen transparent.

Rechts: Zur Kontrolle wurde ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurde das Katalase-Aktivitätsgel im entsprechenden Blotting Puffer auf eine Porablot Nitrocellulose Membran (Macherey-Nagel) geblottet. Mittels 0,8 µl Anti-V5-AP Antikörper (invitrogen) und 30 µl NBT-BCIP® (Sigma) (als Substrat der an den Antikörper gebundenen Alkalischen Phosphatase) konnte EmIPOX nachgewiesen werden.

3.6.6 Katalase-Aktivität in den Zelllysaten verschiedener Stadien von *E. multilocularis*

Die Katalase-Aktivität des aufgereinigten Enzyms EmIPOX konnte mit Hilfe des Katalase-Aktivitäts-Gels nachgewiesen werden. Um Hinweise zu erhalten, in welchen Larvenstadien von *E. multilocularis* eine wichtige Rolle spielen könnte, wurden neben dem aufgereinigten Protein auch Zelllysate aus verschiedenen Stadien des Parasiten aufgetragen. Aktivierte und nicht aktivierte Protoscolices sowie Metacestoden aus der

Kultur und aus dem Peritoneum von *M. unguiculatus* wurden lysiert und die Lysate auf das Gel aufgetragen.

Weder in Protoscolices noch in Metacestoden aus Kultur konnte eine Katalase-Aktivität nachgewiesen werden. Nur in der Probe der Metacestoden aus dem Peritoneum von *M. unguiculatus* zeigte sich eine Katalase-Aktivität, wobei die entsprechende Bande sich in ihrem Laufverhalten von aufgereinigtem EmIPOX unterschied. Die Bande der Metacestoden aus dem Peritoneum befand sich am Übergang von Sammelgel und Trenngel (vgl. Abbildung 28).

Während das aufgereinigte Protein und ein Zelllysat aus dem Peritoneum von *M. unguiculatus* im Katalase-Aktivitäts-Gel Banden hinterließen, ließ sich der Abbau von Wasserstoffperoxid durch Stoffe aus den Zelllysaten von Protoscolices und Metacestoden aus dem Kultursystem also nicht zweifelsfrei nachweisen.

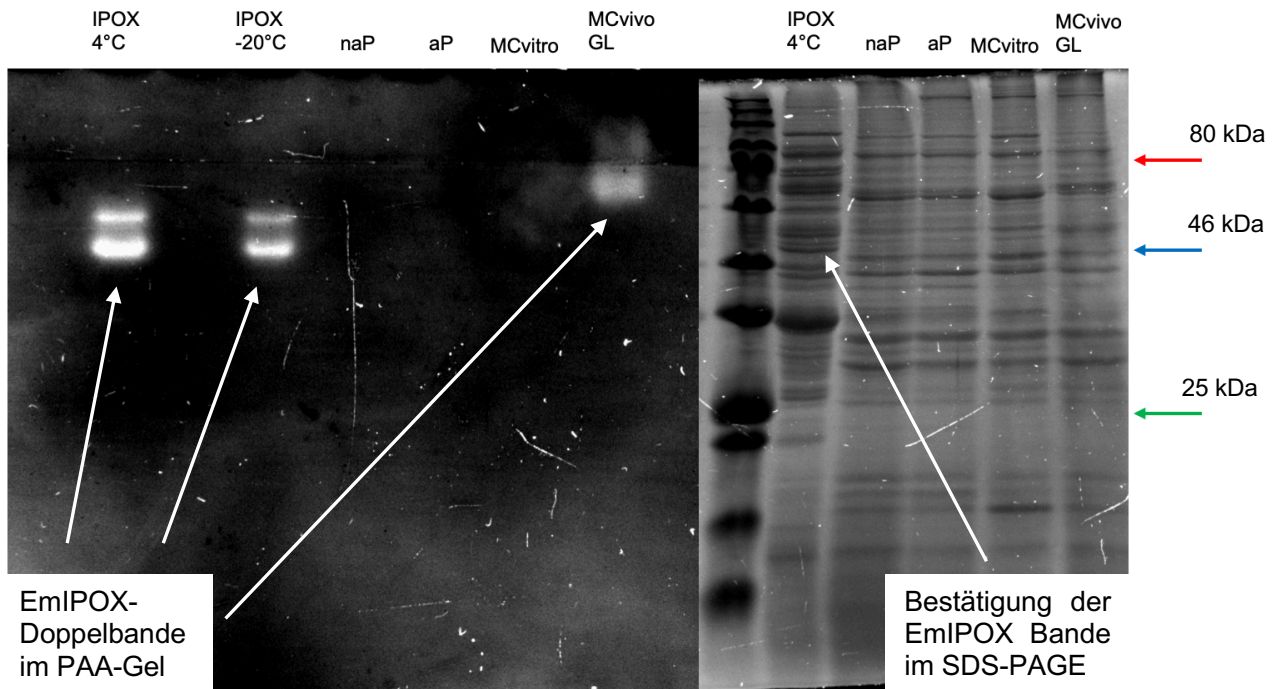


Abbildung 28: Vergleich der Katalase-Aktivität verschiedener Larvenstadien im Katalase-Aktivitätsgel.

Links: Die semiquantitative Bestimmung der Katalase-Aktivität aufgereinigter Lysate verschiedener Larvenstadien von *E. multilocularis* erfolgte in einem 6,25% nativen PAA-Gel. Dabei wurden pro Spur je 12 µg Protein in STOP-Mix und nicht denaturierendem Lysepuffer aufgetragen. Die Proteinextraktion und Aufreinigung von MCvivo GL (Isolat BN19) erfolgte direkt nach dessen Entnahme aus dem Peritoneum von *M. unguiculatus*. MCvitro (Isolat H95) entstammt Metacestoden aus dem Kultursystem, welche 2 Tage vor Proteinextraktion und -aufreinigung axenisch gemacht worden waren. Weiterhin wurden die extrahierten und aufgereinigten Proteine von aktivierten (aP) und nicht aktivierten Protoscolices (naP) des Isolats LCS18 aufgetragen. Als Positivkontrollen wurden einmal 12 µg (IPOX -20 °C) und einmal 31,5 µg (IPOX 4 °C) des in *E.Coli* exprimierten, nativ aufgereinigten Enzyms EmIPOX verwendet. Für die entfärbten Stellen im Gel kann eine Katalase-Aktivität angenommen werden.

Rechts: Mit den gleichen Proteinmengen wurde parallel ein SDS-PAGE (10% PAA) durchgeführt. Als Marker wurde #P7712 (NEB) verwendet (linke Spur). Der rote Pfeil markiert eine Masse von 80kDa, der grüne Pfeil zeigt auf 25kDa. Die kräftige Proteinbande in der Spur IPOX 4 °C befindet sich auf Höhe des blauen Pfeiles und entspricht mit knapp über 46kDa der Größe des aufgereinigten Enzyms EmIPOX.

4 Diskussion

E. multilocularis ist der Erreger der potenziell tödlichen AE. Effiziente Optionen zur Chemotherapie der Parasitose werden dringend benötigt. Sowohl die Expression in Stammzellen (Brehm & Koziol, 2014) wie die Beteiligung in der Abwehr von ROS (Perbandt et al., 2014) wurden als vielversprechende Kriterien für pharmakologische Zielstrukturen beschrieben.

Das Genom von *E. multilocularis* weist kein Gen einer klassischen Katalase auf. Allerdings ergaben die Analysen des Genoms von *E. multilocularis* (Tsai et al., 2013) ein Gen, welches der Genvorhersage von WBPS nach für eine Peroxidase vom DyP-Typ codiert. Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick in die Expression des codierenden Gens in unterschiedlichen Stadien von *E. multilocularis* und die Biochemie seiner DyP-Typ Peroxidase zu erlangen, um ihr Potential als potenzielle pharmakologische Zielstruktur zu erkunden. Es handelt sich dabei um die erste Charakterisierung einer DyP-Typ Peroxidase bei Tieren.

4.1 Phylogenetik

In der phylogenetischen Untersuchung der Beziehung von *emipox*/EmIPOX zu DyP-Typ Peroxidasen anderer Arten, fiel vor allem auf, dass der Mensch über kein verwandtes Enzym zu verfügen scheint. Einer der Nachteile der gängigen Antihelminthika aus der Gruppe der Benzimidazole ist ihre Affinität zu humanem Tubulin, welche für die unerwünschten Arzneimittelwirkungen verantwortlich gemacht wird (Siles-Lucas et al., 2018). Die Abwesenheit von DyP-Typ Peroxidasen im Menschen und in der Maus sollte Anlass zur weiteren Erforschung der Bedeutung von EmIPOX als potenzieller pharmakologischer Zielstruktur geben.

Ein Blick auf die Verteilung der DyP-Typ Peroxidasen lässt ihr Vorhandensein bei höheren Eukaryoten selbst wie ein Sonderfall erscheinen (vgl. Abbildung 5). Im Rahmen einer phylogenetischen Analyse der Cld-Superfamilie kommen Zamocky et al. zu der Annahme, dass wiederholte HGT stattgefunden haben müssen, zum einen von Proteobakterien der Klasse B (bzw. P) auf niedrige Eukaryoten, zum anderen von dort auf höhere Eukaryoten wie zum Beispiel Plattwürmer (Zámocký et al., 2015).

Das weit verstreute Auftreten von DyP-Typ Peroxidasen bei Deuterostomiern lässt einen Generwerb durch vereinzelte HGT wahrscheinlich erscheinen. Anders stellt sich die evolutionäre Situation innerhalb der Plattwürmer dar. DyP-Typ Peroxidasen sind im Stamm Plathelminthes weit verbreitet und lassen sich sowohl in parasitären wie freilebenden Arten nachweisen. Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine orthologe Beziehung zwischen den Enzymen hin. Eine spezielle Korrelation zwischen DyP-Typ Peroxidasen und einer parasitären Lebensweise erscheinen unwahrscheinlich.

Während in Cestoden und Planarien nur eine Kopie des Gens vorliegt, enthalten die Genome von Schistosomen der Vorhersage nach interessanterweise mehrere Kopien von Genen, die für DyP-Typ Peroxidasen codieren. Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu der allgemein beschriebenen Genomreduktion von Planarien über Trematoden zu Cestoden (Tsai et al., 2013). Die eigenen Ergebnisse, besonders die Nähe einiger der Gene auf dem Genom, lassen daher eine Genverdoppelung der DyP-Typ Peroxidasen bei Schistosomen vermuten. Neben der paralogen Beziehung sind aber auch Xenologe nicht auszuschließen.

Um die hohe Anzahl an Genkopien bei Schistosomen besser zu verstehen, wären hier weitere phylogenetische Analysen wünschenswert. Die potenzielle Bedeutung schistosomaler DyP-Typ Peroxidasen für die Entwicklung neuer anti-schistosomaler

Medikamente wurde bereits herausgestellt (Hughes & Friedman, 2011). Auch für das tiefere Verständnis der physiologischen Rolle von DyP-Typ Peroxidasen bei parasitären Plattwürmern könnte eine solche Analyse hilfreich sein. In diesem Zusammenhang sollte vor allem untersucht werden, ob es sich bei den codierten Enzymen um isofunktionale oder heterofunktionale Paraloge handelt (für die Terminologie vgl. Jensen, 2001).

4.2 Ist EmIPOX die gesuchte Katalase von *E. multilocularis*? – Überlegungen zur physiologischen Rolle des Enzyms

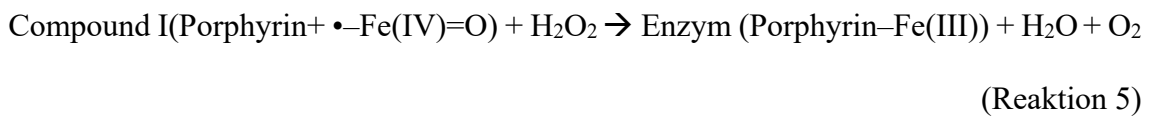
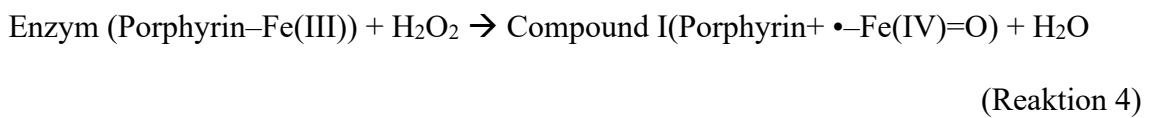
In den durchgeführten Versuchen konnte sowohl eine Peroxidase- als auch eine Katalase-Aktivität von EmIPOX nachgewiesen werden. Dies erfolgte zum einen durch die Oxidierung von DAB und Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und zum anderen durch den Abbau von Wasserstoffperoxid unter Gasbildung. Handelt es sich nun um eine Peroxidase oder um eine Katalase? Um eine Peroxidase mit Katalase- oder gar um eine Katalase mit Peroxidase-Aktivität?

4.2.1 EmIPOX – another „catalase in peroxidase clothing“ (Njuma et al., 2014)?

Katalase-Aktivität wurde für DyP-Peroxidasen bisher nicht berichtet. Dailey et al. weisen sogar explizit daraufhin, dass Yfex, eine der beiden DyP-Typ Peroxidasen von *E. Coli* und zudem der Klasse B/P zugehörig, keine Katalase-Aktivität zeigt: „neither apo- nor holo-YfeX has catalase activity“ (Dailey et al., 2011). In der Zwischenzeit kamen allerdings auch Zweifel an der physiologischen Peroxidase-Funktion von Enzymen der Klasse B/P auf: So liegen ihre k_{cat}/K_m -Werte nachweislich um das zwei- bis dreifache unter den effizienteren Peroxidasen der Klassen C und D (bzw. V) und ihre vermutete physiologische Funktion scheint von Organismus zu Organismus zu variieren (Singh & Eltis, 2015).

Um die Katalase-Aktivität der DyP-Typ Peroxidase EmIPOX besser einordnen zu können, muss auf drei Gruppen von (Häm-)Enzymen genauer eingegangen werden:

Typ 1) Typische monofunktionale Häm-Katalasen (EC 1.11.1.6): Diese klassischen Katalasen katalysieren als einzige die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff (Vlasits et al., 2010). Die Dismutation umfasst die folgenden beiden Reaktionen:



Typ 2) Bifunktionale Enzyme aus der Superfamilie der Katalase-Peroxidasen (EC 1.11.1.21) (vgl. Zámocký et al., 2015): Die Katalase-Aktivität dieser Enzyme erreicht mit den monofunktionalen Katalasen von Typ 1) vergleichbare $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte. Phylogenetisch scheinen sie die ältere Gruppe zu sein, was auf einen Verlust der Bifunktionalität in der Evolution hindeutet (Vlasits et al., 2010). Eine Besonderheit der Katalase-Peroxidasen ist der zweite Cofaktor neben dem Häm: Für ihre Katalase-Aktivität (nicht für die Peroxidase!) ist ein Methionin-Tyrosin-Tryptophan (MYW) Addukt nötig (Njuma et al., 2014).

Typ 3) Für viele weitere Häm-Moleküle ist ebenfalls eine Katalase-Aktivität belegt: Dies trifft auf Metmyoglobin und Methämoglobin ebenso zu wie auf die meisten Häm-Peroxidasen (Vlasits et al., 2010). Nicholls et al. äußern sogar die folgende Vermutung: „it is possible that all heme-containing proteins may exhibit catalatic reactions if assayed

carefully” (Nicholls et al., 2000). Wegen ihrer geringen Effizienz wird die Katalase-Aktivität von Peroxidasen auch als Pseudo-Katalase-Aktivität bezeichnet, vor allem deshalb, da keine Dismutation von Wasserstoffperoxid, wie sie in Reaktion 1 und 2 aufgeführt ist, stattfindet. Stattdessen können je nach Peroxidase verschiedene Reaktionen erfolgen, die auch einen Compound II und Compound III umfassen, sowie zu Freisetzung von ROS wie dem Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) führen können (für die genauen Reaktionen vgl. Vlasits et al., 2010).

Gene, die für Katalasen von Typ 1) oder 2) codieren, sind bei Neodermata nicht beschrieben (Mkoji et al., 1988; Williams et al., 2013) und konnten auch im Genom von *E. multilocularis* nicht identifiziert werden. Stattdessen wird für den Abbau von Wasserstoffperoxid auf nicht-enzymatische Prozesse durch zum Beispiel Peroxiredoxine hingewiesen (Gretes et al., 2012). Bei frei lebenden Planarien wie *Dugesia japonica* und *Schmidtea mediterranea* konnten dagegen spezifische Katalasen gefunden werden (Zhang et al., 2018).

Die klare morphologische und phylogenetische Zugehörigkeit von EmIPOX zu den DyP-Peroxidasen lässt vermuten, dass es sich bei der beobachteten Katalase-Aktivität von EmIPOX am ehesten um eine Pseudo-Katalase-Aktivität vom Typ 3) handelt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Katalase-Aktivität allgemein oder unter bestimmten Bedingungen Vorrang vor der Peroxidase-Aktivität genießt. Ohne eine Bestimmung der Enzymaktivität von Peroxidase und (!) Katalase (soweit das für Katalase-Reaktionen möglich ist) unter unterschiedlichen Umweltbedingungen kann diese Frage nicht abschließend beantwortet werden. Weitere Untersuchungen zu Kinetik und pH-Optimum beider Aktivitäten sollten stattfinden. Das würde zum einen Vergleich der beiden Aktivitäten gegeneinander, zum anderen einen Vergleich mit anderen Enzymen, die die

gleichen Reaktionen katalysieren, und Rückschlüsse auf die physiologische Rolle in *E. multilocularis* ermöglichen.

Stellte sich die Katalase-Aktivität dabei als relativ ineffizient im Vergleich zur Peroxidase-Aktivität heraus, wäre eine tragende Rolle in der Entgiftung von ROS keinesfalls auszuschließen. Im Gegenteil müsste ein solches Ergebnis im Kontext einer weiteren Besonderheit der Häm-Peroxidasen interpretiert werden; denn Wasserstoffperoxid ist nicht nur das Substrat dieser Peroxidasen, sondern auch Inhibitor. Dieser Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von Peroxidasen durch Wasserstoffperoxid und deren Schutz durch Reduktionsmittel in Form anderer Substrate ist lange bekannt (Arnao et al., 1990). Die irreversible Inhibierung der Peroxidasen konnte auch für DyP-Peroxidasen nachvollzogen werden. Für das bakterielle Enzym YfeX stellen Dailey et al. einen entsprechenden „suicide activity loss“ (Dailey et al., 2011) fest. Der Sinn einer (Pseudo-)Katalase-Funktion könnte darin liegen, die Inaktivierung durch den Verbrauch von Wasserstoffperoxid zu verlangsamen – und den Abbau von Wasserstoffperoxid im Sinne einer Peroxidase so lange wie möglich aufrecht zu erhalten (Vlasits et al., 2010).

Das Ausmaße der (Pseudo-)Katalase-Aktivität kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt und ohne Quantifizierung der Aktivität von EmIPOX schwer eingeschätzt werden. Im Abbau von Wasserstoffperoxid könnte allerdings sowohl die Katalase- als auch Peroxidaseaktivität beteiligt sein.

4.2.2 Das *emipox*-Transkriptprofil weist auf eine Beteiligung in der Abwehr von exogenem, oxidativem Distress hin

Viele Elemente des Entgiftungssystems für Peroxide bei parasitären Plathelminthen wurden in den letzten Jahren entschlüsselt: Neben je einer Cu/Zn- und Mn-Superoxid-

Dismutase beruht die Entgiftung von ROS bei Trematoden und Cestoden auf Peroxiredoxinen und einer Glutathion-Peroxidase, die Wasserstoffperoxid zu Wasser und Lipidperoxide zu Alkoholen abbauen können (Williams et al., 2013). Im Unterschied zum Menschen erfolgt die Regeneration der Prxs und des Glutathions hier aber nicht durch die Enzyme Thioredoxin-Reduktase und Glutathion-Reduktase, sondern durch eine kombinierte Thioredoxin-Glutathion-Reduktase, welche beide Funktionen verknüpft (Bonilla et al., 2008). Zusätzlich ist die TGR in der Lage, glutathionylierte Proteine zu reduzieren (Bonilla et al., 2011). Dieses Kombi-Enzym wurde bereits als der „Flaschenhals“ für Entgiftung, Redox-Homöostase und die Synthese von Deoxyribonukleotiden in parasitären Plattwürmern bezeichnet (Williams et al., 2013).

Interessanterweise weichen die Transkriptprofile aller dieser Enzyme in *E. multilocularis* stark vom Transkriptprofil von *emipox* ab und weisen – sofern in der Annotation des Transkriptoms benannt – ein relativ gleichmäßiges Profil über alle Stadien des Parasiten hinweg auf (Herz & Brehm, Manuskript in Vorbereitung). Die starken Schwankungen in der Transkriptmenge von *emipox* in unterschiedlichen Stadien des Parasiten stehen dazu in Gegensatz und sollten vor diesem Hintergrund interpretiert werden. Die eingangs vorgestellten Konzepte „oxidativer Eustress“ und „oxidativer Distress“ bieten dafür eine geeignete Vorlage.

Oxidativer Eustress beschreibt das Vorhandensein physiologischer Vorgänge, in denen Wasserstoffperoxid die Position eines zentralen Signalmoleküls einnimmt, das unterschiedliche Redox-Signale vermittelt und dessen Aufgaben bis hin zur Regulation von Transkriptionsfaktoren reicht (Marinho et al., 2014). Der kontinuierliche Anfall von Wasserstoffperoxid aus beispielsweise der mitochondrialen Armungskette, einem der physiologischen Hauptproduzenten von ROS (Sies, 2017), macht keine großen

Unterschiede in der Genexpression antioxidativer Enzyme nötig. Erst wenn eine bestimmte Schwelle überschritten und das Redox-Gleichgewicht gekippt wird, kann von oxidativem Distress, gekennzeichnet durch die akute Überforderung der vorhandenen Systeme und den resultierenden oxidativen Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen, gesprochen werden. Es ist anzunehmen, dass dieser Distress eine andere Antwort des Organismus induziert als der kontinuierliche Eustress. In siRNA-Versuchen bei *E. granulosus* konnte gezeigt werden, dass ein unphysiologischer Anstieg von Wasserstoffperoxid in *Protoscolices* zu reduziertem Wachstum führte (Wang et al., 2018). Für *E. multilocularis* konnte gezeigt werden, dass oxidativer Distress, vermittelt durch Tumorsuppressor-p53, zur Apoptose führt (Cheng, Zhu, et al., 2015).

Oxidativer Distress stellt für den Organismus also eine Bedrohung dar, gegen die er sich zur Wehr zu setzen hat. Der signifikante Unterschied der *emipox*-Transkripte zwischen den Metacestoden aus axenischer und aerober Kultur ließe sich durch oxidativen Distress, verursacht durch die Anwesenheit von Sauerstoff, erklären. Ein Einfluss der Fütterzellen auf die Induktion der Genexpression von *emipox* in der Co-Kultur kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Der starke Anstieg der Menge an *emipox*-Transkripten im aktivierten Protoscolex (30-mal mehr als im nicht aktivierten) ließe sich ebenfalls auf massiven oxidativen Distress, zum Beispiel bedingt durch ein Absenken des pH-Werts auf 2, zurückführen (für die den genauen Vorgang der *in vitro*-Aktivierung, der die Magenpassage im Endwirt simuliert vgl. 2.4.4). Diese Annahme deckt sich mit der Beobachtung, dass DyP-Typ Peroxidasen bis weit ins saure Milieu funktionell aktiv zu bleiben scheinen (Yoshida & Sugano, 2015). Unabhängig vom eigentlichen Aktivierungsvorgang könnte auch die Vorbereitung auf die spezielle Redox-Situation im Darm des Endwirts, wo nicht nur die Epithel- und

Immunzellen des Wirtes, sondern auch das Mikrobiom als ROS-Produzenten fungieren, eine Rolle spielen (Aviello & Knaus, 2018). Die Erforschung der komplexen Wechselwirkungen zwischen Mikrobiom, Parasit und Wirt steht noch am Anfang (Cortés et al., 2019). Mit Blick auf eine mögliche Rolle von *emipox* in diesem Zusammenhang könnte zum Beispiel die Transkriptmenge und -lokalisierung bei adulten Bandwürmern Aufschluss geben.

Dass massiver Distress der Grund für die hohe Menge an *emipox*-Transkripten im aktivierten Protoscolex ist, wird durch eine Beobachtung im Transkriptom von *E. multilocularis* unterstützt: Nur wenige Transkripte weisen ähnliche Mengenunterschiede zwischen aktivierten und nicht aktivierten Protoscolices auf, darunter aber auffallend viele „Stressproteine“ wie zwei Hsp70, eine Glutathion-S-Transferase sowie zwei Enzyme zur Regeneration von DNA (Purin nucleotid phosphatase, concentrative Na⁺ nucleosid transporter) (Herz & Brehm, Manuskript in Vorbereitung).

Für *Halobacterium salinarum* NRC-1 (Kaur et al., 2010) und *Francisella tularensis* Schu S4 (Binesse et al., 2015) sind differenzierte Untersuchungen der Rolle von DyP-Typ Peroxidasen in der ROS-Abwehr beteiligter Enzyme erfolgt. Kaur et. al unterscheiden dabei zwischen den beiden Stressoren H₂O₂ und Paraquat, welches zur intrazellulären Freisetzung von O₂⁻ führt. Während beide SOD zum Beispiel nur durch Paraquat induziert werden konnten, wurde die DyP-Typ Peroxidase durch beide Stressoren induziert, wobei die höhere Expression bei H₂O₂ zu verzeichnen war. Binesse et al. beobachteten eine Hochregulierung Enzymexpression bei niedriger und mittlerer H₂O₂-Konzentration, wohingegen bei hoher Konzentration eine Katalase-Peroxidase die Hauptfunktion in der Entgiftung zu übernehmen schien. Die Ergebnisse bestätigen zum einen das Vorhandensein verschiedener antioxidativer Systeme in Abhängigkeit von

Grad und Art des oxidativen Stresses. Zum anderen weisen sie der jeweiligen DyP-Typ Peroxidase eine tragende Rolle in der Stressantwort zu.

Diese Erkenntnisse lassen sich allerdings nicht direkt auf Cestoden übertragen. Erst kürzlich erfolgte eine Analyse der proteomischen Stressantwort bei *Protoscolices* von *E. granulosus*, die mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden (Cancela et al., 2019). Im Gegensatz zur berichteten Stressantwort bei den beiden Prokaryoten konnte hier keine Hochregulierung der Expression einer DyP-Typ Peroxidase beobachtet werden. Ebenso wenig konnten in ersten, im Labor an Primärzellen von *E. multilocularis* durchgeführten *emipox*-knockdown Versuchen mittels RNA-Interferenz eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Diese sollten jedoch wiederholt und die untersuchten Primärzellen gezielt mit Wasserstoffperoxid bzw. Paraquat unter oxidativen Distress gesetzt werden. Auch könnte eine Analyse der Induktion der Genexpression bei *in vitro*-kultivierten Metacestoden durch unterschiedliche Stressoren erfolgen.

Die diskutierte Rolle von EmIPOX in der Antwort auf oxidativen Distress steht nicht im Widerspruch zu bereits charakterisierten antioxidativen Strategien in *E. multilocularis*. Der Einsatz von EmIPOX als einer Art Backup-System bei hohem exogenen Distress könnte diese maßgeblich ergänzen. Das wird deutlich, wenn man sich eine Besonderheit in der Regulation der beschriebenen TGR vor Augen führt: Während die TR-Funktion des Kombi-Enzyms auch unter stark oxidativen Bedingungen aktiv zu bleiben scheint, wurde berichtet, dass eine hohe [GSSG/GSH]-Ratio die Deglutathionylierungs- und die GSSG-Reduktionsaktivitäten des Enzyms hemmen. „Peroxidases have more functions than a Swiss army knife“ (Passardi et al., 2005): Eine mögliche Rolle von EmIPOX könnte die Verstärkung der antioxidativen Abwehr unter diesen Bedingungen sein.

4.2.3 Hochregulation der Transkription von *emipox* in der Wirtsleber

Dass EmIPOX im Protoscolex durch exogenen, oxidativen Distress induziert wird, erscheint aus den oben angeführten Gründen wahrscheinlich. Auch im Metacestoden aus der infizierten Leber von *M. unguiculatus* wurden im Vergleich zum Parasitenmaterial aus dem Bauchraum eine stark erhöhte Menge an Transkripten nachgewiesen werden. Die Leber entspricht der physiologischen Lokalisation des Metacestoden im Zwischenwirt. Oxidativer Distress wäre hier am ehesten auf ein Entgleisen des oxidativen Gleichgewichts zwischen Wirt und Parasit zu Ungunsten des Parasiten zurückzuführen. Welche Faktoren in der Leber zu einer verstärkten Transkription von *emipox* führen und im Bauchraum nicht vorhanden sind, kann beim jetzigen Kenntnisstand nicht beantwortet werden. Fest steht, dass der Parasit in der Leber sowohl gegenüber endogenen als auch exogenen ROS aus Immunzellen exponiert ist (Callahan et al., 1988). Für den Leber- und Gallengangparasiten *Clonorchis sinensis* wurde berichtet, dass das durch H₂O₂ induzierte, als Peroxidase aktive und sezernierte Hämoprotein Myoglobin *in vitro* das Ausmaß der ROS-Generierung von Makrophagen zu senken vermochte (Ren et al., 2014). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob EmIPOX eine ähnliche immunmodulatorische Funktion in der Leber ausüben könnte.

Die Sekretion von DyP-Typ Peroxidasen ist prinzipiell keine Seltenheit. Gerade die DyP-Typ Peroxidasen der Klasse D (bzw. V), welche vor allem Enzyme von Basidiomyceten umfasst, enthalten Signalpeptide und werden dementsprechend sezerniert (Yoshida & Sugano, 2015). Auch bei bakteriellen DyP-Typ Peroxidasen finden sich Sekretionsmechanismen, die vor allem über das Tat-System vermittelt werden (Sturm et al., 2006). Eine Sekretion von EmIPOX in *E. multilocularis* wäre insofern ebenfalls denkbar.

Tatsächlich ergab die Untersuchung des Transkriptoms von *E. multilocularis* für *emipox* zwei Transkripte unterschiedlicher Länge. Sie unterschieden sich in einer N-terminalen Sequenz, welche von PFAM als Transmembranhelix identifiziert wurde und zudem Merkmale eines Signalpeptids bzw. einer Signalankersequenz aufweist.

Was eine mögliche Bedeutung in der Entgiftung von ROS angeht, weist Dzik allgemein darauf hin, dass Enzyme, die ROS aus phagozytischen Wirtszellen abwehren sollen, entweder sezerniert oder an der Oberfläche des Parasiten exprimiert sein müssen (Dzik, 2006). Im Falle von *emipox* konnte gezeigt werden, dass die für ein mutmaßliches Signalpeptid codierende Sequenzen nur in einem Bruchteil der Transkripte vorliegen. Das weist darauf hin, dass der Hauptbestimmungsort des Enzyms wohl intrazellulär liegt. Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine genauere Betrachtung der Umgebung der beiden möglichen neuen Start-Codone: Nur die Umgebung des zweiten Start-Codons (5'-AAAATGAGTT-3') entspricht einer möglichen Kozack Consensus Sequenz, wie sie für Invertebraten beschrieben wurde (Hernández et al., 2019), und bietet sich daher als wahrscheinlicher Translationsbeginn an. Die Umgebung des ersten Start-Codons (5'-GCCGATGATTA-3') erfüllt diese Kriterien nicht.

Interessanterweise beträfe eine mögliche Sekretion vor allem das Larvenstadium des aktivierten Protoscolex, bei welchem zudem besonders viele Transkripte von *emipox* vorlagen (zur Diskussion dieser besonderen Situation siehe 4.2.2).

Die erzielten Ergebnisse stimmen mit den von Wang et al. mit bioinformatischen Methoden durchgeführten Sekretom-Analysen überein (Wang et al., 2018). Eine Sekretion von EmIPOX erscheint angesichts der gewonnenen Erkenntnisse unwahrscheinlich. Dies trifft umso mehr auf das mit der AE assoziierte Stadium des Metacestoden zu.

Leider ließ sich aus der erfolgten WMISH für die Metacestoden aus Kultur keine Lokalisierung der *emipox*-Transkripte ableiten. Eine Lokalisierung an der Wirt-Parasit-Grenzfläche könnte die Hypothese zur ROS-Abwehr unterstützen. Eine WMISH für *emipox* in der infizierten Leber oder eine Immunlokalisierung könnte hier Aufschluss geben. Dringend werden hier weitere Untersuchungen benötigt, da die Situation in der Leber am ehesten der (patho)physiologischen Situation bei Infektion entspricht. Das Kultursystem und eine große Zahl der wissenschaftlichen Untersuchungen baut auf Parasiten aus dem Bauchraum von *M. unguiculatus* auf. Sollte der große Unterschied in der Genexpression bestätigt werden und vielleicht auch auf andere Enzyme der antioxidativen Abwehr zutreffen, könnte das den möglichen Erkenntnisgewinn aus diesen Proben einschränken.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Isolate von *E. multilocularis* verwendet (vgl. 2.1.5), die bereits unterschiedlich lange in Kulturbedingungen gehalten worden waren. Für weitere Untersuchungen wäre darauf zu achten, sich auf einige wenige Isolate zu beschränken, um die Reliabilität der Ergebnisse zu erhöhen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit es in Verbindung mit dem bisherigen Forschungsstand nahelegen, dass EmIPOX eine Rolle in der antioxidativen Abwehr von ROS in *E. multilocularis* spielt. Weitere Untersuchungen sind aber nötig, um die Bedeutung von EmIPOX, besonders im Metacestoden, zu charakterisieren.

4.3 Beziehung zu Germinalzellen bestätigt Potential als pharmakologische Zielstruktur

Eine Zielsetzung dieser Arbeit ist es, das Potential von EmIPOX als pharmakologischer Zielstruktur zu erkunden. Verschiedene Kriterien für effiziente Antihelminthika wurden

in den letzten Jahren aufgestellt. Dazu zählten vor allem die Expression in Stammzellen, die die einzige teilungsfähige Zellpopulation in *E. multilocularis* darstellen: “Promising targets do not have to be specifically expressed in germinative cells, but they should also be expressed in these cells” (Brehm & Koziol, 2014). Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten WMISH deuten darauf hin, dass EmIPOX dieses Kriterium erfüllt. Auch in den Transkriptomdaten konnte einen Rückgang der *emipox*-Transkripte bei Stammzelldepletion sowohl durch Hydroxyurea wie durch Bi2536 gegenüber den Kontrollgruppen beobachtet werden (Brehm, mündliche Mitteilung). Erste im Labor durchgeführte siRNA-Versuche für *emipox* an Primärzellen blieben allerdings ohne eindeutiges Ergebnis. Sie sollten wiederholt und durch proteomische Analysen ergänzt werden.

Ein weiteres Kriterium betraf die Beteiligung möglicher Zielstrukturen in der Abwehr von ROS (Perbandt et al., 2014). Gängige Antihelminthika bei AE sind Albendazol und Mebendazol aus der Gruppe der Benzimidazole. Anhand der Reaktion der Genexpression in Hepatocyten konnte gezeigt werden, dass beide Substanzen zu oxidativem Distress führen, und es wurde vermutet, dass ihre antiparasitäre Wirkung unter anderem mit diesem Anstieg an ROS zusammenhängt (Locatelli et al., 2004). Eine Verbindung der vorhandenen Therapie mit Hemmstoffen antioxidativer Enzyme wie vermutlich EmIPOX könnte dazu beitragen, in Zukunft geringere Dosen einsetzen zu müssen und unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu verringern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen EmIPOX als potenzielle, pharmakologische Zielstruktur interessant erscheinen. Eine Suche nach Inhibitoren für DyP-Typ Peroxidasen sollte erfolgen.

5 Zusammenfassung

Die Alveoläre Echinokokkose (AE) ist eine tödliche Infektionserkrankung, die durch den parasitären Plattwurm *Echinococcus multilocularis* verursacht wird. Genomanalysen von *E. multilocularis* ergaben ein Gen, das laut Vorhersage für eine DyP-Typ Peroxidase codiert. Ziel dieser Arbeit ist die biologische Funktion des codierten Enzyms besser zu verstehen und Hinweise auf eine mögliche Rolle in der Abwehr von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu erlangen.

Das Gen wurde heterolog in *E. Coli* exprimiert und molekulare Charakteristika des Gens mit bioinformatischen und molekularbiologischen Methoden untersucht. Quantitative RT-PCR Untersuchungen gaben Aufschluss über das Transkriptprofil von *emipox* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *E. multilocularis*. Mittels Whole-Mount *In Situ*-Hybridisierung (WMISH) wurden die Transkripte zudem lokalisiert und ihre Beziehung zum Stammzellsystem von *E. multilocularis* näher untersucht.

Die Zugehörigkeit von EmIPOX zur Gruppe der DyP-Typ Peroxidasen wurde bestätigt. Homologe beim Menschen kommen nicht vor. Es konnte nachgewiesen werden, dass Transkripte von *emipox* auch, aber keinesfalls ausschließlich, in Stammzellen vorliegen. Überdurchschnittlich viele Transkripte liegen im aktivierten Protoscolex und im Metacestoden *ex vivo* aus einer infizierten Wirtsleber vor. Untersuchungen zur Enzymaktivität von EmIPOX zeigten neben einer Peroxidase- auch eine Katalaseaktivität.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Charakterisierung einer DyP-Typ Peroxidase bei Tieren. Sie legt nahe, dass EmIPOX eine Rolle in der Entgiftung von ROS in *E. multilocularis* spielt und stellt den Charakter von EmIPOX als potenzieller pharmakologischer Zielstruktur heraus.

6 Literaturverzeichnis

- Arnao, M. B., Acosta, M., del Río, J. A., & García-Cánovas, F. (1990). Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1038*(1), 85–89.
- Aviello, G., & Knaus, U. G. (2018). NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunology*, *11*(4), 1011–1023.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, *53*(2–3), 253–263.
- Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W., & Zurbriggen, M. D. (2015). AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PloS One*, *10*(9), e0137652.
- Binesse, J., Lindgren, H., Lindgren, L., Conlan, W., & Sjöstedt, A. (2015). Roles of reactive oxygen species-degrading enzymes of *Francisella tularensis* SCHU S4. *Infection and Immunity*, *83*(6), 2255–2263.
- Bonilla, M., Denicola, A., Marino, S. M., Gladyshev, V. N., & Salinas, G. (2011). Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminth parasites: Alternative pathways for glutathione reduction and deglutathionylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(7), 4959–4967.
- Bonilla, M., Denicola, A., Novoselov, S. V., Turanov, A. A., Protasio, A., Izmendi, D., Gladyshev, V. N., & Salinas, G. (2008). Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(26), 17898–17907.
- Brehm, K., & Koziol, U. (2017). *Echinococcus*-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Advances in Parasitology*, *95*, 147–212.
- Brehm, K. (1990). *Molekulargenetische Analyse einer Katalasedeterminante aus Listeria seeligeri*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Würzburg.
- Brehm, K. (1995). *Molekulargenetische, biochemische und zellbiologische Untersuchungen zu Sauerstoffstreß-Abwehr, Signaltransduktion und intrazellulärer Bewegungsweise bei Listeria monocytogenes*. Promotion, Fakultät für Biologie, Universität Würzburg.

- Brehm, K., & Koziol, U. (2014). On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development. *Parasite*, *21*, 72.
- Brehm, K., Kronthaler, K., Jura, H., & Frosch, M. (2000). Cloning and characterization of b-tubulin genes from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *107*(2), 297-302.
- Brehm, K., & Spiliotis, M. (2008). Recent advances in the in vitro cultivation and genetic manipulation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and germinal cells. *Experimental Parasitology*, *119*(4), 506–515.
- Bresson-Hadni, S., Delabrousse, E., Blagosklonov, O., Bartholomot, B., Koch, S., Miguet, J.-P., Manton, G. A., & Vuitton, D. A. (2006). Imaging aspects and non-surgical interventional treatment in human alveolar echinococcosis. *Parasitology International*, *55 Suppl*, S267-272.
- Brunetti, E., Kern, P., & Vuitton, D. A. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*, *114*(1), 1–16.
- Cai, D., Li, Y., Jiang, Y., Wang, H., Wang, X., & Song, B. (2019). The role of contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of hepatic alveolar echinococcosis. *Medicine*, *98*(5), e14325.
- Callahan, H. L., Crouch, R. K., & James, E. R. (1988). Helminth anti-oxidant enzymes: A protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today (Personal Ed.)*, *4*(8), 218–225.
- Cancela, M., Paes, J. A., Moura, H., Barr, J. R., Zaha, A., & Ferreira, H. B. (2019). Unraveling oxidative stress response in the cestode parasite *Echinococcus granulosus*. *Scientific Reports*, *9*(1), 15876.
- Carmena, D., Benito, A., & Eraso, E. (2007). The immunodiagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *13*(5), 460–475.
- Cheng, Z., Liu, F., Zhu, S., Tian, H., Wang, L., & Wang, Y. (2015a). A rapid and convenient method for fluorescence analysis of in vitro cultivated metacestode vesicles from *Echinococcus multilocularis*. *PloS One*, *10*(2), e0118215.

- Cheng, Z., Zhu, S., Wang, L., Liu, F., Tian, H., Pengsakul, T., & Wang, Y. (2015b). Identification and characterisation of Emp53, the homologue of human tumor suppressor p53, from *Echinococcus multilocularis*: Its role in apoptosis and the oxidative stress response. *International Journal for Parasitology*, *45*(8), 517–526.
- Colpa, D. I., Fraaije, M. W., & van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: A promising and versatile class of enzymes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *41*(1), 1–7.
- Cortés, A., Peachey, L., Scotti, R., Jenkins, T. P., & Cantacessi, C. (2019). Helminth-microbiota cross-talk—A journey through the vertebrate digestive system. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *233*, 111222.
- Craig, P. S., & Echinococcosis Working Group in China. (2006). Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China. *Parasitology International*, *55* Suppl, S221-225.
- Dailey, H. A., Septer, A. N., Daugherty, L., Thames, D., Gerdes, S., Stabb, E. V., Dunn, A. K., Dailey, T. A., & Phillips, J. D. (2011). The *Escherichia coli* Protein YfeX Functions as a Porphyrinogen Oxidase, Not a Heme Dechelataase. *mBio*, *2*(6), e00248-11.
- Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S., & Romig, T. (2004). Wilderness in the city: The urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends in Parasitology*, *20*(2), 77–84.
- Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J. O., & Ferreira, F. (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: Structure. *Trends in Parasitology*, *27*(5), 204–213.
- Díaz, Á., Fernández, C., Pittini, Á., Seoane, P. I., Allen, J. E., & Casaravilla, C. (2015). The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution. *Experimental Parasitology*, *158*, 23–30.
- Dzik, J. M. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*, *53*(1), 33–64.
- Eckert, J., & Deplazes, P. (2004). Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(1), 107–135.

- Egger, B., Lapraz, F., Tomiczek, B., Müller, S., Dessimoz, C., Girstmair, J., Škunca, N., Rawlinson, K. A., Cameron, C. B., Beli, E., Todaro, M. A., Gammoudi, M., Noreña, C., & Telford, M. J. (2015). A Transcriptomic-Phylogenomic Analysis of the Evolutionary Relationships of Flatworms. *Current Biology*, *25*(10), 1347–1353.
- Ehlers, U. (1986). Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia*, *132*(1), 1–12.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D427–D432.
- Fahimi, H. D., & Herzog, V. (1973). A colorimetric method for measurement of the (peroxidase-mediated) oxidation of 3,3'-diaminobenzidine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *21*(5), 499–502.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *39*(4), 783–791.
- Förster, S., Koziol, U., Schäfer, T., Duvoisin, R., Cailliau, K., Vanderstraete, M., Dissous, C., & Brehm, K. (2019). The role of fibroblast growth factor signalling in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(3), e0006959.
- Goblirsch, B., Kurker, R. C., Streit, B. R., Wilmot, C. M., & DuBois, J. L. (2011). Chlorite dismutases, DyPs, and EfeB: 3 microbial heme enzyme families comprise the CDE structural superfamily. *Journal of Molecular Biology*, *408*(3), 379–398.
- Gretes, M. C., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2012). Peroxiredoxins in parasites. *Antioxidants & Redox Signaling*, *17*(4), 608–633.
- Guevara-Flores, A., Martínez-González, J., Rendón, J., & del Arenal, I. (2017). The Architecture of Thiol Antioxidant Systems among Invertebrate Parasites. *Molecules*, *22*(2), 259.
- Habib, M. H., Rozeboom, H. J., & Fraaije, M. W. (2019). Characterization of a New DyP-Peroxidase from the Alkaliphilic Cellulomonad, *Cellulomonas bogoriensis*. *Molecules*, *24*(7), 1208.
- Hemer, S., Konrad, C., Spiliotis, M., Koziol, U., Schaack, D., Förster, S., Gelmedin, V.,

- Stadelmann, B., Dandekar, T., Hemphill, A., & Brehm, K. (2014). Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biology*, *12*(1), 5.
- Hemphill, A., & Gottstein, B. (1995). Immunology and morphology studies on the proliferation of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology Research*, *81*(7), 605–614.
- Hernández, G., Osnaya, V. G., & Pérez-Martínez, X. (2019). Conservation and Variability of the AUG Initiation Codon Context in Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, *44*(12), 1009–1021.
- Herz, M. (2019). *Genome wide expression profiling of Echinococcus multilocularis*. Promotionsarbeit, Fakultät für Medizin, Universität Würzburg.
- Herz, M. & Brehm, K. *Manuskript in Vorbereitung*.
- Herzog, V., & Fahimi, H. D. (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*, *55*(2), 554–562.
- Howe, K. L., Bolt, B. J., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., Done, J., Down, T., Gao, S., Grove, C., Harris, T. W., Kishore, R., Lee, R., Lomax, J., Li, Y., Muller, H.-M., Nakamura, C., Nuin, P., Paulini, M., Sternberg, P. W. (2016). WormBase 2016: Expanding to enable helminth genomic research. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D774–D780.
- Huang, F., Dang, Z., Suzuki, Y., Horiuchi, T., Yagi, K., Kouguchi, H., Irie, T., Kim, K., & Oku, Y. (2016). Analysis on Gene Expression Profile in Oncospheres and Early Stage Metacestodes from *Echinococcus multilocularis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(4), e0004634.
- Hughes, A. L., & Friedman, R. (2011). A survey of schistosome protein domain types: Insights into unique biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *177*(2), 100–105.
- Jensen, R. A. (2001). Orthologs and paralogs—We need to get it right. *Genome Biology*, *2*(8), interactions1002.
- Jura, H., Bader, A., Hartmann, M., Maschek, H., & Frosch, M. (1996). Hepatic tissue culture model for study of host-parasite interactions in alveolar echinococcosis. *Infection and Immunity*, *64*(9), 3484–3490.

- Kaur, A., Van, P. T., Busch, C. R., Robinson, C. K., Pan, M., Pang, W. L., Reiss, D. J., DiRuggiero, J., & Baliga, N. S. (2010). Coordination of frontline defense mechanisms under severe oxidative stress. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 393.
- Kern, Peter. (2010). Clinical features and treatment of alveolar echinococcosis: *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(5), 505–512.
- Kern, Petra, Bardonnat, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R. W., Vuitton, D. A., Kern, P., & European Echinococcosis Registry. (2003). European echinococcosis registry: Human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 343–349.
- Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1029–1035.
- Koziol, U. (2017). Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Experimental Parasitology*, 180, 84–100.
- Koziol, U., Rauschendorfer, T., Rodríguez, L. Z., Krohne, G., & Brehm, K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo*, 5(1), 10.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Leitschuh, N. (2014). *Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zum TGF- β /BMP-Signalweg in Echinococcus multilocularis*. Masterarbeit, Universität Würzburg.
- Létoffé, S., Heuck, G., Delepelaire, P., Lange, N., & Wandersman, C. (2009). Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11719–11724.
- Letunic, I., & Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D493–D496.
- Liccioli, S., Giraudoux, P., Deplazes, P., & Massolo, A. (2015). Wilderness in the „city“ revisited: Different urbes shape transmission of *Echinococcus multilocularis* by altering predator and prey communities. *Trends in Parasitology*, 31(7), 297–305.

- Liers, C., Pecyna, M. J., Kellner, H., Worrich, A., Zorn, H., Steffen, K. T., Hofrichter, M., & Ullrich, R. (2013). Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(13), 5839–5849.
- Liu, D., & Xu, Y. (2011). P53, oxidative stress, and aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(6), 1669–1678.
- Liu, X., Du, Q., Wang, Z., Zhu, D., Huang, Y., Li, N., Wei, T., Xu, S., & Gu, L. (2011). Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157: ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(17), 14922–14931.
- Locatelli, C., Pedrosa, R. C., De Bem, A. F., Creczynski-Pasa, T. B., Cordova, C. A. S., & Wilhelm-Filho, D. (2004). A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time-dependent oxidative stress. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, *9*(2), 89–95.
- Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, *2*, 535–562.
- Mathers, C. D., Ezzati, M., & Lopez, A. D. (2007). Measuring the burden of neglected tropical diseases: The global burden of disease framework. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *1*(2), e114.
- Mizukami, C., Spiliotis, M., Gottstein, B., Yagi, K., Katakura, K., & Oku, Y. (2010). Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitology International*, *59*(4), 647–652.
- Mkoji, G. M., Smith, J. M., & Prichard, R. K. (1988). Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: Evidence for their role in protection of the adult worms against oxidant killing. *International Journal for Parasitology*, *18*(5), 667–673.
- Nicholls, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2000). Enzymology and structure of catalases. In *Advances in Inorganic Chemistry* (Bd. 51, S. 51–106). Academic Press.
- Nikendei, C., Greinacher, A., Berkunova, A., Junghans, T., & Stojkovic, M. (2019). Psychological burden and resilience factors in patients with Alveolar Echinococcosis—A cross-sectional study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(1), e0007082.

- Njuma, O. J., Ndontsa, E. N., & Goodwin, D. C. (2014). Catalase in peroxidase clothing: Interdependent cooperation of two cofactors in the catalytic versatility of KatG. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *544*, 27–39.
- Otero, L., Bonilla, M., Protasio, A. V., Fernández, C., Gladyshev, V. N., & Salinas, G. (2010). Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths. *BMC Genomics*, *11*, 237.
- Parkinson, J., Wasmuth, J. D., Salinas, G., Bizarro, C. V., Sanford, C., Berriman, M., Ferreira, H. B., Zaha, A., Blaxter, M. L., Maizels, R. M., & Fernández, C. (2012). A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: Implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(11), e1897.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, *24*(5), 255–265.
- Perbandt, M., Ndjonka, D. & Liebau, E. (2014). Protective mechanisms of helminths against reactive oxygen species are highly promising drug targets. *Current Medicinal Chemistry*, *21*(15), 1794–1808.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 55–74.
- Ren, M., He, L., Huang, Y., Mao, Q., Li, S., Qu, H., Bian, M., Liang, P., Chen, X., Ling, J., Chen, T., Liang, C., Wang, X., Li, X., & Yu, X. (2014). Molecular characterization of *Clonorchis sinensis* secretory myoglobin: Delineating its role in anti-oxidative survival. *Parasites & Vectors*, *7*, 250.
- Rendón, J. L., del Arenal, I. P., Guevara-Flores, A., Uribe, A., Plancarte, A., & Mendoza-Hernández, G. (2004). Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular and Biochemical Parasitology*, *133*(1), 61–69.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A. M., Zehir, A., & Mesirov, J. P. (2017). Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Research*, *77*(21), e31–e34.
- Romig, T., Deplazes, P., Jenkins, D., Giraudoux, P., Massolo, A., Craig, P. S., Wassermann, M., Takahashi, K., & de la Rue, M. (2017). Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Advances in Parasitology*, *95*, 213–314.

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Salinas, G., Selkirk, M. E., Chalar, C., Maizels, R. M., & Fernández, C. (2004). Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends in Parasitology*, 20(7), 340–346.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. In *Oxidative stress*. Academic Press.
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613–619.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122–126.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715–748.
- Sies, H., & Jones, D. (2007). Oxidative stress. In *Encyclopedia of stress* (2. Aufl.). Elsevier.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Cirilli, R., & Carmena, D. (2018). Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), e0006422.
- Singh, R., & Eltis, L. D. (2015). The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 56–65.
- Spiliotis, M., Lechner, S., Tappe, D., Scheller, C., Krohne, G., & Brehm, K. (2008). Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), 1025–1039.
- Spiliotis, M., Mizukami, C., Oku, Y., Kiss, F., Brehm, K., & Gottstein, B. (2010). *Echinococcus multilocularis* primary cells: Improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 174(1), 83–87.
- Spiliotis, M., Tappe, D., Sesterhenn, L., & Brehm, K. (2004). Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions. *Parasitology Research*, 92(5), 430–432.

- Stojkovic, M., Mickan, C., Weber, T. F., & Junghanss, T. (2015). Pitfalls in diagnosis and treatment of alveolar echinococcosis: A sentinel case series. *BMJ Open Gastroenterology*, 2(1), e000036.
- Sturm, A., Schierhorn, A., Lindenstrauss, U., Lilie, H., & Brüser, T. (2006). YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of Tat-dependently translocated hemoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13972–13978.
- Sugawara, K., Igeta, E., Amano, Y., Hyuga, M., & Sugano, Y. (2019). Degradation of antifungal anthraquinone compounds is a probable physiological role of DyP secreted by *Bjerkandera adusta*. *AMB Express*, 9(1), 56.
- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., Tracey, A., Bobes, R. J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H. M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), 57–63.
- Thompson, R. C., & Eckert, J. (1983). Observations on *Echinococcus multilocularis* in the definitive host. *Zeitschrift Für Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 69(3), 335–345.
- Tomanek, L. (2015). Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1867–1879.
- Torgerson, P. R., Keller, K., Magnotta, M., & Ragland, N. (2010). The Global Burden of Alveolar Echinococcosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(6), e722.
- Tyler, S., & Tyler, M. S. (1997). Origin of the epidermis in parasitic platyhelminths. *International Journal for Parasitology*, 27(6), 715–738.
- UniProt Consortium (2019). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D506–D515.
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259.
- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2010). Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 74–81.
- Vuitton, D. A., Demonmerot, F., Knapp, J., Richou, C., Grenouillet, F., Chauchet, A., Vuitton, L., Bresson-Hadni, S., & Millon, L. (2015). Clinical epidemiology of human AE in Europe. *Veterinary Parasitology*, 213(3–4), 110–120.

- Waeschenbach, A., Webster, B. L., & Littlewood, D. T. J. (2012). Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *63*(3), 834–847.
- Wang, H., Li, J., Zhang, C., Guo, B., Wei, Q., Li, L., Yang, N., Peter McManus, D., Gao, X., Zhang, W., & Wen, H. (2018). *Echinococcus granulosus* sensu stricto: Silencing of thioredoxin peroxidase impairs the differentiation of protoscoleces into metacestodes. *Parasite*, *25*, 57.
- Wayne, L. G., & Diaz, G. A. (1986). A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Analytical Biochemistry*, *157*(1), 89–92.
- Welinder, K. G., Mauro, J. M., & Nørskov-Lauritsen, L. (1992). Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochemical Society Transactions*, *20*(2), 337–340.
- Williams, D. L., Bonilla, M., Gladyshev, V. N., & Salinas, G. (2013). Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent Redox Networks in Platyhelminth Parasites. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(7), 735–745.
- Woodbury, W., Spencer, A. K., & Stahman, M. A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, *44*(1), 301–305.
- Yang, Y. R., Gray, D. J., Ellis, M. K., Yang, S. K., Craig, P. S., & McManus, D. P. (2009). Human cases of simultaneous echinococcosis and tuberculosis—Significance and extent in China. *Parasites & Vectors*, *2*(1), 53.
- Yoshida, T., & Sugano, Y. (2015). A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 49–55.
- Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., Pirker, K. F., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2015). Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *574*, 108–119.
- Zhang, C., Xin, Y., Wang, Y., Guo, T., Lu, S., & Kong, J. (2015). Identification of a Novel Dye-Decolorizing Peroxidase, EfeB, Translocated by a Twin-Arginine Translocation System in *Streptococcus thermophilus* CGMCC 7.179. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6108–6119.

- Zhang, H.-C., Ma, K.-X., Yang, Y.-J., Shi, C.-Y., Chen, G.-W., & Liu, D.-Z. (2018). Molecular cloning, characterization, expression and enzyme activity of catalase from planarian *Dugesia japonica* in response to environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *165*, 88–95.

Appendix

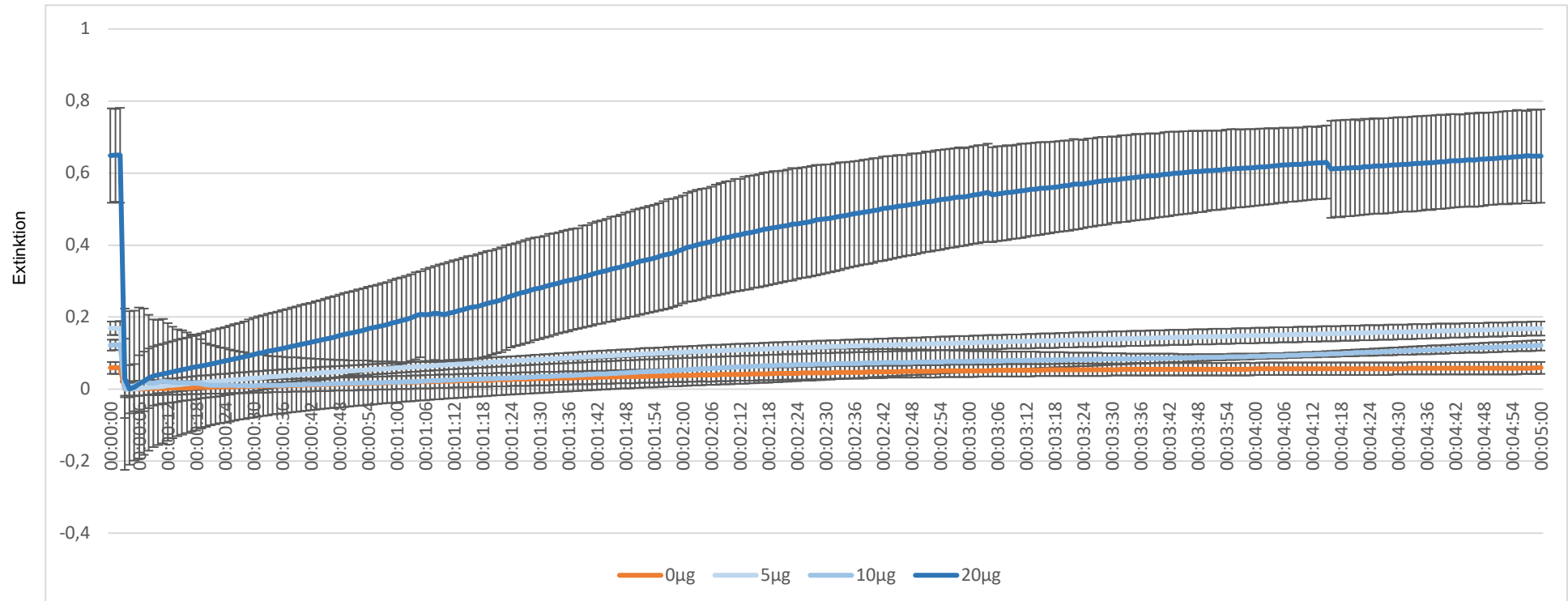


Abbildung 29: Zunahme der Extinktion bei der Oxidation von DAB mit unterschiedlichen Mengen von EmIPOX.

Ergänzung zu Abbildung 24. Die schwarzen Balken entsprechen den Standardabweichungen der errechneten Mittelwerte aus den Triplets. Je 30 µl des DAB-Substratpuffers (vgl. 2.7.2) und jeweils 0/5/10/20/30 µg an aufgereinigtem Enzym wurden in einen Well einer 96-Well-Platte gegeben. Durch die Zugabe von 20 µl einer 30%-H₂O₂-Lösung wurde die Reaktion gestartet. Die Extinktion wurde im Spektrophotometer über die Dauer von 5 Minuten im Abstand von 1 sec bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen. Der Versuch wurde in Triplets durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde in dieser Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, sie kann jedoch in Abbildung 29 nachvollzogen werden. Ursächlich für die Streuung um den Mittelwert ist wohl vor allem die starke Gasbildung bei der Reaktion. Am Verlauf der Kurven ist zu erkennen, dass in Abhängigkeit von der Enzymmenge unterschiedliche Mengen Substrat umgesetzt wurden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Enzymmengen wurden für alle Reaktionen ein gemeinsamer Nullpunkt der Extinktion angenommen. Das Diagramm gibt somit keine Informationen über den absoluten Wert der Extinktion, wohl aber zum Verhältnis der Extinktionsänderung bei unterschiedlichen Enzymmengen.

I Abkürzungsverzeichnis

3-APA.....	<i>3-Aminophthalat</i>
AE	<i>Alveoläre Echinokokkose</i>
BlastP.....	<i>Blast Local Alignment Search Tool für Proteine</i>
BMP.....	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
cDNA.....	<i>complementary DNA</i>
CE	<i>Cystische Echinokokkose</i>
Cld	<i>Chlorit-Dismutase</i>
DAB.....	<i>3,3'-Diaminobenzidin</i>
DAPI.....	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC.....	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DIG	<i>Digoxigenin</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DyP	<i>Dye-decolorizing Peroxidase</i>
EdU.....	<i>5-Ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
FGF.....	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Gpx	<i>Glutathion-Peroxidase</i>
Grx.....	<i>Glutaredoxin</i>
GR	<i>Glutathion-Reduktase</i>
GSH.....	<i>Glutathion</i>

I Abkürzungsverzeichnis

GSSG	<i>Glutathion in oxidiertes Form</i>
HGT	<i>horizontaler Gentransfer</i>
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MAB	<i>Maleinsäure Puffer</i>
PAA	<i>Polyacrylamid</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
Prxs	<i>Peroxiredoxine</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Realtime-PCR</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Soc	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SOD	<i>Superoxid-Dismutase</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
TAE	<i>TRIS-Acetat-EDTA</i>
Tat	<i>Twin-Arginin Translocation</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TEA	<i>Triethanolamin</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGR	<i>Thioredoxin-Glutathion-Reduktase</i>

I Abkürzungsverzeichnis

TRIS.....	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
TR	<i>Thioredoxin-Reduktase</i>
Trx	<i>Thioredoxin</i>
WBPS	<i>WormBase ParaSite</i>
WMISH	<i>Whole-Mount In Situ Hybridisierung</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gemeldete Fälle von alveolärer und cystischer Echinokokkose in Deutschland (2001-2019).	2
Abbildung 2: Lebens- und Infektionszyklus von <i>E. multilocularis</i>	5
Abbildung 3: Überblick zur phylogenetischen Position der Bandwürmer (Cestoda)	10
Abbildung 4: Überblick über die Entstehung und Abwehr von oxidativem Stress.....	12
Abbildung 5: Phylogenetik der Cld-Superfamilie.	16
Abbildung 6: Genkarte des Vektors pJET 1.2/blunt (ThermoFisher).	28
Abbildung 7: Standardkurven aus den Primer-Effizienzläufen in StepOne™/StepOne Plus™ 2.3.	31
Abbildung 8: Modifizierter pET151D-TOPO-Vektor zu Genexpression.	42
Abbildung 9: Genstruktur von EmuJ_001133900 in der Vorhersage auf WBPS.	54
Abbildung 10: Abgleich der Genvorhersage von WBPS mit den Transkriptomdaten im IG-Viewer.....	56
Abbildung 11: Vergleich der Sashimi-Plots aus verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>E. multilocularis</i> im Ig-Viewer.....	57
Abbildung 12: <i>emipox</i> -Bande im Agarose-Gel.	58
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Proteinstruktur im SMART-Tool.	60
Abbildung 14: Alignment der Primärstruktur des von <i>emipox</i> codierten Proteins mit den Primärstrukturen bakterieller und fungaler DyP-Peroxidasen unterschiedlicher Klassen mit Hilfe des T-Coffee Multiple Alignment Tool.	61
Abbildung 15: Alignment der Signalsequenzen von YcdB-Homologen und dem als Signalsequenz prognostizierten Bereichs des von <i>emipox</i> codierten Proteins mit Hilfe des T-Coffee Multiple Alignment Tool.	62

Abbildung 16: Bestätigung der heterologen Expression von EmIPOX mittels SDS-PAGE (links) und Western Blot (rechts).	63
Abbildung 17: Phylogenetischer Stammbaum ausgehend von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz von EmIPOX innerhalb des Stammes der Plathelminthes.	66
Abbildung 18: Quantifizierung der Transkripte von <i>emipox</i> mittels quantitativer RT-PCR bei aktivierten und nicht aktivierten <i>Protoscolices</i>	68
Abbildung 19: Quantifizierung der Transkripte von <i>emipox</i> in aerob und anaerob kultivierten Metacestodenesikeln.	69
Abbildung 20: Quantifizierung der Transkripte von <i>emipox</i> in aerob/anaerob kultivierten Metacestoden und Metacestoden aus dem Bauchraum von <i>M. unguiculatus</i> entnommenem Parasitenmaterial (MC Gesamtlarve).	70
Abbildung 21: Quantifizierung der Transkripte von <i>emipox</i> in aerob/anaerob kultivierten, aus dem Bauchraum von <i>M. unguiculatus</i> entnommenen (MC Gesamtlarve) und einer infizierten Leber von <i>M. unguiculatus</i> entnommenen Metacestoden (MCvivo).	71
Abbildung 22: WMISH zur Darstellung der Lokalisation der <i>emipox</i> -Transkripte in den verschiedenen Stadien von <i>E. multilocularis</i>	74
Abbildung 23: Makroskopischer Farbumschlag bei der Reaktion von EmIPOX mit DAB und H ₂ O ₂ (Pierce™ DAB Substrate Kit)	77
Abbildung 24: Zunahme der Extinktion bei der Oxidation von DAB mit unterschiedlichen Mengen von EmIPOX.	79
Abbildung 25: Maximale Veränderung der Extinktion bei der Oxidation von DAB durch EmIPOX bei unterschiedlichen pH-Werten.	80
Abbildung 26: Oxidation von Luminol durch EmIPOX im zeitlichen Verlauf.	81

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27: Nachweis der Katalase-Funktion von EmIPOX im Katalase-Aktivitätsgel.	83
Abbildung 28: Vergleich der Katalase-Aktivität verschiedener Larvenstadien im Katalase-Aktivitätsgel.	85
Abbildung 29: Zunahme der Extinktion bei der Oxidation von DAB mit unterschiedlichen Mengen von EmIPOX.	113

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Software und Online-Tools	20
Tabelle 2: Verwendete Geräte	21
Tabelle 3: Verwendete Kits	22
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 5: Verwendete Vektoren und Bakterien	23
Tabelle 6: Verwendete Isolate von <i>E. multilocularis</i>	24
Tabelle 7: Verwendete Primer	24
Tabelle 8: Ansatz für PCR mit KOD Polymerase	26
Tabelle 9: Ansatz für die Ligation in pJET1.2/blunt	27
Tabelle 10: Ansatz für Klontest-PCR mit Taq-Polymerase	29
Tabelle 11: Ansatz für RT-PCR	31
Tabelle 12: Ansatz zur <i>In vitro</i> Transkription	33
Tabelle 13: Reagenzien zur Herstellung und Entwicklung des Dot blots	34
Tabelle 14: Herstellung der Reagenzien für die WMISH	38
Tabelle 15: Ansatz der Click-iT Reaktion.....	40
Tabelle 16: Induktionsmedia für Genexpression in BL21 (DE3).....	43
Tabelle 17: Zur Proteinaufreinigung verwendete Reagenzien	44
Tabelle 18: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels	45
Tabelle 19: Für die Herstellung der Polyacrylamidgele verwendete Reagenzien.....	46
Tabelle 20: Für den Western Blot verwendete Reagenzien und Antikörper.....	47
Tabelle 21: Zusammensetzung des Substratpuffers	49
Tabelle 22: Zusammensetzung des nativen Polyacrylamidgels (Mengenangaben für zwei Gele)	51

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 23: Zusammensetzung der nicht denaturierenden Lauf- und Probenpuffer	51
Tabelle 24: Gegenüberstellung der Daten von WBPS und der eigenen Untersuchung.	59
Tabelle 25: Merkmale und Eigenschaften von EmIPOX	64
Tabelle 26: Anzahl der Signale in den jeweiligen WMISH-Aufnahmen	72

IV Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich all denen danken, ohne die sie nicht entstanden wäre:

Klaus Brehm für das in mich gesetzte Vertrauen und die lehrreichen und unterhaltsamen Gespräche in seinem gemütlichen Büro unterm Dach.

Dirk Radloff, Akito Koike, Ruth Herrmann und Marc Käthner für das Mit- und Nebeneinander im Labor, die kleinen Tipps und Tricks und die Einblicke in Themen und Tätigkeiten, die über die eigenen weit hinausgingen.

Den Auszubildenden Isabell, Antonio und Dominique für den frischen Wind, den sie ins Labor brachten, ihre Sichtweisen auf Wissenschaft und Welt, die den Alltag immer bereicherten.

Mein besonderer Dank gilt Monika Bergmann und Markus Spiliotis, die die Zeit im Labor maßgeblich ausgemacht haben. Natürlich für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Arbeit und ihre Geduld mit dem Lehrling. Was sie mir beibrachten, ging aber weit über „Methoden“ hinaus. Die soziale Sensibilität, mit der sie ihre Tätigkeiten ausfüllten und ausfüllen, hat mich beeindruckt. Wie die beiden in die Lebenswelten derjenigen Menschen hineinspüren, mit denen man sonst „nur“ sein Arbeitsleben verbringt, zeugt von einer bemerkenswerten Weitsicht. Ich wünsche ihnen von Herzen alles Gute!

Abschließend bedanke ich mich bei allen bisher noch nicht genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg für ihre Unterstützung und Gastfreundschaft.