



Molekulare Charakterisierung eines Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie des
Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*

Molecular characterization of a TNF-receptor-superfamily member of *Echinococcus*
multilocularis

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

Vorgelegt von

Katharina Sabine Pätzel, geb. Ditter

aus

Heidelberg

Würzburg 2022



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Professor Dr. Andreas Rosenwald

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brehm

2. Betreuer: Prof. Dr. Nicolai Siegel

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

4. Betreuer: PD Dr. med. Monika Rau

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Molecular characterization of a TNF-receptor-superfamily member of *Echinococcus multilocularis*“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Molekulare Charakterisierung eines Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurms *Echinococcus multilocularis*“ eigenständig, das heißt insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>5</u>
<u>3</u>	<u>Summary</u>	<u>7</u>
<u>4</u>	<u>Einleitung</u>	<u>9</u>
4.1	Echinococcus multilocularis	10
4.1.1	Epidemiologie und Phylogenie	10
4.1.2	Lebenszyklus und allgemeine Biologie	12
4.1.3	Die alveoläre Echinokokkose.....	14
4.2	Konservierte Signalwege in <i>E. multilocularis</i>	20
4.3	TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie	22
4.3.1	Tumornekrosefaktor alpha	23
4.3.2	Die Rolle von TNF- α bei einer Immunreaktion & bei der AE.....	27
4.3.3	Tumornekrosefaktor-Rezeptoren	30
4.3.4	TNF- α -Signalwege.....	34
4.3.5	p75 ^{NTR} und seine Signalwege.....	38
<u>5</u>	<u>Material & Methoden</u>	<u>40</u>
5.1	Material.....	41
5.1.1	Geräte.....	41
5.1.2	Verbrauchsmaterial	43
5.1.3	Chemikalien, Enzyme und Lösungen	44
5.1.4	Kits.....	47
5.1.5	Verwendete Oligonukleotide	48
5.1.6	Verwendete Antikörper.....	49
5.2	Methoden	50
5.2.1	Arbeiten mit RNA.....	50
5.2.1.1	Isolierung von RNA.....	50

5.2.1.2	Gel-Elektrophorese der RNA.....	51
5.2.1.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	51
5.2.1.4	Herstellen von cDNA.....	51
5.2.2	Arbeiten mit DNA.....	52
5.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	52
5.2.2.2	Quantitative Echtzeit-PCR.....	54
5.2.2.3	Klontest-PCR aus <i>Escherichia coli</i>	55
5.2.2.4	Gel-Elektrophorese von DNA.....	55
5.2.2.5	DNA-Aufreinigung aus Elektrophorese-Gelen.....	56
5.2.2.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	56
5.2.2.7	DNA-Sequenzierung.....	56
5.2.2.8	Klonierung mit Hot Fusion	57
5.2.2.9	Übernachtskultur & Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	58
5.2.3	Arbeiten mit Proteinen	59
5.2.3.1	Gel-Elektrophorese mit Proteinen.....	59
5.2.3.2	Coomassie-Färbung eines Protein-Gels.....	60
5.2.3.3	Proteinnachweis mit Western Blot.....	61
5.2.3.4	Quantitativer Western Blot	62
5.2.3.5	Proteinaufreinigung	63
5.2.3.6	Herstellung von Antikörpern gegen rekombinanten TNF-Rezeptor.....	64
5.2.3.7	Antikörperaufreinigung	65
5.2.3.8	Affinitätschromatographie	65
5.2.3.9	Proteinfällung nach Wessel-Flügge	67
5.2.3.10	Dialyse	67
5.2.3.11	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	68
5.2.3.12	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	69
5.2.4	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	70
5.2.4.1	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme.....	70
5.2.4.2	Verwendete Medien.....	70
5.2.4.3	Transformation.....	71
5.2.4.4	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	71

5.2.5	Arbeiten mit <i>E. multilocularis</i>	72
5.2.5.1	Verwendete Medien.....	72
5.2.5.2	Verwendete Isolate.....	73
5.2.5.3	<i>In vivo</i> Kultursystem & Isolierung von Metazestoden-Material.....	73
5.2.5.4	<i>In vitro</i> Kultivierung von <i>E. multilocularis</i>	74
5.2.5.5	Axenische Kultursystem.....	74
5.2.5.6	Behandlungsversuche mit Metazestoden-Material.....	75
5.2.5.7	Lokalisation von EmTNFR in MZ.....	76
5.2.5.8	Isolierung & Kultivierung von <i>E. multilocularis</i> Primärzellen.....	77
5.2.5.9	Behandlungsversuche mit Primärzellen.....	77
5.2.5.10	siRNA Knockdown von <i>emtnfr</i>	78
5.2.5.10.1	siRNA Protokoll.....	79
5.2.5.11	Isolierung des löslichen EmTNFR aus Zellkulturüberständen.....	84
5.2.5.12	EdU Labeling von MZ und EdU-Detektion.....	85
5.2.6	Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung (WMISH).....	85
5.2.7	Bioinformatische Analysen.....	86
5.2.7.1	Phylogenie des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von <i>E. multilocularis</i>	86
5.2.7.2	<i>In silico</i> Analyse der TNF- α Signalwegmitglieder bei <i>E. multilocularis</i> ...	87
5.2.7.3	<i>In silico</i> Analyse der p75 ^{NTR} -Signalwegmitglieder bei <i>E. multilocularis</i> ...	87
6	<u>Ergebnisse</u>	88
6.1	Identifikation der <i>emtnfr</i> Gensequenz.....	89
6.2	Charakterisierung der Proteinstruktur von EmTNFR.....	95
6.3	EmTNFR Sequenzhomologien und Erstellen eines phylogenetischen Baumes.....	98
6.4	Klonierung & Sequenzierung von <i>emtnfr</i>	102
6.5	Expressionsunterschiede von <i>emtnfr</i> in unterschiedlichen <i>E. multilocularis</i> Stadien...	105
6.5.1	Quantitativer Western Blot.....	108
6.6	<i>In silico</i> Analyse & Identifikation von möglichen Mitgliedern des TNF- α Signalweges bei <i>E. multilocularis</i>	112
6.7	<i>In vitro</i> Zellkulturversuche an Primärzellen.....	122
6.7.1	TNF- α stimuliert die Bildung von MZ aus Primärzellen.....	122

6.7.2	<i>emtnfr</i> -Expression während einer TNF- α Behandlung von PZ.....	126
6.7.3	Primärzellversuch II.....	127
6.8	<i>In vitro</i> RNA-Interferenzversuche an Primärzellen.....	132
6.8.1	Expression von <i>emtnfr</i> nach RNA-Interferenz.....	133
6.8.2	<i>emtnfr</i> Knockdown beeinflusst die Kavitäten-Entwicklung in der PZ-Kultur...	136
6.8.3	TNF- α Behandlung fördert Vesikelbildung trotz <i>emtnfr</i> -Knockdown.....	140
6.9	Herstellung von Antikörpern gegen EmTNFR.....	142
6.9.1	Amplifikation des extrazellulären Bereiches von EmTNFR & Transformation in <i>Escherichia coli</i>	143
6.10	Untersuchung eines löslichen TNF-Rezeptors bei <i>E. multilocularis</i>	152
6.10.1	Quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Anzahl der Transkripte des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei <i>E. multilocularis</i>	153
6.10.2	Untersuchung eines löslichen TNF-Rezeptors im Zellkulturmedium.....	156
6.11	Whole-mount in situ Hybridisierung (WMISH).....	162
7	<u>Diskussion</u>	<u>165</u>
7.1	<i>E. multilocularis</i> besitzt 3 EmTNFR-Varianten.....	166
7.2	Ist EmTNFR ein p75 ^{NTR} -Homolog?.....	169
7.3	Welche molare Masse besitzt EmTNFR?.....	175
7.4	Gibt es lösliche TNF-Rezeptoren beim Fuchsbandwurm und anderen Helminthen?...	176
7.5	TNF- α und seine Wirkung auf den Fuchsbandwurm.....	179
7.6	TNF-Signalweg bei <i>E. multilocularis</i>	185
7.7	Lokalisation und Spezifität von EmTNFR.....	187
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>190</u>
9	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>206</u>
10	<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>209</u>
11	<u>Anhang</u>	<u>210</u>
11.1	Mitglieder der TNF-Superfamilie.....	211
11.2	Mitglieder der TNFR-Superfamilie.....	213
11.3	kodierende Sequenzen.....	215
11.3.1	<i>emtnfr</i>	215

11.3.2 <i>emtnfr-v2</i>	216
11.3.3 <i>emtnfr-v3</i>	217
11.4 Proteinsequenzen	219
11.4.1 EmTNFR.....	219
11.4.2 EmTNFR-V2.....	219
11.4.3 EmTNFR-V3.....	220
11.5 Proteinsequenzen für die phylogentische Analyse von EmTNFR.....	221

1 Abkürzungsverzeichnis

AE	Alveoläre Echinokokkose
APS	Ammoniumperoxodisulfat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Engl.: bovine serum albumin; dt.: Rinderserumalbumin
BC	Engl.: brood capsule; dt.: Brutkapsel
BMP-2	Engl.: bone morphogenetic protein 2, dt.: knochenmorphogenetisches Protein 2
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CEUS	Engl.: Contrast-enhanced ultrasound, dt.: Kontrastmittelsonographie
CRD	Engl.: cysteine rich domain, dt.: cysteinreiche Domäne
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DD	Engl.: death domain; dt.: Todesdomäne
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elp	H17g protein tegumental antigen
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>

EtOH	Ethanol
FCS	Engl.: fetal calf serum; dt.: fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FW	Engl.: forward
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGV	Integrative Genomics Viewer
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB Medium	Luria-Bertani Medium
LEW-Buffer	Engl.: Lysis-Equilibration-Wash Buffer
M	Milli
m	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Engl.: mitogen-activated-protein-kinase
MAPKK	Engl.: mitogen-activated-protein-kinase-kinase
MAPKKK	Engl.: mitogen-activated-protein-kinase-kinase-kinase
MeOH	Methanol
MG	Molekülgröße
μ	Mikro

MRT	Magnetresonanztomographie
mTNF- α	Membrangebundenes TNF- α
MZ	MZ
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGFR	Engl.: nerve-growth-factor-receptor; dt.: Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PBS	Engl.: Phosphate Buffer Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLAD	Engl.: pre-ligand assembly domain
PRR	Engl.: pathogen recognition receptor
POX	Engl.: horseradish peroxidase
PZ	Primärzellen
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RH ⁻	Rattenhepatozyten
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Engl.: Sodium dodecyl sulfate

SODD	Engl.: Silencer of death domain
sTNF- α	Lösliches TNF- α
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Engl.: Tris buffered saline with Tween20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THD	Engl.: TNF homology domain
TIM	TRAF interagierende Motive
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
US	Ultraschall (Sonographie)
V	Volt
WHO	Engl.: World Health Organization

2 Zusammenfassung

Die alveoläre Echinokokkose (AE), die durch den Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* verursacht wird, ist eine seltene jedoch schwere und oft tödlich verlaufende Erkrankung. Aufgrund der späten Diagnosestellung sind kurative Behandlungsmethoden häufig nicht durchführbar und als einzige Behandlungsmöglichkeit bleibt eine lebenslange und nebenwirkungsreiche Therapie mit Benzimidazolen. Verbesserte Therapieoptionen durch die Entwicklung neuer Medikamente sind dringend notwendig. Hierfür kann es hilfreich sein die Biologie des Fuchsbandwurmes und die Kommunikationswege zwischen Parasit und Wirt zu verstehen. Bereits in vorherigen Arbeiten als auch in dieser Arbeit erwiesen sich evolutionsgeschichtlich konservierte Signalwege als Kommunikationsweg zwischen dem Fuchsbandwurm und seinem Wirt von zentraler Rolle.

Die Entschlüsselung des *Echinococcus*-Genoms gab Hinweise darauf, dass ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie, jedoch kein endogener TNF- α -ähnlicher Ligand im Genom kodiert wird. Ein Mitglied der TNFR-Superfamilie des Fuchsbandwurmes (EmTNFR) wurde in dieser Arbeit als membranständiger Rezeptor mit einer intrazellulären Todesdomäne (DD) und hoher Ähnlichkeit zum humanen Typ 16 der TNF-Rezeptor-Superfamilie, auch $p75^{NTR}$ genannt, charakterisiert. Sowohl in bioinformatischen als auch in Sequenzanalysen wurden drei alternative Splicing-Formen von *emtnfr* (*emtnfr*, *emtnfr-v2* und *emtnfr-v3*) nachgewiesen. *emtnfr-v2* entsteht durch Alternatives Splicing und kodiert ein Protein, das keine intrazelluläre Todesdomäne besitzt. *emtnfr-v3* verwendet einen alternativen Transkriptionstart und wird von den letzten 3 Exons von *emtnfr* kodiert. *emtnfr-v3*, kodiert ein Protein ohne extrazelluläre Region, aber mit intrazellulärer Todesdomäne. Ein löslicher TNF-Rezeptor konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Aufgrund von phylogenetischen Analysen und der Rezeptor-Struktur ist zu vermuten, dass EmTNFR ein $p75^{NTR}$ Homolog ist und damit der ursprünglichen Form der TNF-Rezeptoren entspricht. Mitglieder eines intrazellulären TNF-Signalweges wurden in bioinformatischen Analysen beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* identifiziert.

Expressionsuntersuchungen zeigten sowohl in Transkriptomdaten als auch auf Proteinebene eine starke Expression von EmTNFR in Primärzellen und im Metazestoden (MZ), dem pathogenen Stadium für den Zwischenwirt. *Echinococcus*-Stammzellkulturen zeigten nach RNA-Interferenz-basiertem Knockdown des EmTNFR-kodierenden Gens deutliche Entwicklungsdefekte. Des Weiteren zeigten *Echinococcus*-Stammzellkulturen nach einer Behandlung mit TNF- α , einem potentiellen Liganden des TNF-Rezeptors und einem zentralen Zytokin in der Immunabwehr des Zwischenwirtes, Entwicklungsfortschritte, wie eine verbesserte Bildung von MZ aus Stammzellen. Zusätzlich wurde in whole-mount *in situ* Hybridisierungs-Versuchen eine ubiquitäre Expression von *emtnfr* in der Germinalschicht des MZ sowie eine Spezifität von *emtnfr* für den MZ, welcher ursächlich für die AE ist, nachgewiesen. Somit scheinen sowohl EmTNFR als auch TNF- α eine wichtige Funktion bei der Entwicklung und Etablierung des Fuchsbandwurmes während der frühen Phase der Infektion des Zwischenwirtes zu haben. TNF- α könnte ein weiterer Faktor für den ausgeprägten Organotropismus des Parasiten zur Leber sein, denn dort bestehen durch Kupfferzellen produzierte hohe lokale Konzentration von TNF- α .

Zusammenfassend deuten die hier erarbeiteten Daten darauf hin, dass EmTNFR über die Bindung von Wirts-TNF- α bei der frühen Entwicklung des *Echinococcus*-Metazestoden eine Rolle spielt.

3 Summary

Alveolar echinococcosis (AE), which is caused by the metacestode larval stage of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*, is a rare but severe, often fatal disease. Due to late diagnosis and advanced spread of the infection curative therapy is often not possible and the only treatment option is benzimidazole chemotherapy, which often must be taken lifelong and has adverse side effects. Improvement of therapeutic options is thus urgently needed. To this end, a closer understanding of parasite biology and communication mechanisms between parasite and host are helpful. In this work, focus was laid on the possibility of host-parasite cross-communication involving an evolutionarily conserved signalling pathway.

By mining the *Echinococcus* genome sequence, a gene encoding a member of the tumor-necrosis-factor-receptor family (TNF-R), was identified. In this work, EmTNFR, a member of the TNF-R superfamily, of the fox tapeworm was identified as a membrane-bound receptor with intracellular death domain and highest similarity to human TNFRSF 16, also called p75^{NTR}. In *in silico* analysis and cDNA sequencing, 3 alternative splice forms of *emtnfr* (*emtnfr-v1*, *-v2* and *-v3*) were found. *emtnfr-v2* is the result of alternative splicing and encodes a protein lacking the intracellular death domain. *emtnfr-v3* employs an alternative transcription start and is encoded by the last 3 exons of *emtnfr*. *emtnfr-v3* encodes a protein without extracellular domain, but containing an intracellular death domain. A soluble TNF-receptor could not be found in proteomic analysis. Based on phylogenetic analysis and receptor structure, EmTNFR is thought to be a homolog of p75^{NTR}, corresponding to the ancient form of TNF receptors. Members of an intracellular TNF signaling pathway were identified in bioinformatic analyses in the fox tapeworm *E. multilocularis*, indicating the presence of a full TNFR signalling pathway.

Expression studies showed in transcriptome data and at protein level a strong expression of EmTNFR in primary cells and in the metacestode (MZ), the pathogenic stage for the intermediate host. *Echinococcus* stem cell cultures showed marked developmental defects after RNAi based knockdown of the EmTNFR-encoding gene. Furthermore, *Echinococcus* stem cell culture displayed accelerated developmental progress such as enhanced formation of MZ from stem cells after treatment with TNF- α , a potential ligand

of the TNF receptor, and a central cytokine in the immune defense of the intermediate host. In addition, whole-mount *in situ* hybridization experiments demonstrated ubiquitous expression of *emtnfr* in the germinal layer of MZ and specificity of *emtnfr* for MZ, the causative agent of AE.

Thus, both EmTNFR and TNF- α appear to have an important function in development and establishment of the fox tapeworm during the early phase of infection of the intermediate host. TNF- α could be an additional factor for the pronounced organ tropism of the parasite to the liver, caused by a high local concentration of TNF- α produced by Kupffer cells.

In summary, the data generated in this work suggest that EmTNFR plays a role in the early development of *Echinococcus* metacestode via binding of host TNF- α .

4 **Einleitung**

4.1 Echinococcus multilocularis

4.1.1 Epidemiologie und Phylogenie

Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* ist ein in der nördlichen Hemisphäre weit verbreiteter Endoparasit und Auslöser der alveolären Echinokokkose (AE), einer seltenen, jedoch potenziell tödlichen Erkrankung. Aufgrund des Vorkommens seines Endwirtes, des Fuchses, ist *E. multilocularis* in gemäßigten bis kalten Klimazonen der nördlichen Hemisphäre mit endemischen Gebieten in Zentral- & Osteuropa, dem Nahen Osten, Russland, China und Nordjapan verbreitet (WHO/OIE 2001). Zu den klassischen Endemiegebieten in Europa zählen Süddeutschland, Ostfrankreich, Nordschweiz und Westösterreich, jedoch wurde in den letzten Jahrzehnten eine zunehmende Ausbreitung des Fuchsbandwurmes verzeichnet. Erstmals wurde von Fällen der AE in Tadschikistan, Pakistan, Süd-Korea, Belgien, den Niederlanden, Slowakei, Slowenien, Ungarn, Litauen, Lettland und Marokko berichtet (Kratzer 2019). In den Jahren 2001-2018 wurden in insgesamt 36 Ländern der Welt Fälle der AE registriert. In vier dieser Länder (Vereinigtes Königreich, Dänemark, Taiwan, Thailand) wird von nicht-autochthonen Fällen ausgegangen (Baumann *et al.* 2019).

Zur Gattung *Echinococcus* gehören neben *E. multilocularis* noch neun weitere Vertreter, die sich vor allem in ihren Zwischen- und Hauptwirten aber auch in Morphologie, Ökologie und molekularen Kriterien voneinander unterscheiden (Thompson 2020). Einige dieser *Echinococcus*-Arten sind für den Menschen infektiös und können das Krankheitsbild einer Echinokokkose verursachen, wobei drei klinische Formen der Echinokokkose unterschieden werden. Die AE, die durch *Echinococcus multilocularis* verursacht wird, die zystische Echinokokkose, die durch *Echinococcus granulosus sensu lato* ausgelöst wird, und die polyzystische Echinokokkose, deren Krankheitserreger *Echinococcus oligarthus* und *Echinococcus vogeli* sind (WHO/OIE 2001). *Echinococcus granulosus sensu lato* ist eine Gruppe aus 6 *Echinococcus*-Arten, die aufgrund ihrer phenotypischen und genotypischen Unterschiede als verschiedene Genotypen von *Echinococcus granulosus* beschrieben und in den letzten Jahren zu eigenständigen Arten ernannt worden sind. In diese Gruppe gehören *Echinococcus granulosus sensu stricto*, *Echinococcus ortleppi* (Thompson and McManus 2002), *Echinococcus canadensis*

(Nakao, McManus *et al.* 2007), *Echinococcus intermedius* (Saarma *et al.* 2009; Thompson 2008), *Echinococcus equinus* (Thompson and McManus 2002) und *Echinococcus felidis* (Hüttner *et al.* 2008), wobei die letzten beiden Arten nicht humanpathogen sind. Die zehnte Echinokokkenart ist *Echinococcus shiquicus*, welche vor allem auf dem tibetischen Hochplateau zu finden ist (Xiao *et al.* 2005).

Die Echinokokken gehören der Familie der Taeniidae, der Ordnung der Cyclophyllidea und der Unterklasse der Eucestoda (echte Bandwürmer) an (Thompson 2017). Die echten Bandwürmer wiederum bilden zusammen mit den monozoischen Bandwürmern die Klasse der Cestoda (Bandwürmer), deren wichtigsten humanpathogene Vertreter neben den Echinococcusarten *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Diphyllobotrium latum* und *Hymenolepis nana* sind. Die Cestoda (Bandwürmer) bilden zusammen mit den Trematoda (Saugwürmer), den Monogenea (Hakensaugwürmer) und den freilebenden Turbellaria (Spulwürmer) den Stamm der Plathelminthes (Plattwürmer) (Ehlers 1985; Littlewood *et al.* 1999). Wobei Cestoda, Trematoda und Monogenea eine monophyletische Gruppe von parasitär lebenden Plattwürmern bilden und die freilebenden Turbellaria eine paraphyletische Gruppe bilden (Littlewood 2008). Die Plathelminthes, als Vertreter der Platyzoa (Plattwurmartige), bilden zusammen mit den Trochozoa den Überstamm der Lophotrochozoa (Giribet 2008; Olson *et al.* 2012). Die Trochozoa können wiederum in verschiedene Stämme, unter anderem in Annelida (Ringelwürmer) und Mollusca (Weichtiere), unterschieden werden (reviewed in Bleidorn 2008; Henry 2014). Neben den Lophotrochozoa gibt es noch die Ecdysozoa (Häutungstiere), denen unter anderem die Arthropoda (Gliederfüßer) und die Nematoda (Schlauchwürmer) angehören (reviewed in Telford *et al.* 2008). Die wichtigsten Vertreter der Nematoda sind *Ascaris lumbricoides*, als humanpathogener Erreger, und *Caenorhabditis elegans*, als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie und der genetischen Forschung. Ein humanpathogener Erreger der Arthropoda ist *Sarcoptes scabiei*, der beim Menschen die Krätze auslöst. *Drosophila melanogaster*, ein weiterer Modellorganismus und einer der am besten untersuchten Organismen, zählt ebenfalls zu den Arthropoda (Telford *et al.* 2008). Sowohl die Lophotrochozoa als auch die Ecdysozoa (Häutungstiere) werden den Protostomia (Urmünder) zugeordnet (Giribet 2008). Die Protostomia (Urmünder) haben sich zusammen mit den Neumündern (Deuterostomia),

zu denen auch der Mensch gehört, vor ca. 600 Millionen Jahren aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt.

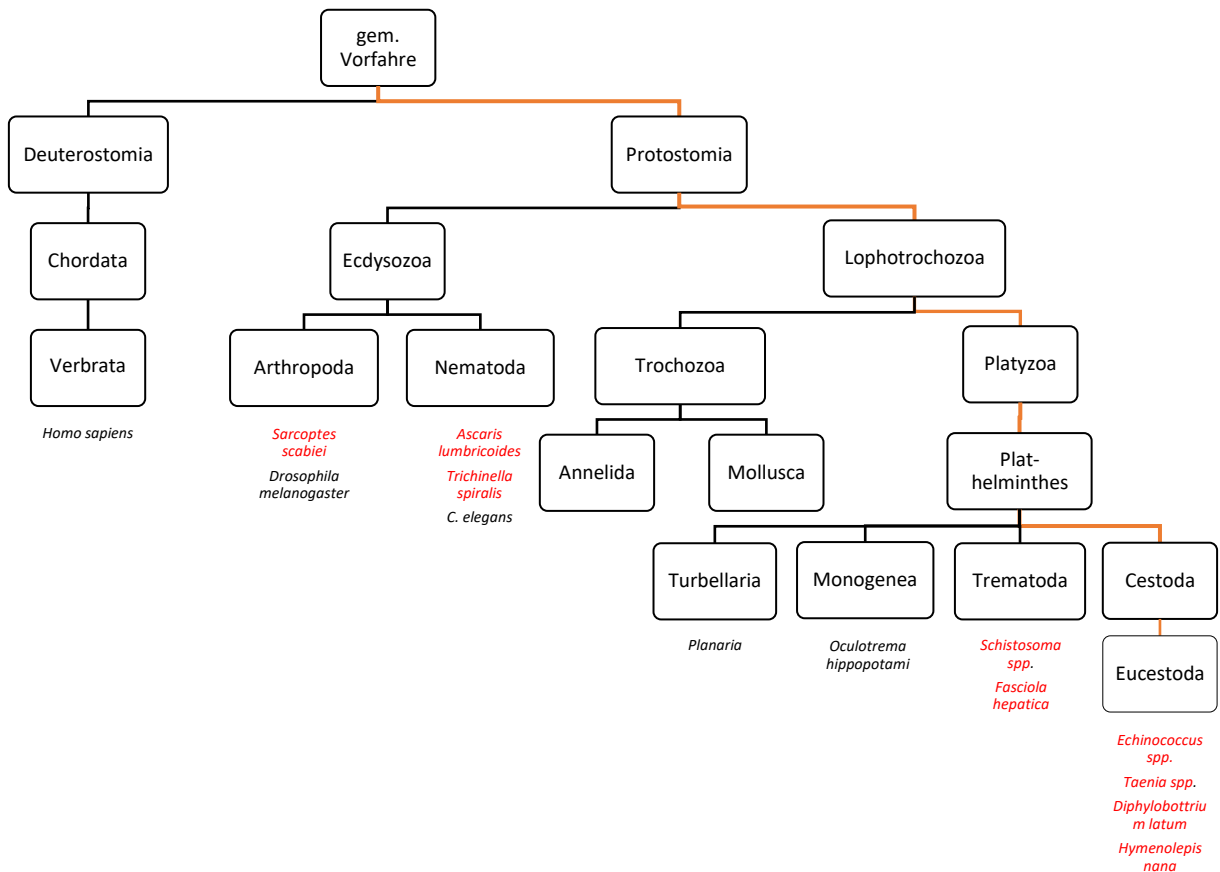


Abbildung 1: Phylogenetische Position der Gattung *Echinococcus*: Die orangefarbene Linie beschreibt die Phylogenese des Fuchsbandwurmes *E. multilocularis*. Einzelne Vertreter der Stämme, Unterstämme und Klassen sind unterhalb dieser aufgeführt. Humanpathogene Vertreter sind rot dargestellt.

4.1.2 Lebenszyklus und allgemeine Biologie

Der adulte Fuchsbandwurm ist ein Hermaphrodit, erreicht eine durchschnittliche Größe von 1,2 bis 4,5 mm und lebt im Dünndarmlumen seines Endwirtes, meistens dem Fuchs (Eckert and Deplazes 2004). Der Körper des adulten Fuchsbandwurmes kann in drei Teile gegliedert werden. Der Scolex (Kopfteil), die Proliferationszone und die Strobila (Gliederkette). Der Scolex besitzt 4 Saugnäpfe und 2 Hakenkränze, die es dem Fuchsbandwurm ermöglichen sich in der Darmwand zu verankern (Thompson 2017). Die Strobila setzt sich meist aus 2-6 abgeflachten und in der Proliferationszone gebildeten

Gliedern (Proglottiden) zusammen (Eckert and Deplazes 2004). Jede Proglottide, die sowohl männliche als auch weibliche Geschlechtsorgane besitzt, produziert in einem Uterus ca. 200 Eier, die hier heranreifen und nach vollständiger Reifung entweder einzeln oder nach Abstoßung der vollständigen Proglottide über den Kot des Wirtes ausgeschieden werden (Castro 1996; WHO/OIE 2001). Die Wurmeier enthalten das erste Larvenstadium (Onkosphäre) und können bei guten Bedingungen über mehrere Monate in der ungeschützten Umgebung überleben (Craig 2003). Nach akzidentieller oraler Aufnahme durch den Zwischenwirt, wie zum Beispiel kleine Nagetiere, werden die Eier während der Magen-Darm-Passage aktiviert, penetrieren das Darmepithel und gelangen mit dem Blutfluss direkt in die Leber (in 98% der Fälle) (Heath 1971; Thompson 1986). Dort entwickelt sich das zweite Larvenstadium des Fuchsbandwurmes, der Metazestode. Diese sind flüssigkeitsgefüllte Bläschen mit einer inneren zellulären Keimschicht (Germinalschicht), die sowohl Stammzellen als auch ausdifferenzierte Zellen wie Muskel- oder Nervenzellen enthält, und der äußeren azellulären Laminatschicht, die sich aus Proteinen und Polysacchariden zusammensetzt (Koziol 2014; Koziol et al. 2013; Lascano et al. 1975; Sakamoto and Sugimura 1969, 1970). Die Laminatschicht dient als Schutzmechanismus des Parasiten gegenüber der Immunantwort des Wirtes und ermöglicht dem Parasiten ein Überleben im Wirt (Gottstein *et al.* 2002). Der Metazestode kann von der Germinalschicht ausgehend Tochtervesikel bilden und diese nach außen abgeben. Dadurch entsteht im Laufe der Zeit ein multivesikuläres Gewebe, das ein infiltratives und tumorartiges Wachstum aufweist (Thompson et al. 1995). Nach wenigen Monaten bilden sich an der inneren Keimschicht Brutkapseln (BC) aus, in denen sich das dritte Larvenstadium des Fuchsbandwurmes, der Protoskolex, entwickelt. Die Protoskolices sind in diesem Stadium noch invaginert und von einer Membran umgeben (Koziol et al. 2013; Leducq and Gabrion 1992; Rausch 1954). Durch das langsame aber kontinuierliche und teils infiltrative Wachstum des Metazestoden wird der Zwischenwirt zunehmend geschwächt und stellt eine leichte Beute für den Fuchs, den Endwirt des Fuchsbandwurmes, dar. Durch die Magen-Darmpassage im Endwirt werden die Protoskolices aktiviert. Diese können sich mit ihrem Scolex, der durch die Aktivierung der Protoskolices evaginiert wurde, zwischen den Darmzotten in den Lieberkühnschen Krypten anheften und sich schließlich zum adulten Bandwurm weiterentwickeln (Thompson et al. 1995; Smyth 1968). Somit ist der Lebenszyklus des Fuchsbandwurmes

geschlossen. Der Mensch ist kein natürlicher Wirt des Fuchsbandwurmes sondern ein Fehlwirt und kann sich wie der natürliche Zwischenwirt über die orale Aufnahme von Wurmeiern infizieren (Eckert and Deplazes 2004).

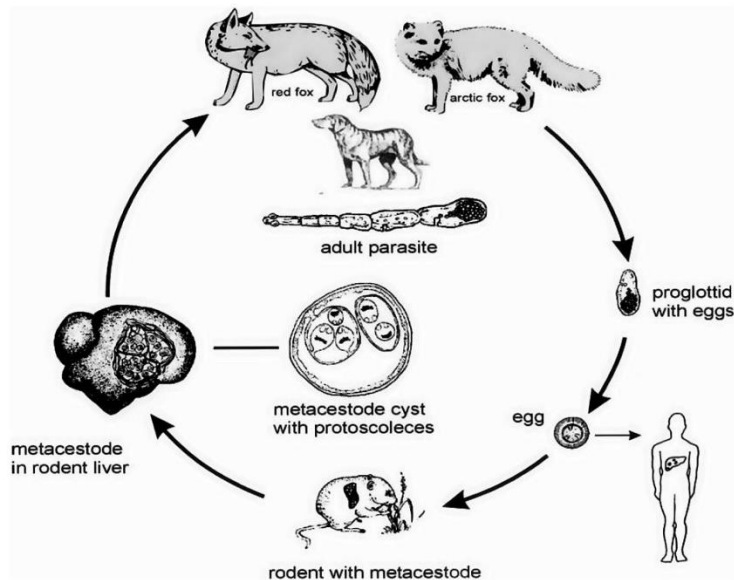


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Echinococcus multilocularis*: Torgerson PR, Keller K, Magnotta M, Ragland N
 (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_life_cycle_of_Echinococcus_multilocularis.jpg), <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>)

4.1.3 Die alveoläre Echinokokkose

Die alveoläre Echinokokkose (AE) wird durch das zweite Larvenstadium (Metazestode) des kleinen Fuchsbandwurmes *E. multilocularis* verursacht und zählt zu den gefährlichsten Parasitosen Europas. Dennoch ist die AE eine seltene Erkrankung und gehört nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zusammen mit der zystischen Echinokokkose und 19 weiteren Erkrankungen zu der Gruppe der vernachlässigten tropischen Krankheiten (engl.: neglected tropical diseases) (WHO 2021). Pro Jahr werden weltweit 18.235 neue Fälle der AE, 91% davon in China, vermutet (Torgerson *et al.* 2010). Die Inzidenz der AE liegt zwischen 0,03 und 1,2/100.000 Einwohnern (Schweiger *et al.* 2007) mit einer sehr hohen Prävalenz in den chinesischen Kreisen Gander, Dari, Jigzhi und Baima mit Werten bis zu 8,2% (Cai *et al.* 2017). Im Jahr 2001 wurde die nicht namentliche Meldepflicht der AE bei direktem und indirektem

Nachweis in Deutschland eingeführt. Seit 2001 bis heute (Stand: 24. September 2022) wurden 700 Fälle der AE in Deutschland gemeldet.

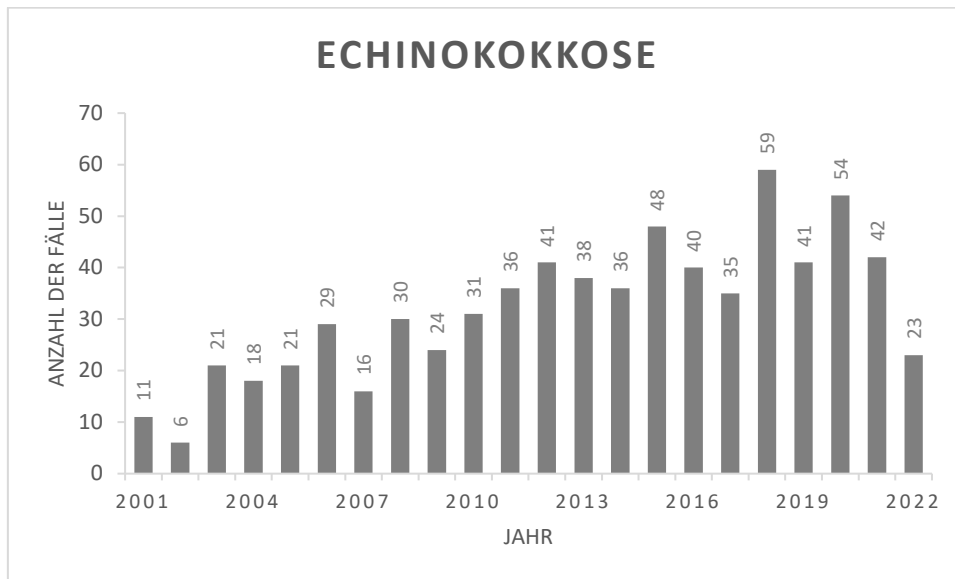


Abbildung 3: Anzahl der gemeldeten Fälle von AE in Deutschland: Die Abbildung zeigt die Anzahl der Fälle von AE in Deutschland in jedem einzelnen Jahr seit 2001. Im Jahr 2022 sind die Fälle von AE bis zum Zeitpunkt der Erstellung der Grafik (24. September 2022) angegeben. Die Grafik wurde anhand der Daten, die auf der Internetseite des Robert-Koch-Instituts „SURVSTAT@RKI2.0“ zur Verfügung stehen, erstellt.

Die höchsten Meldezahlen liegen in den südlichen Bundesländern, wie Baden-Württemberg (235) und Bayern (197) vor. Aber auch Nordrhein-Westfalen (62), Hessen (76) und Rheinland-Pfalz (38) verzeichnen hohe Meldezahlen. Im Jahr 2018 konnte die höchste Fallzahl (59) in Deutschland mit einer Inzidenz von 0,07/100.000 Einwohner seit Beginn der Meldepflicht verzeichnet werden. In den Jahren 2019 bis 2021 blieb die Inzidenz stabil bei 0,05-0,06. Im Jahr 2022 wurden bisher 23 Fälle der AE in Deutschland gemeldet. Auch in diesem Jahr wurden die meisten Fälle der AE in den südlichen Bundesländern, Bayern (4) und Baden-Württemberg (8), gemeldet. Alle Angaben wurden auf folgender Internetseite des Robert-Koch-Instituts erhoben <https://survstat.rki.de/> (Robert-Koch-Institut 2022).

Infektion: Der Mensch infiziert sich durch die orale Aufnahme infektiöser Fuchsbandwurmeier, die durch direkten Kontakt mit infizierten Füchsen oder durch Kontakt zu kontaminierter Erde an die Hände und schließlich in den Mund gelangen. Neben Füchsen können sich auch andere fleischfressende Säugetiere wie zum Beispiel

Wölfe, Marderhunde, Hunde oder Katzen durch das Fressen von erkrankten Nagetieren infizieren und somit das Infektionsrisiko für enge Kontaktpersonen erhöhen (Ammann and Eckert 1996; Eckert and Deplazes 2004). Wichtige Risikofaktoren neben der Haltung von Hunden oder Katzen sind landwirtschaftliche Tätigkeiten sowie der direkte Kontakt zu Füchsen in der Forstwirtschaft und bei der Jagd (Kern *et al.* 2004; Piarroux *et al.* 2013). Eine mögliche Infektion durch den Kontakt zu kontaminierten Früchten oder Wasser ist noch nicht vollständig geklärt (Lass *et al.* 2016; Robertson *et al.* 2016). Nach oraler Aufnahme werden die Fuchsbandwurmeier, die das erste Larvenstadium, die Onkosphäre, enthalten, durch die Magen-Darmpassage aktiviert und penetrieren das Darmepithel. Über den direkten Blutfluss der Pfortader gelangen die Onkosphären in das primäre Zielorgan, die Leber. Hier bildet sich der Metazestode, das zweite Larvenstadium des Fuchsbandwurmes, aus (WHO/OIE 2001).

Klinik: Nach einer Infektion mit dem kleinen Fuchsbandwurm siedeln sich die wenige Millimeter großen MZ bevorzugt in der Leber an und können dort zu 15-20 cm großen infiltrativ-wachsenden Raumforderungen mit teilweise zentraler Nekrose heranwachsen (WHO/OIE 2001). Aufgrund des sehr langsamen Vesikelwachstums bleibt die AE sehr lange asymptomatisch und dadurch meist unentdeckt. In circa 30% der Fälle wird die AE zufällig bei einer Untersuchung unspezifischer Symptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Hepatomegalie (Vergrößerung der Leber) oder bei Routineuntersuchungen wie Abdomen-Sonographie oder Labordiagnostik entdeckt (Ammann and Eckert 1996). Bei ca. 30% der Patienten treten als primäres Symptom eine Cholestase (Gallenstauung) und/oder abdominelle Beschwerden auf (Ammann and Eckert 1996). Die Symptome einer fortgeschrittenen AE entstehen sowohl durch das, einer malignen Entartung ähnliche, invasive und verdrängende Parasitenwachstum in der Leber als auch durch die Ausbildung eines periparasitären Granuloms mit Infiltration von stadienspezifischen Immunzellen, wie zum Beispiel T-Zellen, Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen sowie durch fibrotische Veränderungen (Wang and Gottstein 2016). Hierdurch kann es im Krankheitsverlauf zur Kompression wichtiger Gefäße und Gallengänge kommen und Erkrankungen wie Cholestase (Gallenstauung) mit Ikterus (Gelbsucht), portale Hypertension (Pfortaderhochdruck), sekundäre Leberzirrhose mit Verlust der Leberfunktion, Pfortaderthrombose (Blutgerinnsel in der Pfortader) und Anämie (Blutarmut) entstehen (Eckert and Deplazes 2004; WHO/OIE

2001). Im weiteren Krankheitsverlauf können durch lymphogene oder auch hämatogene Streuung Metastasen in anderen Organen wie zum Beispiel in Lunge, Gehirn und Knochen verursacht werden (WHO/OIE 2001).

Diagnostik: Aufgrund der langen symptomfreien Inkubationszeit von ca. 10-15 Jahren wird die Diagnose der AE häufig erst in einem späten und fortgeschrittenen Stadium gestellt (Kratzer 2019). Hierbei spielen eine ausführliche Anamnese mit körperlicher Untersuchung, bildgebende Verfahren sowie Sero- & Immundiagnostik eine entscheidende Rolle. Als bildgebende Verfahren stehen die Sonographie (US), Kontrastmittelsonographie (CEUS), Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Verfügung (Kratzer 2019). Die US stellt auf Grund von Verfügbarkeit und Effektivität das wichtigste bildgebende Verfahren dar (Rogan *et al.* 2006). 2015 wurde eine Ultraschall-Klassifikation zur Verbesserung der Erkennung der unterschiedlichen AE-Läsionen veröffentlicht (Kratzer *et al.* 2015). Die CEUS verbessert die sonographische Diagnostik der AE und ermöglicht es die Durchblutung der Leberläsionen zu beurteilen (Cai *et al.* 2019; Kratzer 2019). Die metabolische Aktivität der Läsionen kann ausschließlich durch die PET über die Verstoffwechslung der verabreichten radioaktiven Glucose beurteilt werden (Reuter *et al.* 2008). Die Sero- & Immundiagnostik dienen meistens zur Bestätigung einer in den bildgebenden Verfahren vermuteten AE, da die serologischen Tests nur einen stattgehabten Kontakt und nicht eine aktive Erkrankung nachweisen können (Kratzer 2019). Zunächst erfolgt ein Suchtest mittels Echinokokken-Rohantigen. Bei positivem Ergebnis im Suchtest wird ein Bestätigungstest durchgeführt, in dem rekombinant exprimierte *E. multilocularis* Antigene wie z.B. Em2, Em10, Em18 und Em11/3 verwendet werden. Die Tests verfügen über eine Sensitivität von 90-100% und eine Spezifität von 95-100% (Brunetti *et al.* 2010). Die WHO-IWGE (WHO- Informal Working Group on Echinococcosis) hat in Anlehnung zur TNM-Klassifikation bei Tumoren eine PNM-Klassifikation für die AE entwickelt. Hierbei wird die Ausbreitung des Parasiten in der Leber (P), die Beteiligung von Nachbarstrukturen (N) und die Metastasierung in andere Organe (M) berücksichtigt (Kern *et al.* 2006). Die Klassifikation soll die Qualität der einzelnen Behandlungen und die weltweite Kommunikation der einzelnen Kliniken vereinfachen.

Tabelle 1: PNM-Klassifikation der WHO-IWGE für die AE

P	Hepatische Lokalisation der parasitären Strukturen
PX	Keine Beurteilung möglich
P0	Kein Hinweis auf einen hepatischen Befall
P1	Peripherer Herd ohne Beteiligung proximaler Gefäße oder Gallengänge
P2	Zentraler Herd mit Beteiligung proximaler Gefäße oder Gallengänge eines Leberlappens
P3	Zentraler Herd mit Beteiligung hilärer Gallengänge oder Gefäße beider Leberlappen und /oder Beteiligung zweier Lebervenen
P4	Jeder Herd mit Ausbreitung entlang der hilären Gefäße und V. cava inferior und Gallenwege
N	Extrahepatische Beteiligung von Nachbarorganen ¹
NX	Keine Beurteilung möglich
N0	Kein Hinweis auf Beteiligung angrenzender Organe oder Gewebe
N1	Beteiligung angrenzender Organe oder Gewebe
M	Fernmetastasen ²
MX	Keine Beurteilung möglich
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen ²
	1: Diaphragma, Lunge, Pleura, Perikard, Herz, Magen, Duodenum, Niere, Nebenniere, Peritoneum, Retroperitoneum, Pankreas, regionale Lymphknoten, Ligamente, Brust- und Bauchwand mit angrenzenden Muskeln, Haut, Knochen 2: Lunge, ZNS, Niere, Peritoneum, Knochen, Orbita, Haut, Muskeln, nicht-regionale Lymphknoten

Therapie: Die Therapie der AE ist maßgeblich von der Operabilität der Leberläsionen abhängig und sollte nach Konsens einer interdisziplinären Konferenz an einem Zentrum für die Behandlung der AE erfolgen (WHO/OIE 2001). Die einzige Chance auf Heilung der AE ist die vollständige Entfernung der Läsion (R0-Resektion) (Moro and Schantz 2009). Aufgrund des sehr häufigen Befalls des rechten Leberlappens mit weit fortgeschrittenem Wachstum und Beteiligung von Gefäßen und Gallengängen bei Diagnosestellung ist eine R0-Resektion des parasitären Gewebes in nur 20-30% der Fälle

möglich und erfordert ein sehr erfahrenes chirurgisches Team (Kratzer 2019). Falls eine vollständige Resektion der Leber möglich ist und keine weiteren Metastasen vorliegen, sollte eine operative Versorgung mit einer anschließenden zweijährigen Behandlung mit Benzimidazolen erfolgen (WHO/OIE 2001). Bei Inoperabilität der Leberläsionen und dem Nachweis von metabolisch aktiven Läsionen in den durchgeführten Untersuchungen müssen die Patienten mit einer sehr nebenwirkungsreichen Therapie mit Benzimidazolen, wie zum Beispiel mit Albendazol oder Mebendazol, behandelt werden. Aufgrund der nur parasitostatischen Wirkung der Benzimidazole müssen diese meist lebenslang eingenommen werden (Brunetti *et al.* 2010). Bei metabolisch inaktiven Läsionen kann die Therapiestrategie „watch and wait“ mit regelmäßigen Kontrolluntersuchungen erfolgen (Apaer *et al.* 2019). Durch die Verbesserung der operativen und chemotherapeutischen Behandlung sowie der früheren Diagnosestellung der AE konnte die durchschnittliche Lebenserwartung bei Diagnosestellung von drei Jahren in den 1970er auf bis zu 20 Jahre im Jahr 2005 verbessert werden (Torgerson *et al.* 2008). Dennoch liegt die Sterblichkeit einer nicht behandelten oder einer inadäquat behandelten AE in 10-15 Jahren nach Diagnosestellung bei >90% (Ammann and Eckert 1996; Eckert and Deplazes 2004).

4.2 Konservierte Signalwege in *E. multilocularis*

Der Fuchsbandwurm *E. multilocularis* ist mit Säugetieren und dadurch mit seinen Zwischen- und Endwirten nahe verwandt und besitzt viele genetische Gemeinsamkeiten mit diesen (Brehm *et al.* 2006). Aufgrund der nahen Verwandtschaft vermutet man beim Fuchsbandwurm evolutionsgeschichtlich konservierte Signalwege, über die der Parasit mit seinem Wirt kommunizieren kann (Brehm 2010). Die Untersuchung und Charakterisierung dieser Signalwege und der einzelnen Signalwegmitglieder im Fuchsbandwurm ermöglicht es sowohl die Biologie des Parasiten als auch die Interaktionen von Parasit und Wirt zu verstehen. Zusätzlich bieten erforschte und im Fuchsbandwurm nachgewiesene Signalwege die Möglichkeit der Entwicklung neuer Angriffspunkte von Chemotherapeutika und somit die Entwicklung neuer und gegebenenfalls parasitiziden Therapiestrategien gegen die AE. In einigen vorherigen Arbeiten wurden bereits Signalwege im Fuchsbandwurm charakterisiert und Interaktionen zwischen Wirts-Zytokinen und deren parasitären Rezeptoren beschrieben (Brehm and Koziol 2017). Das Insulin des Wirtes, welches auf hormoneller Ebene den Blutzuckerspiegel reguliert, stimuliert in physiologischen Konzentrationen das Wachstum des Parasiten. Hierbei bindet das Wirtsinsulin an einen parasitären Insulinrezeptor und aktiviert die PI3K/Akt-Signalkaskade (Hemer *et al.* 2014). Des Weiteren wurde ein TGF- β /BMP-Rezeptor (EmTR1) (Zavala-Góngora *et al.* 2006) und Mitglieder der entsprechenden Signalkaskade (Smads) im Fuchsbandwurm charakterisiert (Zavala-Góngora *et al.* 2008; Epping and Brehm 2011; Zavala-Góngora *et al.* 2003), sowie drei weitere Gene für mögliche TGF- β /BMP-Rezeptoren entdeckt (Tsai *et al.* 2013). BMP-2 (engl.: Bone morphogenetic protein 2), ein wichtiges Protein zur Entwicklung von Knochen und Knorpel, stimuliert sowohl die Aktivität des TGF- β /BMP-Rezeptors als auch die Phosphorylierung von EmSmadB, wodurch die Signalkaskade weiter fortgeführt werden kann (Zavala-Góngora *et al.* 2006). Eine weitere Wirtsparasiten-Interaktion stellt der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Signalweg (FGF-Signalweg) dar. Das in der Leber des Wirtes exprimierte FGF, dessen Produktion durch fibrotische Veränderungen verstärkt wird, bindet an parasitäre FGF-Rezeptoren, aktiviert die Erk-like MAPK-Kaskade (engl.: mitogen-activated-protein-kinase Kaskade) und stimuliert nachfolgend Zellproliferation und Entwicklung des Parasiten (Forster *et al.* 2019). Diese wird ebenfalls durch den EGFR/Erk-Signalweg im Fuchsbandwurm

unterstützt, wenn Wirts-EGF an den parasitären EGF-Rezeptor bindet (Cheng *et al.* 2017). Nicht nur der Wirt sezerniert Zytokine, die mit Rezeptoren des Parasiten interagieren und diesen in Entwicklung und Wachstum beeinflussen, sondern auch der Fuchsbandwurm selbst ist zur Produktion und Sekretion von Zytokinen fähig (Brehm and Koziol 2017). Es wurden bereits parasitäre Insulin Homologe (EmILP1 & 2) (Hemer *et al.* 2014; Wang, Luo, *et al.* 2014), die vor allem im adulten Wurm exprimiert werden, ein EGF-Homolog (Brehm *et al.* 2003) sowie zwei BMP-Homologe (Tsai *et al.* 2013) und ein Activin A Homolog (EmACT) (Nono *et al.* 2020) identifiziert. CD4⁺-Zellen, die mit parasitärem Activin A behandelt worden sind, produzieren eine höhere Menge an immunsuppressiv wirkenden IL-10. Dieser Effekt kann auch bei der Behandlung von CD4⁺-Zellen mit den Exkretions-/Sekretionsprodukten von MZ, die ebenfalls EmACT enthalten, verzeichnet werden. Des Weiteren wird durch eine Behandlung mit parasitären Exkretions-/Sekretionsprodukten (E/S Produkte) die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (Foxp3⁺ Treg) aus CD4⁺-Zellen, die eine entscheidende Rolle in der Unterdrückung des Immunsystems spielen, unterstützt (Nono *et al.* 2020). Hierdurch kann der Parasit sein eigenes Wachstumsverhalten und die Etablierung im Wirt beeinflussen und verbessern. Auch EmTIP, ein Homolog von TIP (engl.: T-cell immunomodulatory protein), das ebenfalls in den E/S-Produkten vorhanden ist, kann das Immunsystem des Wirtes beeinflussen indem es die IFN- γ Sekretion von CD4⁺-Zellen erhöht. IFN- γ wird vor allem in der frühen Phase der Infektion mit dem Fuchsbandwurm von Immunzellen des Wirtes sezerniert (Nono *et al.* 2014). Bei der Sequenzierung des Fuchsbandwurm-Genoms wurde ebenfalls ein Gen für ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie (TNF-Rezeptor Superfamilie) identifiziert. Gleichzeitig konnte eine Expression eines kanonischen TNF-alpha Liganden bei *E. multilocularis* nicht nachgewiesen werden. Die fehlende Existenz eines spezifischen Liganden zu einem Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie lässt auch hier eine mögliche Wirt-Parasiten-Interaktion über konservierte Signalwege vermuten (Tsai *et al.* 2013).

4.3 TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie

Die Tumornekrosefaktor-/Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie (TNF-/TNFR-Superfamilie), deren Name von den ersten beiden Mitgliedern TNF- α und TNF- β , auch als Lymphotoxin- α bekannt, stammt (Gaur and Aggarwal 2003), stellt eine sehr heterogene und vielfältige Gruppe von Liganden und ihren spezifischen Rezeptoren dar. Dennoch weisen sowohl Liganden als auch Rezeptoren eine gewisse Ähnlichkeit in ihrer Struktur und Biologie auf (Croft and Siegel 2017). Insgesamt besteht die TNF-/TNFR-Superfamilie aus 19 TNF-Liganden und 29 TNF-Rezeptoren. Eine Liste der Mitglieder der TNF- und TNFR-Superfamilie ist im Anhang dieser Arbeit (siehe Kapitel 11.1 und 11.2) aufgeführt. Alle Liganden der TNF-Superfamilie besitzen an ihrem C-terminalen Ende eine THD, eine sogenannte TNF homology domain, die für die Bildung von Homotrimeren und für die Bindung an TNF-Rezeptoren essenziell ist (Bodmer et al. 2002; Locksley et al. 2001). Die Liganden können sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vorliegen und besitzen die Fähigkeit über verschiedene Signalkaskaden den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren (Gaur and Aggarwal 2003). Zwei bis sechs cysteinreiche Regionen im extrazellulären Bereich des Rezeptors stellen die strukturelle Gemeinsamkeit aller Tumornekrosefaktor-Rezeptoren dar (Bodmer et al. 2002; Locksley et al. 2001). In den meisten Fällen kann ein Ligand an mehrere TNF-Rezeptoren, in Einzelfällen jedoch nur an einen Rezeptor (z.B. TWEAK) binden und löst durch die Aktivierung von Proteinen eine intrazelluläre Signalkaskade aus (Idriss and Naismith 2000; Hehlhans and Pfeffer 2005). Je nach Ligand-/Rezeptorkombination können über verschiedene Signalwege die unterschiedlichsten Funktionen von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben bis hin zum Zelluntergang, der Apoptose, ausgelöst werden (Hehlhans and Pfeffer 2005). Die Hauptproduzenten der Liganden und ihrer Rezeptoren sind Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel T- & B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Monozyten. Aber auch Endothelzellen, Fibroblasten und Vorstufen von Osteoklasten können TNF-Liganden produzieren (Gaur and Aggarwal 2003). Die TNF-/TNFR-Superfamilie ist ein zentraler Bestandteil des Immunsystems, trägt zur Entwicklung sekundär lymphatischer Organe sowie zur Ausbildung der adaptiven Immunabwehr bei und hält Immunreaktion und Immuntoleranz im Gleichgewicht (Locksley et al. 2001). Neben den Funktionen im Immunsystem werden unter anderem auch die Aktivierung und Beendigung einer akuten

Entzündungsreaktion, die Entwicklung von Haarfollikeln und Schweißdrüsen, Knochenauf- und abbau, die Reifung der Milchdrüsen und die Bildung sensorischer Neuronen durch Mitglieder der TNF-/TNFR-Superfamilie reguliert (Locksley et al. 2001; Croft et al. 2013). Eine weitere Besonderheit der TNF-/TNFR-Superfamilie ist die Fähigkeit zum „reverse signaling“. Hier wird das Signal nicht wie üblich vom Liganden an den Rezeptor weitergegeben, sondern vom Rezeptor an einen membrangebundenen Liganden und damit an die entsprechende Zielzelle übermittelt (Watts *et al.* 1999).

4.3.1 Tumornekrosefaktor alpha

Der Tumornekrosefaktor alpha (im Folgenden TNF- α) gehört in die Gruppe der Zytokine und ist einer der wichtigsten Botenstoffe des Immunsystems. 1975 verwendete die Arbeitsgruppe Carswell *et al* erstmals den Begriff Tumornekrosefaktor nachdem sie einen auf diverse Tumore nekrotisierenden Effekt des Serums von zuvor mit Endotoxinen behandelten Mäusen, Ratten und Hasen festgestellt hatten (Carswell *et al.* 1975). Erst 1984 konnte jedoch das Zytokin TNF- α von Aggarwal *et al* aus dem Medium von aktivierten Makrophagenkulturen isoliert werden (Aggarwal, Kohr, et al. 1985). Während dieser Versuche wurde außerdem Lymphotoxin, welches später in TNF- β umbenannt wurde, aus aktivierten Lymphozyten isoliert (Aggarwal, Henzel, et al. 1985; Aggarwal et al. 1984). TNF- α und TNF- β gehören mit insgesamt 19 Liganden und deren Rezeptoren in die TNF-/TNFR-Superfamilie. Die Hauptproduzenten von TNF- α sind Zellen des Immunsystems, aber auch andere Zelltypen wie glatte Muskelzellen, Astrozyten oder Endothelzellen können TNF- α produzieren (Vilcek and Lee 1991). Das Gen des humanen TNF- α ist auf Chromosom 6 am Genlocus p 21.3 lokalisiert und codiert die TNF-Vorstufe als ein Typ-2-Transmembranprotein, welches die Zellmembran nur einmal durchzieht, den C-Terminus extrazellulär und den N-Terminus intrazellulär trägt (Spriggs et al. 1992; Nedwin et al. 1985; Idriss and Naismith 2000). Die membrangebundene TNF-Vorstufe kann durch eine proteolytische Spaltung durch die Metalloprotease TACE (engl.: TNF alpha Converting Enzyme) in eine lösliche Form mit einer molekularen Masse von 17 kDa überführt werden (Watts *et al.* 1999; Black *et al.* 1997). Die lösliche Form von TNF- α besteht aus drei identischen Untereinheiten (Homotrimer) (Smith and Baglioni 1987), ist biologisch aktiv und kann an zwei Rezeptoren der TNFR-Superfamilie, TNFR1

und TNFR2, binden (Grell *et al.* 1998). In der Folge werden über verschiedene Signalwege Funktionen wie Zellüberleben, -proliferation, -differenzierung und der Zelluntergang ausgelöst (Locksley *et al.* 2001).

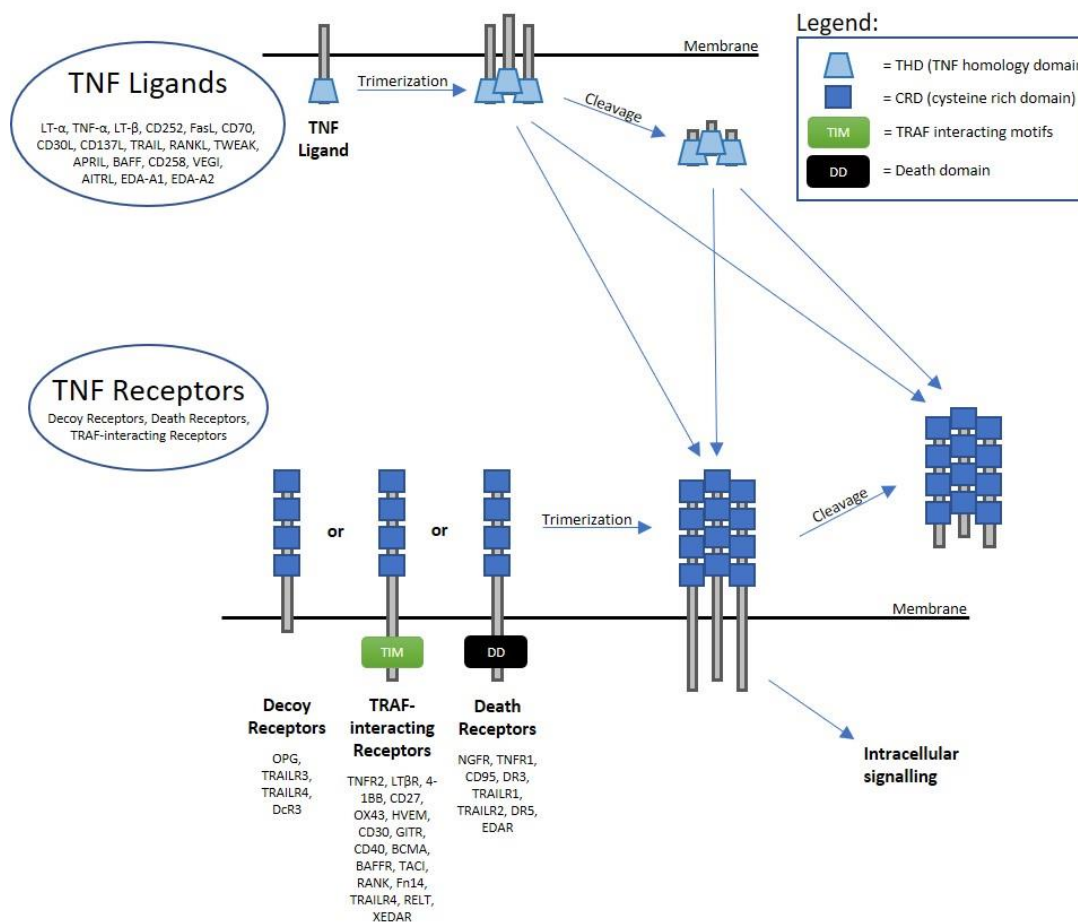


Abbildung 4: Ligand-Rezeptor-Interaktion in der TNF/TNFR-Superfamilie: Insgesamt gibt es 19 TNF-Liganden. Der Großteil der TNF-Liganden sind Typ 2 Transmembranproteine, besitzen im extrazellulären Bereich eine THD (TNF homology domain) und lagern sich zu einem Homotrimer zusammen. Einige TNF-Liganden können durch Metalloproteasen von der Membran abgespalten werden und in löslicher Form vorliegen. Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form der TNF-Liganden kann aktiv sein und eine Bindung mit TNF-Rezeptoren eingehen. Zu der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören 29 Mitglieder. Der Großteil der Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind Typ 1 Transmembranproteine und besitzen in der extrazellulären Region cysteinreiche Domänen (CRD), die das Merkmal der TNFR-Superfamilie sind. Die Anzahl der CRD kann von zwei bis sechs variieren. Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie können aufgrund ihrer intrazellulären Domäne in 3 Gruppen, die Decoy-Rezeptoren, die TRAF-interagierenden Rezeptoren und die Todesrezeptoren, unterteilt werden. Die Todesrezeptoren besitzen im intrazellulären Bereich eine Todesdomäne und können hierüber verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Die TRAF-interagierenden Rezeptoren besitzen im intrazellulären Bereich eine TIM (TRAF interacting motifs), die mit anderen Proteinen der TRAF-Familie interagieren kann. Über diese Interaktion können verschiedene intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden. Die Decoy-Rezeptoren besitzen keine intrazelluläre Domäne und können somit keine Signale nach intrazellulär weiterleiten. Auch die TNF-Rezeptoren bilden Trimere und können nach Bindung des spezifischen Liganden intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Auch in der TNFR-Superfamilie können einige Mitglieder in löslicher Form vorliegen, nachdem sie durch Metalloproteasen von der Membran abgespalten wurden.

Auch das membrangebundene TNF- α ist biologisch aktiv und kann diverse Zellfunktionen über übliche Signalwege als auch über das „reverse signaling“ vermitteln (Eissner et al. 2004). Die einzelnen Signalwege werden im Detail im folgenden Kapitel 4.3.4 beschrieben.

Die zahlreichen Funktionen von TNF- α reichen von der Stimulation des Immunsystems, der Aktivierung und Unterstützung von Immunzellen zur Bekämpfung von Infektionen, welche durch verschiedene Pathogenen wie zum Beispiel Bakterien, Viren und Parasiten ausgelöst werden (Vilcek and Lee 1991; Aggarwal 1992), bis hin zur Sepsis, einem septischen Schock oder sogar dem Tod bei einer überschießenden Produktion von TNF- α (Fiers 1991). Des Weiteren ist TNF- α bei der Ausbildung von Granulomen, der Rückbildung von Entzündungsreaktionen, der Einleitung der Wundheilung und der Regulierung von Geweberegenerationen, wie zum Beispiel bei der neuronalen Remyelinisierung (Arnett *et al.* 2001), von entscheidender Rolle (Kallioli and Ivashkiv 2016). TNF- α ist jedoch nicht nur an physiologischen Abläufen in einem Organismus beteiligt, sondern auch an der Pathogenese vieler verschiedener Erkrankungen. TNF- α wird ebenfalls von verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel bei Lymphomen, Ovarial-, Brust-, Blasen-, Prostata- und kolorektalen Tumoren, exprimiert und geht hier häufig mit einer schlechten Prognose einher (Balkwill 2002). Bei diesen Tumoren wird durch TNF- α die Expression proinflammatorischer Gene, vor allem von NF- κ B, gesteigert und dadurch Angiogenese, Tumorzellproliferation, Gewebsinvasion und die Metastasierung gefördert (Aggarwal et al. 2012; Aggarwal et al. 2006; Balkwill 2009). Bei der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2, der nicht-alkoholischen Steatohepatitis, kardiovaskulären Erkrankungen, pulmologischen Erkrankungen (COPD, Asthma) und neurologischen Erkrankungen, wie Alzheimer-Erkrankung, Epilepsie, Depression, Multiple Sklerose und Parkinsonerkrankung, aber auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa), rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis, systemischem Lupus erythematoses und der Psoriasis wirkt TNF- α ein (Aggarwal et al. 2012). In den letzten Jahrzehnten wurde die zentrale Rolle von TNF- α und seinen Rezeptoren in der Pathogenese dieser Erkrankungen zur Entwicklung erfolgreicher Therapien genutzt. Bereits 1993 wurde Infliximab, der erste chimäre monoklonale Antikörper gegen TNF- α , als TNF-Blocker erfolgreich zur Therapie der rheumatoiden Arthritis verwendet (Elliot

et al. 2008). Seither wurden fünf weitere anti-TNF-Biologika im europäischen und US-amerikanischen Markt für die klinische Verwendung zugelassen und sind eine der bestverkauften Pharmazeutika-Klassen mit einem Umsatz von über 25 Milliarden US-Dollar pro Jahr (Steeland *et al.* 2018; Monaco *et al.* 2015). Diese Medikamente werden nun seit Jahren erfolgreich in der Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, rheumatoider Arthritis, Spondylitis ankylosans, Psoriasis, Psoriasisarthritis und juveniler idiopathischer Arthritis eingesetzt (Steeland *et al.* 2018).

4.3.2 Die Rolle von TNF- α bei einer Immunreaktion & bei der AE

Beim Eindringen von Pathogenen, wie zum Beispiel Bakterien, Viren oder Parasiten, in einen Organismus werden diese durch spezifische Rezeptoren (PRR; engl: Pathogen Recognition Receptor) auf Epithelzellen und auf Zellen der angeborenen Immunantwort, zu denen dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen gehören, erkannt und eine entsprechende Immunreaktion eingeleitet (Akira *et al.* 2006). Die Aktivierung der spezifischen Rezeptoren löst eine intrazelluläre Signalkaskaden aus und endet unter anderem in der Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Stickstoffmonoxid (NO), welche wiederum Immunzellen der erworbenen Immunantwort aktivieren (Schulte *et al.* 2013). Circa 30 Minuten nach Erstkontakt des Immunsystems mit einem Pathogen wird als eines der ersten Zytokine TNF- α von Makrophagen sezerniert und erreicht nach circa 60-90 Minuten seine höchste Konzentration (Cannon *et al.* 1990). Hierdurch werden sowohl Produktion und Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 und Interleukin-6 (IL-1 & IL-6), als auch von TNF- α selbst aktiviert (Steeland *et al.* 2018). Zusätzlich werden durch TNF- α , IL-1 und IL-6 weitere Immunzellen aktiviert und die Permeabilität der Gefäßwände für den Eintritt von Immunzellen ins Gewebe erhöht (Varela *et al.* 2018). Nach der primären Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen kommt es im weiteren Verlauf der Immunreaktion zur Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-10, IL-4 und TGF- β), welche die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α hemmen. Außerdem werden Interleukin-1-Rezeptorantagonisten und lösliche TNF-Rezeptoren sezerniert, die proinflammatorische Zytokine binden und neutralisieren können (Seitz *et al.* 1995). Hierdurch wird eine überschießende Immunreaktion

vermieden und die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen gehalten, sodass dem Organismus im Kampf gegen Pathogene kein oder nur ein geringer Schaden zugefügt wird (Cohen 2002). Bei einer Überproduktion von TNF- α bzw. einer Dysbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen kann es zu einer überschießenden Immunreaktion kommen, die in einer Sepsis, einem septischen Schock oder im Extremfall sogar dem Tod enden kann (Varela *et al.* 2018).

Auch bei einer Infektion mit dem Fuchsbandwurm *E. multilocularis* kommt es zu einer Immunreaktion. Die Infektion des Zwischenwirtes mit *E. multilocularis* kann aufgrund ihrer Immunantwort, den beteiligten Immunzellen, Zytokinen und Chemokinen, der Histopathologie des Lebergewebes und der Leberläsionen sowie durch das Wachstum des Parasiten in drei Phasen unterteilt werden (Zhang *et al.* 2012; Wang, Lin, *et al.* 2014). Die ersten 60 Tage nach der akzidentiellen oralen Aufnahme des Parasiten bilden die erste Phase. Tag 61 bis Tag 180 entsprechen der mittleren Phase und Tag 181 bis zum Tode des Zwischenwirtes werden als späte Phase der Infektion beschrieben. In der initialen, ersten Phase kommt es zur Stimulation des Immunsystems (Wang, Lin, *et al.* 2014). Nach der Penetration der Wand des Gastrointestinaltraktes gelangt der Parasit mit dem Blutfluss der Pfortader zur Leber und schließlich in die Lebersinusoiden. Hier kommt es zum ersten Kontakt mit gewebsresidenten Makrophagen der Leber, den Kupfferzellen (Bilzer *et al.* 2006). Diese stellen mit 80-90% die größte Gruppe sesshafter Makrophagen dar und sind zusammen mit weiteren Immunzellen und Zytokinen ein zentraler Bestandteil der angeborenen Immunabwehr gegen Pathogene, die aus dem Gastrointestinaltrakt in die Leber gelangen (Bilzer *et al.* 2006; Parker and Picut 2005). Nach Kontakt des Parasiten mit den Kupfferzellen/Makrophagen werden diese aktiviert und es kommt zur Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , Chemokinen und der Aktivierung von TH-1-Zellen (Liu *et al.* 2020; Wang, Lin, *et al.* 2014). Vor allem große Kupfferzellen, die in der periportalen Zone der Leberläppchen sesshaft sind, sezernieren die höchsten Konzentrationen von TNF- α (Parker and Picut 2005). Dies kann gerade in der frühen Phase der Infektion (Tag 1-30) mit einer starken Erhöhung der TNF- α Sekretion in den parasitären Läsionen und einem rapiden Abfall in den anschließenden Tagen bedingt durch ein niedriges Sekretionsniveau im weiteren Infektionsverlauf verzeichnet werden (Wang, Lin, *et al.* 2014). Die Frage nach der Zellart, die für die erhöhte TNF- α Produktion in den parasitären Leberläsionen verantwortlich ist,

ist noch teilweise ungeklärt (Wang, Lin, et al. 2014). Sowohl die TNF- α - als auch die IFN- γ - und IL-10-Produktion kann durch humanes und murines TIP (engl: T-Zell immunomodulatory protein) in T-Zellen gesteigert werden und zeigt in Mäusen einen protektiven Effekt in der Graft-versus-Host-Reaktion (Fiscella *et al.* 2003). Im Fuchsbandwurm konnte in einer vorherigen Arbeit ein Homolog von TIP, EmTIP, identifiziert werden. EmTIP wird vor allem in Primärzellen exprimiert und in das umliegende Medium sezerniert (Nono et al. 2014). Die Primärzellkultur stellt den Wechsel von Onkosphäre zu MZ, welcher in der frühen Infektionsphase der AE vollzogen wird, *in vitro* dar. Das von den Primärzellen sezernierte EmTIP unterstützt die TH-1 Immunantwort des Wirtes und fördert die IFN- γ Produktion (Nono et al. 2014). Liu *et al* konnte eine erhöhte Expression von TNF- α in den Kupfferzellen, die sich unmittelbar in der Nähe von parasitären Läsionen befinden, nachweisen (Liu *et al.* 2020). Die Bedeutung von TNF- α in der Immunabwehr gegen den Fuchsbandwurm konnte durch Versuche mit TNF- α defizienten Mäusen sowie bei Patienten unter einer Therapie mit TNF- α -Inhibitoren zur Behandlung einer rheumatoiden Arthritis bestätigt werden. In diesen Versuchen war der Verlauf der AE deutlich schneller und schwerer (Amiot *et al.* 1999; Weiner *et al.* 2011). Nach einer TH-1 und TNF- α dominanten, initialen Phase der Infektion kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der TH-2 vermittelten Immunreaktion und schließlich zu einem TH1-/TH2-Gleichgewicht in der mittleren Phase, der sogenannten Immunbalance. Diese ist durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen/Chemokinen, wie IL-4, IL-5, CXCL9 und CCL17 gekennzeichnet (Wang, Lin, *et al.* 2014). In einem chronischen Verlauf der AE kommt es zur Einwanderung phasenspezifischer Immunzellen und zur Ausbildung von periparasitären Granulomen, die bis zur Leberfibrose und Leberzirrhose mit Funktionsverlust der Leber voranschreiten können (Vuitton and Gottstein 2010; Wang and Gottstein 2016). Die Fibrose-Entstehung kann durch die dauerhafte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6, sowie durch Makrophagen in der äußersten Region der Granulome von aktiven Läsionen herbeigeführt werden (Bresson-Hadni *et al.* 1994). In der späten Phase der Infektion, der Immunsuppression, die durch Treg-Zellen (regulatorische T-Zellen) und die Sekretion von regulatorischen Zytokinen, wie TGF- β und IL-10, bestimmt wird, kommt es zur Immuntoleranz gegenüber dem Parasiten (Wang, Lin, *et al.* 2014). Der Parasit ist in der Lage durch die

Exkretion/Sekretion bestimmter Faktoren, unter anderem durch EmAct, die Ausbildung von regulatorischen T-Zellen und die Produktion von IL-10 zu fördern und könnte dadurch die Ausbildung einer immunsupprimierten direkten Umgebung beeinflussen (Nono et al. 2020).

4.3.3 Tumornekrosefaktor-Rezeptoren

Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie umfasst 29 verschiedene Rezeptoren, welche die Eigenschaft besitzen Liganden aus der Tumornekrosefaktor Superfamilie spezifisch zu binden. Eine Liste der Mitglieder der TNF-/TNFR-Superfamilie ist im Anhang dieser Arbeit (siehe Kapitel 11.1 und 11.2) aufgeführt. Das charakteristische Merkmal der TNF-Rezeptoren ist eine für die spezifische Bindung der Liganden notwendige cysteinreiche Domäne in der extrazellulären Region (Bodmer et al. 2002; Locksley et al. 2001). Je nach Rezeptortyp kann die Anzahl der cysteinreichen Domänen von einer bis maximal sechs reichen (Beutler and Bazzoni 1998; Naismith and Sprang 1998). Die meisten Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie werden als Typ 1-Transmembranproteine exprimiert, welche in die Gruppe der Singlepass-Proteine gehören. Diese Singlepass-Proteine durchziehen die Zellmembran nur einmal und verbinden auf diesem direkten Weg den intrazellulären C-Terminus mit dem extrazellulären N-Terminus (Bodmer et al. 2002). Die meisten Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie sind membrangebunden, jedoch können einige der TNF-Rezeptoren, wie zum Beispiel TNFR1, nach einer proteolytischen Spaltung oder durch alternatives Splicing in löslicher Form vorliegen und von Zellen sezerniert werden (Bodmer et al. 2002). Die TNF-Rezeptoren bilden ähnlich wie ihre Liganden, einen Komplex aus drei gleichen Ketten, der meist erst bei der Bindung eines Liganden an den TNF-Rezeptor formiert wird. Drei Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR1, TNFR2 und CD40) besitzen zusätzlich im extrazellulären Bereich eine sogenannte PLAD (engl.: preligand assembly domain), welche die Komplexbildung bereits vor der Bindung eines Liganden ermöglicht und für die Ligandenbindung sowie für die eigentliche Funktion des Rezeptors essenziell ist (Chan *et al.* 2000; Siegel *et al.* 2000). In der Regel kann ein TNF-Rezeptor mehrere Liganden aus der TNF-Superfamilie binden, in einzelnen Fällen existiert jedoch nur ein spezifischer Ligand (Hehlgans and Pfeffer 2005).

Eine Ausnahme hierzu stellt beispielsweise der NGFR (engl.: nerve growth factor receptor) oder auch p75^{NTR} genannt dar, da er als Liganden keine Mitglieder der TNF-Superfamilie sondern Neutrophine wie zum Beispiel NGF (engl.: nerve growth factor), Neutrophin-3, Neutrophin-4 und den Wachstumsfaktor BDNF (engl.: brain-derived neurotrophic factor) verwendet (Yano and Chao 2000). Durch die Bindung eines spezifischen Liganden an die extrazelluläre Region des Rezeptors wird dieser aktiviert, verändert seine Faltung und ermöglicht so die Bindung verschiedener zytoplasmatischer Adaptermoleküle, wie zum Beispiel TRAF und FADD an die intrazelluläre Region (McWhirter *et al.* 1999). In der Folge können unterschiedliche Proteine an den intrazellulären Komplex binden und wiederum diverse intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. Aufgrund der enormen Vielfalt an möglichen Kombinationen von Rezeptoren, Liganden und Adaptermolekülen lässt sich das weite Funktionsspektrum der TNF-/TNFR-Superfamilie erklären.

Anhand ihrer intrazellulären Domäne kann die TNF-Rezeptor-Superfamilie in drei Gruppen unterteilt werden (Dempsey *et al.* 2003). Die erste Gruppe bilden die Death-Rezeptoren oder auch Todesrezeptoren genannt. Sie besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne (engl.: death domain oder DD) an welche Adaptermoleküle, wie zum Beispiel TRADD und FADD, mit ihrer eigenen Todesdomäne binden können. Durch den gebildeten Rezeptor-Adaptermolekül-Komplex werden wiederum verschiedene Caspasen aktiviert und der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet (Hehlhans and Pfeffer 2005). In einigen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Rezeptoren mit einer Todesdomäne nicht nur die Apoptose, sondern auch anti-apoptotische Funktionen wie zum Beispiel Zellproliferation und -differenzierung regulieren können (Guicciardi and Gores 2009). Vertreter der Death-Rezeptoren-Gruppe sind unter anderem TNFR1, DR3, DR4, DR5, DR6 (engl.: death receptor 3,4,5 und 6), p75^{NTR} und Fas (Hehlhans and Pfeffer 2005). Die zweite Gruppe, die TRAF-interagierenden Rezeptoren, besitzt anstelle der intrazellulären Todesdomäne TRAF-interagierende Motive (TIM), welche nach Aktivierung des Rezeptors Adaptermoleküle aus der TRAF-Familie binden und somit Signalwege über NF-κB, p38 oder JNK aktivieren (Hehlhans and Pfeffer 2005; Dempsey *et al.* 2003). Mitglieder dieser Gruppe sind unter anderem TNFR2, CD27, CD30 und Lymphotoxin-β-Rezeptor (Hehlhans and Pfeffer 2005). Die letzte Gruppe, mit TRAIL-R3, DcR3 (Decoy Rezeptor 3) und Osteoprotegin als Mitglieder, ist die Gruppe

der Decoy-Rezeptoren, welche keine intrazelluläre Domäne besitzen und keine Signale nach intrazellulär weiterleiten können. Dennoch haben sie eine wichtige Funktion, in dem sie mit anderen Rezeptoren um Liganden konkurrieren und dadurch die Aktivität anderer Rezeptoren maßgeblich beeinflussen können (Hehlhans and Pfeffer 2005).

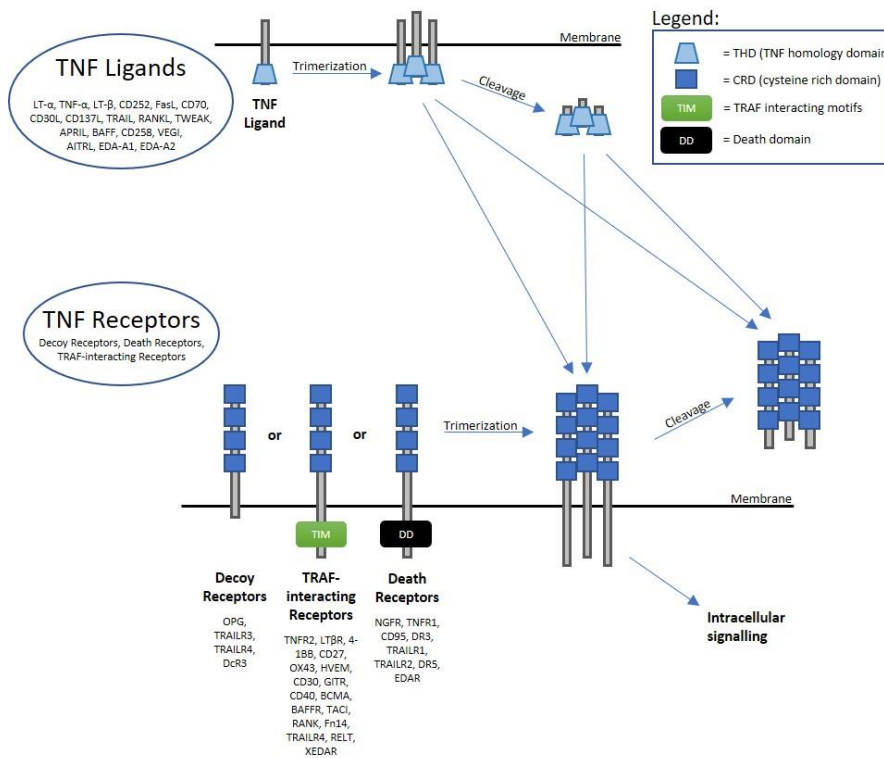


Abbildung 5: Ligand-Rezeptor-Interaktion in der TNF/TNFR-Superfamilie: Insgesamt gibt es 19 TNF-Liganden. Der Großteil der TNF-Liganden sind Typ 2 Transmembranproteine, besitzen im extrazellulären Bereich eine THD (TNF homology domain) und lagern sich zu einem Homotrimer zusammen. Einige TNF-Liganden können durch Metalloproteasen von der Membran abgespalten werden und in löslicher Form vorliegen. Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form der TNF-Liganden kann aktiv sein und eine Bindung mit TNF-Rezeptoren eingehen. Zu der TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören 29 Mitglieder. Der Großteil der Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind Typ 1 Transmembranproteine und besitzen in der extrazellulären Region cysteinreiche Domänen (CRD), die das Merkmal der TNFR-Superfamilie sind. Die Anzahl der CRD kann von zwei bis sechs variieren. Die Mitglieder der TNFR-Superfamilie können aufgrund ihrer intrazellulären Domäne in 3 Gruppen, die Decoy-Rezeptoren, die TRAF-interagierenden Rezeptoren und die Todesrezeptoren, unterteilt werden. Die Todesrezeptoren besitzen im intrazellulären Bereich eine Todesdomäne und können hierüber verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Die TRAF-interagierenden Rezeptoren besitzen im intrazellulären Bereich eine TIM (TRAF interacting motifs), die mit anderen Proteinen der TRAF-Familie interagieren kann. Über diese Interaktion können verschiedene intrazelluläre Signalwege ausgelöst werden. Die Decoy-Rezeptoren besitzen keine intrazelluläre Domäne und können somit keine Signale nach intrazellulär weiterleiten. Auch die TNF-Rezeptoren bilden Trimere und können nach Bindung des spezifischen Liganden intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Auch in der TNFR-Superfamilie können einige Mitglieder in löslicher Form vorliegen, nachdem sie durch Metalloproteasen von der Membran abgespalten wurden.

4.3.4 TNF- α -Signalwege

TNF- α ist ein zentraler Botenstoff des Immunsystems und kann über die Bindung bzw. Aktivierung seiner spezifischen Rezeptoren verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und somit unterschiedlichste Zellfunktionen, wie zum Beispiel Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellwachstum aber auch den programmierten Zelltod durch Apoptose und Nekroptose, aktivieren (Wajant and Siegmund 2019). TNF- α interagiert mit zwei Mitgliedern der TNFR-Superfamilie, dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (Synonyme: TNFRSF1, TNFR1, p55TNFR, CD120a) und dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (Synonyme: TNFRSF2, TNFR2, p75TNFR oder CD120b) (Loetscher et al. 1991).

TNFR1 hat eine molekulare Masse von 55 kDa, wird von nahezu allen Zelltypen des Körpers exprimiert (Grell *et al.* 1995), besitzt eine intrazelluläre Todesdomäne und ist über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden für die meisten Funktionen von TNF- α verantwortlich (Cabal-Hierro and Lazo 2012). TNFR1 kann sowohl von der löslichen Form als auch von der membrangebundenen Form von TNF- α aktiviert werden (Grell *et al.* 1995), besitzt jedoch zum löslichen TNF- α eine höhere Affinität (Grell *et al.* 1998). TNFR2 hat eine molekulare Masse von 75 kDa und ist nur in einigen Zellarten des Körpers, wie zum Beispiel in mesenchymalen Stammzellen (Choi *et al.* 2005; Faustman and Davis 2010), T-Zellen (Ware *et al.* 1991), kardialen Muskelzellen (Irwin *et al.* 1999), verschiedenen Nervenzellen und Endothelzellen (Dopp et al. 2002; Li et al. 2002) exprimiert und wird nur vom membrangebundenen TNF- α (mTNF- α) aktiviert (Grell *et al.* 1995). Sowohl TNFR1 als auch TNFR2 besitzen eine PLAD im extrazellulären Bereich und bilden bereits vor der Bindung des Liganden einen Komplex als Homotrimer aus (Chan *et al.* 2000; Siegel *et al.* 2000). Beim inaktiven TNFR1 wird die intrazelluläre Todesdomäne durch SODD (engl.: silencer of death domain) besetzt, sodass intrazelluläre Signalkaskaden nicht eingeleitet werden können (Jiang *et al.* 1999). Nach der Bindung von TNF- α an TNFR1 können sich zwei unterschiedliche intrazelluläre Komplexe bilden. Komplex1 führt vor allem zur Expression anti-apoptotischer Proteine und folglich zu Zellproliferation und Zellüberleben (Cabal-Hierro and Lazo 2012). Komplex2, auch DISC genannt, führt nach der Internalisierung des TNF-Rezeptors über verschiedene Signalwege zu Apoptose oder Nekroptose (Micheau and Tschopp 2003). In Komplex1

interagiert die intrazelluläre Todesdomäne von TNFR1 über TRADD mit TRAF2, RIPK1, cIAP-1 oder cIAP-2 und LUBAC (Kalliolias and Ivashkiv 2016). Durch die Ubiquitinierung von RIPK1 wird Komplex1 stabilisiert und die Bildung vom TAK1-Komplex und IKK-Komplex, die sich jeweils aus mehreren Proteinen zusammensetzen, eingeleitet (Brenner et al. 2015; Wajant and Scheurich 2011). Der TAK1-Komplex kann über die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwege, p38 und JNK schließlich den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren (Gough and Myles 2020), welcher die Expression von anti-apoptotischen Proteinen erhöht und somit die Prozesse des Zelltodes hemmt (Micheau and Tschopp 2003; Hsu *et al.* 1996; Chen *et al.* 2008; Mahoney *et al.* 2008). Nach der Bildung des IKK-Komplexes wird I κ B (engl.: NF- κ B inhibitor protein) phosphoryliert, welches im Normalzustand den Transkriptionsfaktor NF- κ B inhibiert, und löst sich in der Folge von NF- κ B (Mahoney *et al.* 2008). Somit wird NF- κ B aktiviert und weitere anti-apoptotische Prozesse ausgelöst. Für die Bildung von Komplex1 und die damit folgenden Signalwege ist eine vollständige Ubiquitinierung von RIPK1 essentiell (Li *et al.* 2006). Bei einer unvollständigen Ubiquitinierung von RIPK1 bildet sich nicht Komplex1, jedoch Komplex2, aus (Dostert *et al.* 2019). Hierbei löst sich RIPK1 von der Zellmembran und dem instabilen Komplex1 ab und bildet mit TRADD, FADD, FLIP_L und Procaspase8 Komplex2a (Dostert *et al.* 2019). Nachfolgend wird Procaspase8 zu Caspase8 umgewandelt und der Apoptose-Signalweg eingeleitet (Gough and Myles 2020). Komplex2b ist in seiner Zusammensetzung bis auf TRADD identisch zu Komplex2a und leitet ebenfalls über mehrere Schritte die Apoptose ein (Dostert *et al.* 2019). Bei dieser Form des kontrollierten Zelltodes schrumpft die Zelle, die Zellbestandteile zerfallen in sogenannte Apoptosekörper und werden ohne die Ausbildung einer Entzündung von Fresszellen phagozytiert (Elmore 2007). Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Nekroptose um einen unkontrollierten Zelltod, bei dem die Zelle anschwillt, die Zellmembran bedingt durch die Volumenzunahme zerstört wird und das austretende Zellmaterial eine Entzündungsreaktion auslöst (Vandenabeele *et al.* 2010; Newton and Manning 2016). Die Nekroptose wird durch Komplex2c eingeleitet, der sich bei einer unvollständigen Ubiquitinierung von RIPK1 und durch inhibierte oder fehlerhafte Caspasen aus RIPK1 und RIPK3 bildet (Li *et al.* 2012; Dostert *et al.* 2019). RIPK3 aktiviert die Phosphorylierung von MLKL, welches sich an die Zellmembran anlagert, diese zerstört und damit die Nekroptose einleitet (Cai *et al.* 2014).

Der TNF-Rezeptor 2, ein TNF-Rezeptor ohne intrazelluläre Todesdomäne, aktiviert über den p38 MAPKinase-, JNK-, PI3K/Akt-Signalweg und sowohl den kanonischen als auch den nicht kanonischen NF- κ B-Signalweg Geweberegeneration, Immunabwehr, Zellüberleben und Zellproliferation sowie Entzündungsreaktionen (Kallioulas and Ivashkiv 2016; Atretkhany *et al.* 2020). Nach Bindung von mTNF- α an den extrazellulären Bereich von TNFR2 bindet TRAF2 an die intrazelluläre Domäne des TNF-Rezeptors (Cabal-Hierro and Lazo 2012). Über TRAF2 können weitere Proteine, wie TRAF3/TRAF1, cIAP-1 und cIAP-2 gebunden werden (Rothe *et al.* 1994; Rothe *et al.* 1995). Nach erfolgter Komplexbildung bindet LUBAC an diesen und über die Rekrutierung des IKK- oder des TAK1-Komplexes wird letztlich der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (Borghi *et al.* 2018). Der nicht kanonische NF- κ B-Signalweg wird über NIK und die Phosphorylierung von p100 eingeleitet (Rauert *et al.* 2010). Eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion von TNFR2 ist der PI3K/Akt-Signalweg (Marchetti *et al.* 2004). Außerdem kann die Bindung von TNF- α an TNFR2 zwei unterschiedliche MAP-Kinase-Signalwege, den JNK- und den p38-abhängigen Signalweg, auslösen (Atretkhany *et al.* 2020).

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass durch TNFR2 der Zelltod ausgelöst werden kann, obwohl der Rezeptor keine intrazelluläre Todesdomäne besitzt und damit nicht in die Gruppe der Todesrezeptoren gehört (Depuydt *et al.* 2005). Diese Tatsache lässt eine intrazelluläre Kommunikation zwischen TNFR2 und TNFR1 vermuten. TRAF2 wird in den Signalwegen beider Rezeptoren benötigt und ist ein zentraler Bestandteil der Kommunikation zwischen den beiden TNF-Rezeptoren (Naudé *et al.* 2011; Wajant *et al.* 2001). Nach der Aktivierung von TNFR2 kann dieser den Abbau von TRAF2 induzieren und damit die Bildung von Komplex1 verhindern, sodass in der Folge der kanonische NF- κ B Signalweg von TNFR1 nicht eingeleitet werden kann und somit die Ausbildung von Komplex2a/b/c sowie der Zelltod induziert werden (Gough and Myles 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das TNF-/TNF-Rezeptoren-System ein sehr komplexes System ist und die Balance zwischen der zellulären Expression von TNFR1 und TNFR2 mitunter über Tod oder Überleben der Zelle entscheidet (Gough and Myles 2020).

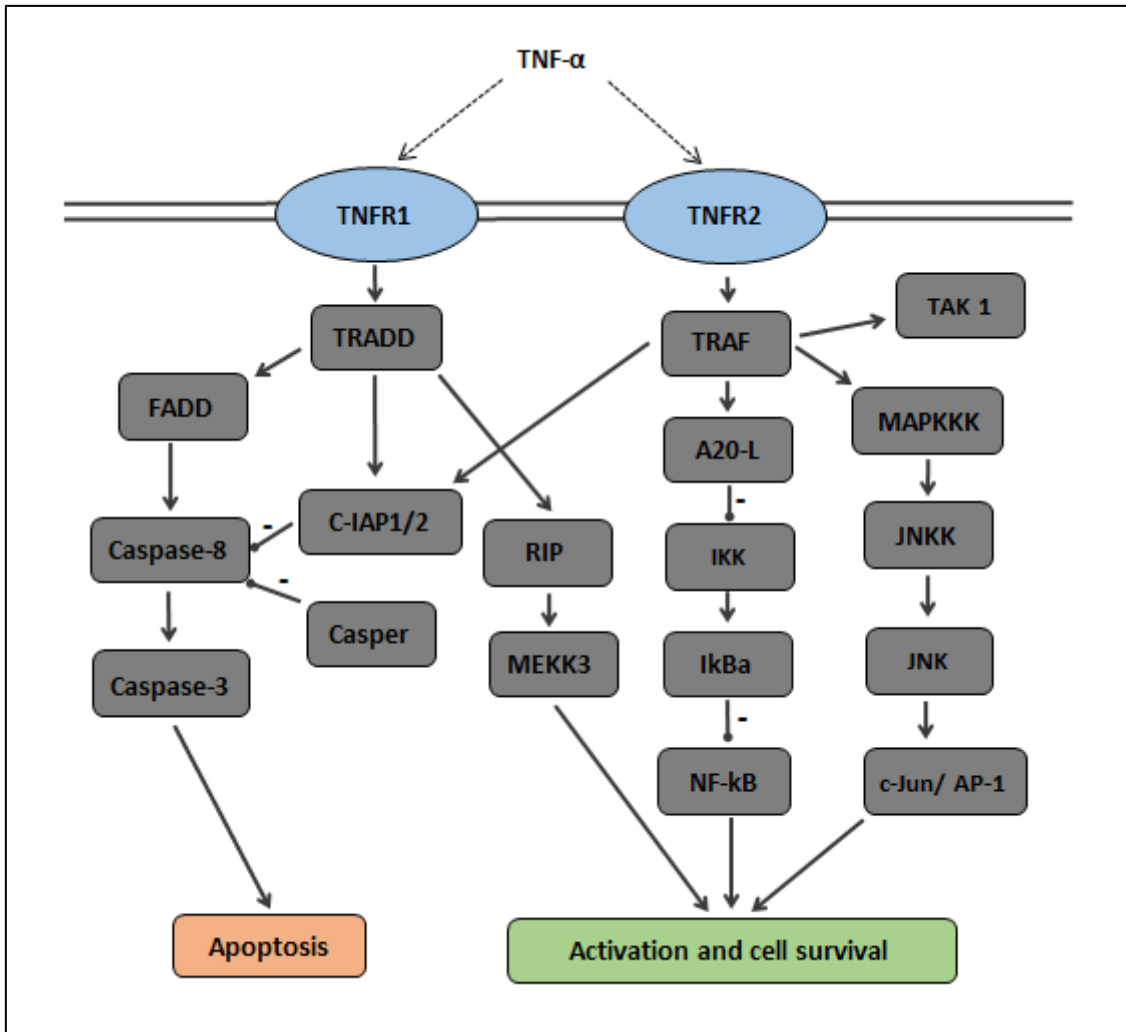


Abbildung 6: TNF- α Signalweg: TNFR1 interagiert über das Adaptermolekül TRADD mit verschiedenen Signalwegmitgliedern, die sowohl apoptotische als auch antiapoptotische Prozesse auslösen können. Bei einer Interaktion mit FADD wird eine Signalkaskade über verschiedene Caspasen aktiviert und apoptotische Prozesse eingeleitet. Zellproliferation und Zellaktivierung wiederum können über RIP und MEKK3 aktiviert werden. TNFR2 interagiert über das Adaptermolekül TRAF und aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1 über MAP3Ks, JNKK und JNK. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird über IKK und I κ Ba aktiviert. Beide Signalwege führen zur Aktivierung und Überleben der Zellen. Linien mit Pfeilspitze zeigen in der Abbildung die Stimulationskaskade; Linien mit runder Spitze und „-“, eine Kaskade der Inhibierung an.

4.3.5 p75^{NTR} und seine Signalwege

p75^{NTR} oder auch p75, TNFRSF16, CD271, low-affinity nerve growth factor receptor oder auch Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: nerve growth factor receptor) genannt, gehört ebenfalls in die TNF-Rezeptor-Superfamilie und stellt dennoch eine Besonderheit in dieser Superfamilie dar (Vilar 2017).

p75^{NTR} gehört zu den Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie und bildet im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie Homodimere, die durch die Bindung von Neutrophin-Homodimeren oder ihren Vorstufen aktiviert werden (Vilar 2017). Zu den Neutrophinen, welche nachweislich nicht mit den TNF-Liganden verwandt sind, gehören Neutrophin3, Neutrophin4, Wachstumsfaktor BDNF (engl.: brain-derived neurotrophic factor) und der Nervenwachstumsfaktor (NGF) (Vilar 2017). Zusätzlich kann p75^{NTR} mit den Neutrophinrezeptoren TrkA (Hempstead *et al.* 1991), TrkB (Bibel *et al.* 1999), TrkC, Sortilin (Nykjaer *et al.* 2004), dem Nogo-Rezeptor (Wang *et al.* 2002) und LINGO-1, welches eine Komponente des Nogo/p75^{NTR}-Komplexes ist (Mi *et al.* 2004) als Ko-Rezeptor interagieren (reviewed in Kraemer *et al.* 2014). Durch die unterschiedlichsten Liganden und Interaktionspartner kommt es zu einem sehr großen und vielseitigen Funktionsspektrum von p75^{NTR}, das von Zellüberleben bis hin zum Zelltod reicht und bis heute noch nicht vollständig verstanden ist (Becker *et al.* 2018). p75^{NTR} wird hauptsächlich von Nervenzellen während der frühen Entwicklung des Nervensystems aber auch im adulten Nervensystem exprimiert (Ernfors *et al.* 1991; Becker *et al.* 2018). Zu den Funktionen von p75^{NTR} gehören unter anderem die Beteiligung beim axonalen Wachstum (Yamashita *et al.* 1999), der Kontrolle des Zellzyklus (Vilar *et al.* 2006; Zanin *et al.* 2019) und der synaptischen Transmission sowie eine Beteiligung bei der funktionalen und strukturellen Plastizität der Zelle (Zagrebelsky *et al.* 2005; Wong *et al.* 2019; Rösch *et al.* 2005). Während der Entwicklungsphase des Nervensystems ist p75^{NTR} bei der Stärkung von Synapsen und der neuronalen Selektion beteiligt (Meeker and Williams 2015). Im adulten Nervensystem spielt p75^{NTR} in der Modifikation von hippocampaler Synapsen (Rösch *et al.* 2005) sowie in der Regulierung der Neurogenese eine wichtige Rolle (Bernabeu and Longo 2010; Meeker and Williams 2015). Des Weiteren konnte sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem ein starker Expressionsanstieg von p75^{NTR} nach einer Verletzung oder im Rahmen einer

Erkrankung nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Rolle von p75^{NTR} sowohl in der Regulation der Funktion des gesunden als auch des erkrankten Nervensystems (Meeker and Williams 2015). Nicht nur durch die verschiedenen Liganden und Ko-Rezeptoren, die p75^{NTR} bindet, sondern auch durch die unterschiedlichen Adaptermoleküle wird das Funktionsspektrum des Rezeptors erweitert. Durch die Bindung der Adaptermoleküle, wie zum Beispiel TRAF6 und RIP2, kann über mehrere Zwischenschritte der Transkriptionsfaktor NF-κB und damit anti-apoptotische Zellfunktionen und das Zellüberleben ausgelöst werden (Pathak and Carter 2017). Die Bindung von RhoGDI oder TRIO an die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} kann hingegen RhoA aktivieren und die Aktivität von Rac reduzieren, was zum Kollaps des Wachstumskegel oder der Retraktion von Neuriten führen kann (Pathak and Carter 2017). Über die Bindung von NRIF, NRAGE und TRAF6 ohne die Anwesenheit von RIP2, kann der JNK-Signalweg und hierdurch apoptotische Zellfunktionen induziert werden (Pathak and Carter 2017).

5 **Material & Methoden**

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Analysenwaage ABT 120-5DM	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
ChemiDoc MP Imaging System	BioRad, München, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank	
INCO246med	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
NuAire DHD Autoflow	NuAire, Plymouth, MN, USA
Heracell™ 240	Heraeus, Thermo Electron, Karlsruhe, Deutschland
Digitalkamera Altra 20	Olympus Life Science Europa, Hamburg, Deutschland
DNA-Gelelektrophoresekammer	BioRad, München, Deutschland
Dot Blot System MINIFOLD	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Heizblock DRI-BLOCK® Heater DB-3	Techne, Cambridge, United Kingdom
Kombischüttler KL2	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
Konfokalmikroskop Leica TCS SP5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge ROTINA 380R	Hettich GmbH & CoKG, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer RCT basic IKAMAG	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke	
MSC-Advantage (1.2)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
NuAire NU-437-400E	NuAire, Plymouth, MN, USA
Mikroskop Leica DM IRB	Leica, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop® ND-1000	PeqLab Biotechnologie, Erlange, Deutschland
Neubauer Zählkammer (0.1 mm)	Hartenstein Laborversand, Würzburg, Deutschland
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments GmbH, Mainz, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research	
(10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Protein-Gelelektrophoresekammer	
Mini-PROTEAN® II	BioRad, München, Deutschland
Real-Time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Sample Mixer DYNAL® MXIC1	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Schüttelinkubator	
TH-30	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
G24	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Spannungsgerät Powerpack P24 & P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	
TRIO Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
T Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler TI	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro200	Hettich GmbH& CoKG, Tuttlingen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator HTU SONI 130	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Vakuum-Pumpe Ilmvac	Ilmvac, Ilmenau, Deutschland
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

5.1.2 Verbrauchsmaterial

6-, 24-, 96-Well Platten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Dialyse-Schlauch ¾ in. Diameter	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Einmalspritzen, unsteril, 20ml SOFT-JECT®	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Nitrozellulose Membran	
Whatman® PROTRAN®	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Porablot NCP	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipettenspitzen	
(10µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5-2ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Real-Time-PCR	
MircoAmp® Fast 96-Well	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp® Optical 8Cap Strip	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
MicroAmp® Fast Reaction Tubes	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
Röhrchen, steril, 15 und 50ml	Greiner Bio-One, Nürtingen, Deutschland
Sterilfilter	
Acrodisc® mit Supor® Membran	PALL Corporation, Newquay Cornwall, United Kingdom
Nalgene® 0,2 µm Porengröße	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Whatman Chromatography Paper	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen 25, 75 und 175cm ²	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

5.1.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Enzyme

Hot FIRE Polymerase (5x)	Solis Biodyne, Tartu, Estland
KOD Hot Start DNA-Polymerase	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Pepsin	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Q5 High-Fidelity DANN Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
RNaseOUT™	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, Mannheim, Deutschland
SP6 Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
T7 Polymerase	New Englands Biolabs, Ipswich, USA
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom, Berlin, Deutschland

Chemikalien

Affi-Gel 15	BioRad, München, Deutschland
Agarose Ultra Pure	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Albumin Fraktion V pH7 (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Amidoblack 10B extra	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ampuwa (steriles pyrogen freies Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Antibiotika (Ampicillin, Carbenicillin, Chloramphenicol, Kanamycin)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Anti-digoxigenin, AP konjugiert	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Anti-digoxigenin, POD konjugiert	Roche, Basel, Schweiz
Bathocuproine disulfonic acid	Roche, Basel, Schweiz
	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland

β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Blocking reagent	Roche, Basel, Schweiz
CHAPS	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Chloroform Biochemica	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Coomassie® Brilliant Blue R250	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Denhardt-Lösung	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Diethyldicarbonat (DEPC)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
DIG RNA labeling mix 10x	Roche, Basel, Deutschland
dNTP lyophilised	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM GlutaMAX™	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Entellan®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ethanol ≥99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Fluoprep	Biomérieux, Nürtingen, Deutschland
Formamid	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Heparin	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
HOT FIREPol®EvaGreen® qPCR Mix (Rox)	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Imidazol	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
L-Cystein ≥97%	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Loading-Dye (6x)	BioLabs, Ipswich, USA
Maleinsäure	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Midori-Green	Nippon Genetics, Düren, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NBT-BCIP® Lösung	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
NHS-Fluorescein	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland

Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Oligonukleotide	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
PBS Dulbecco ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Pen-Strep (10U/μl)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Protein G Agarose, fast flow	Upstate/Merck, Darmstadt, Deutschland
Quick-Load-Ladder	BioLabs, Ipswich, USA
RNase-Exitus Plus	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel30 (37, 5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schafserum	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Saponin	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentec, Lüttich, Belgien
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) (rekombinant, murin)	PeptoTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Torula RNA	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Triethanolamin (TEA)	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Triethylamin	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Triton X 100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol® Reagent	Ambion, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin/EDTA (0,05%)	Sigma Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

5.1.4 Kits

Click-iT® Edu Alexa Fluor® 555 Imaging Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Direct-zol™ RNA Mini Prep	Zymo Research Europe, Freiburg, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
OmniScript RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Protino® Ni-IDA 1000 Packed Columns	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Select-a-size DNA Clean & Concentrator	Zymo Research Europe, Freiburg, Deutschland
SuperScript® IV Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

5.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Gen	GeneDB-Nummer	Primer	Sequenz	Experiment
Elp	EmuJ_000485800	Em10-15	5' AATAAGGTCAGGGTG- ACTAC 3'	RT-PCR
		Em10-16	5' TTGCTGGTAATCAGTC- GATC 3'	
Notum	EmuJ_000652800	F_000652800	5' CATTGACTCGGTGGC- GTC 3'	RT-PCR
		R_000652800	5' GTTCAGTTGATGAGGCT- GATGG 3'	
Follistatin	EmuJ_000278400	F_000278400	5' CTCGGGTATGTGGAAGTG- GAA 3'	RT-PCR
		R_000278400	5' GAGATTACTCGGCTGGA- CAATATC 3'	
TNF- Rezeptor (<i>emtnfr</i>)	EmuJ_000990500	F_000990500	5' AGCAGTATTCATGCACC- CTACAA 3'	RT-PCR
		R_000990500	5' CAATCCACCAACATCTT- TCCATCG 3'	
		F_000990500- kurz	5' GCTGAGAAGCCTTGTGAA- TGGA 3'	RT-PCR
		R_000990500- kurz	5' GTACAAAGCCGCATTTT GATCTG 3'	
		Dw-1	5' ATGCTGATTCTGCTTC- TGA 3'	Sequenzierung
		Up-1	5' TTAACGAAAAGAAATG- ACACCA 3'	
		Rev-1	5' GGCTTCAGGAGAAAT- TG 3'	
		Dw-2	5' GAAAACCTGTATTTTCA- GGGACATGCCCTTCAACA- ATCT 3'	Herstellung rekombinanter TNF-Rezeptor
		Rev-3	5' GAAATCAGTTTCTGTTC- TAGTTAGTGAATTCAGC- CTCTG 3'	
		si-TNFR	5' AUGUGUUUCAGGCUAC- UUCUUCA 3'	RNAi

		si-TNFR_as	5' UGAAGAAGUAGCCUG-AAACACAU 3'	
		TNF_rev3	5' CGTGGGAATTCAGCCTCT 3'	WMISH
		TNF_Fwd_2	5' CCCTTCAACAATCTCT-CAA 3'	
WMISH Proben-synthese	N/A	T7 Plus 2	5' AGAAGAGTAATACGACTC-ACTATAGG 3'	WMISH
	N/A	5-SP6+ pJET1.2.Rev-3	5' ATAATTTAGGTGACAC-TATAGAACATCGATTTTC-CATGGCAG 3'	
CloneJET 1.2	N/A	pJET forward	5' CGACTCACTATAGGGA-GAGCGGC 3'	Klontest-PCR
		pJET reverse	5' AAGAACATCGATTTTCCA-TGGCAG 3'	
pDrive	N/A	T7 forward	5' TAATACGACTCACTAT-AGGG 3'	Klontest-PCR
		T7 reverse	5' CTAGTTATTGCTCAGC-GGTGG 3'	

5.1.6 Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Wirt & Klonalität	Verdünnung (Experiment)	Hersteller
Anti-β-Actin	Hase, polyklonal	1:1000 (WB)	Cell-Signaling
Anti-Em10 (anti-II/3-10)	Monoklonal	1:1000 (WB)	(Felleisen and Gottstein 1993)
Anti-EmTNFR	Maus	1:50	Eigenherstellung
Alkalische Phosphatase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM	Ziege, polyklonal	1:1000 (WB)	Dianova GmbH
Anti-mouse IgG Horse Radish Peroxidase	Ziege, polyklonal	1:10000 (WB)	Jackson, ImmunoResearch
Anti-rabbit IgG Horse Radish Peroxidase	Ziege, polyklonal	1:5000 (WB)	Jackson, ImmunoResearch

5.2 Methoden

5.2.1 Arbeiten mit RNA

5.2.1.1 Isolierung von RNA

Bevor mit der eigentlichen RNA-Isolierung begonnen werden konnte, mussten zuerst die Proben und der Arbeitsplatz vorbereitet werden.

Probenvorbereitung: Die Proben zur RNA-Isolierung wurden aus Metazestoden- und Primärzellmaterial gewonnen. Hierfür wurde die gewünschte Menge an Metazestoden (abhängig von der Größe der MZ) oder Primärzellen vorsichtig in ein Reaktionsgefäß überführt, für eine Minute bei geringer G-Zahl (ca. 100 G) zentrifugiert, das Medium im Überstand mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Bei den Metazestodenproben wurden im Anschluss mit einer Pipettenspitze die Vesikel im Sediment zerstoßen, erneut mit geringer G-Zahl zentrifugiert, die überstehende Hydatiden-Flüssigkeit abpipettiert und ebenfalls verworfen. Dem gewonnenen Material wurde nun ca. 1 ml Trizol Reagent® hinzugefügt und bei -80 °C bis zur RNA-Isolierung aufbewahrt.

Arbeitsplatzvorbereitung: Bei der Isolierung von RNA war es sehr wichtig eine Kontamination des Arbeitsplatzes mit RNasen, die eine hydrolytische Spaltung von Ribonucleinsäuren katalysieren, zu vermeiden. Daher wurde sowohl die Arbeitsfläche als auch die verwendeten Pipetten mit RNase Exitus Plus und anschließend mit 70 % Ethanol behandelt. Außerdem wurden Puffer und Lösungen, die nur für Arbeiten mit RNA benutzt wurden, sterile Filterspitzen und RNase-freies Wasser verwendet.

Die Isolierung von RNA aus Echinokokken-Material wurde mit dem Direct-zol RNA Mini-Prep Kit von Zymo Research durchgeführt. Hierbei wurde nach dem Quick Protocol vorgegangen und der empfohlene Zwischenschritt zur DNase Behandlung ebenfalls durchgeführt. Während der RNA-Isolierung wurde jeweils für 30 Sekunden bei 12.000 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Am Ende erfolgte die Elution der isolierten RNA in ca. 25 µl DNase/RNase freies Wasser. Die eluierte RNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

5.2.1.2 Gel-Elektrophorese der RNA

Die Gel-Elektrophorese für RNA wurde prinzipiell identisch wie eine Gel-Elektrophorese für DNA (siehe Kapitel 5.2.2.4) durchgeführt. Hierbei wurde aber stets auf sehr saubere Bedingungen geachtet. Vor der Gel-Elektrophorese wurden Gelkammer, Gelschlitten und Kämme zur sorgfältigen Reinigung für 20 Minuten in 3 % H₂O₂ inkubiert. Ebenfalls sollte zur Vermeidung von Kontaminationen das Agarosegel (1 %) frisch angesetzt und neues 1xTAE als Laufpuffer verwendet werden.

5.2.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte genauso wie die Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe Kapitel 5.2.2.6). Vor der Messung der RNA-Konzentration musste jedoch am Spectrophotometer NanoDrop® ND-1000 das voreingestellte Programm für RNA-Messungen ausgewählt werden.

5.2.1.4 Herstellen von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurde die zuvor gewonnene RNA nach den Protokollen von Omniscript von Qiagen oder SuperScriptIV von Invitrogen aufgearbeitet.

Omniscript: Zuerst wurde die zuvor gewonnene RNA mit Wasser auf eine Konzentration von 600-1000 ng und ein Endvolumen von 12,5 µl verdünnt, für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix aus je 2 µl 10xPuffer, dNTP-Mix (5 mM) und Oligo(dT)primer (10 µM), 0.5 µl RNaseOut und 1 µl Reverse Transkriptase hergestellt. Dieser wurde zum RNA-Wassergemisch hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

SuperScriptIV: Die gewonnene RNA wurde mit nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 pg – 5 µg und ein Endvolumen von 11 µl verdünnt, mit 1 µl OligodT (50 µM) und 1 µl dNTP's gemischt, für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und wurde anschließend für mindestens 1 Minute auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsmix aus 4 µl 5xSSIV-Puffer, 1 µl 100mM DTT, 1 µl RNaseOut und 1 µl SuperScript IV Reverse Transkriptase hergestellt. Dieser wurde zum RNA-Gemisch

hinzugefügt und für 10 Minuten bei 50-55 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 80°C beendet. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

5.2.2 Arbeiten mit DNA

5.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von gewünschten DNA-Fragmenten, die 1983 vom amerikanischen Biochemiker Kary Banks Mullis erfunden wurde (Saiki *et al.* 1988) und heute weiterhin einen wichtigen Bestandteil der Laborarbeit darstellt. Bei der PCR wird mit Hilfe von spezifisch designten Primern ein gewünschter DNA-Abschnitt vervielfältigt. Jede Polymerase-Kettenreaktion besteht aus ca. 20-50 Zyklen, die jeweils aus drei Einzelschritten bestehen. Bei jedem Zyklus wird die Menge der zu amplifizierenden DNA verdoppelt.

In dieser Arbeit wurden beide Primer, die zu amplifizierende DNA, die thermostabile Polymerase, dNTP's und etwas Polymerase-Puffer in ein Reaktionsgefäß pipettiert (Schema siehe Tabelle 4), gemischt und in einen PCR-Thermocycler gestellt. Nun folgte der erste Schritt des PCR-Zyklus, die Denaturierung. Hierbei wurde die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf Temperaturen von ca. 94 °C aufgeschmolzen. Als Resultat waren zwei DNA-Einzelstränge entstanden. Im zweiten Schritt des PCR-Zyklus, dem Annealing, haben die sequenzspezifischen Primer an das gewünschte DNA-Fragment gebunden. Bei diesem Schritt war die Einhaltung der optimalen Annealing-Temperatur der eingesetzten Primer von essentieller Bedeutung. Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der Primer folgt im nächsten Abschnitt eine Beschreibung. Jeder Primer besaß ein freies 3'OH-Ende, das für die thermostabile Polymerase als Startpunkt der Synthese des neuen DNA-Strangs diente. Im dritten Schritt des PCR-Zyklus, der Elongation, begann die Polymerase vom Primer ausgehend den neu entstandenen DNA-Strang komplementär zum Template aus freien Nucleotiden zu bilden. Nach der Elongation hat ein neuer Zyklus begonnen bis nach der terminalen Elongation eine Pause folgte, in der das Reagenz auf eine Temperatur von 4 °C heruntergekühlt wurde. Die amplifizierte DNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. In dieser

Arbeit wurden sowohl die Taq-Polymerase als auch KOD und Q5-Polymerase für die PCR verwendet.

Tabelle 4: Pipettierschema für einen 20 µl PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase

Komponente	Volumen	Prozent
10x Puffer	2 µl	10 %
dNTP's (2,5 mM)	0,2 µl	1 %
Primer forward (50 µM)	0,2 µl	1 %
Primer reverse (50 µM)	0,2 µl	1 %
Template (Klonwasser, cDNA, Plasmid)	1-5 µl	5-25 %
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 %
Wasser	ad 20 µl	Rest

Tabelle 5: PCR-Programm mit Taq-Polymerase

Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	1 Min.	
Denaturierung	94 °C	30 Sek.	
Annealing	50-65 °C	30 Sek.	
Elongation	72 °C	1 Min./Kb	Schleife zu 2 (~ 30x)
Terminale Elongation	72 °C	3-5x t/Elongation	
Pause	4 °C	∞	

Bestimmung der Annealing-Temperatur: Die Annealing-Temperatur wurde an Hand der Häufigkeit der verschiedenen Nucleotide in der verwendeten Primersequenz

berechnet. Für die Nucleotide G & C wurden je 4 °C und für die Nucleotide A & T je 2 °C berechnet. Außerdem wurde meist auch vom Primerhersteller (z.B. SigmaAldrich) die optimale Annealing-Temperatur angegeben. Beim Designen der Primer wurde darauf geachtet, dass sich die Annealing-Temperatur der beiden Primer nicht zu sehr voneinander unterscheidet, da es sonst zu einer ineffizienten Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes kommen könnte.

5.2.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (kurz qPCR) ist eine Möglichkeit zur Amplifikation von cDNA-Proben und gleichzeitiger Quantifizierung in Echtzeit. Hierbei werden ähnlich wie bei der Polymerasen Kettenreaktion Nucleinsäuren amplifiziert und mit Hilfe von Fluoreszenz in Echtzeit detektiert.

In dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, welches an doppelsträngige DNA bindet. Die Fluoreszenzrate steigt proportional zum amplifizierten PCR-Produkt an. Um die cDNA- bzw. RNA-Expressionsunterschiede der einzelnen Proben zu untersuchen, wurde zur Standardisierung ein Housekeeping Gen verwendet, das in allen Zellstadien exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde das Housekeeping Gen Elp (H17g protein tegumental antigen) eingesetzt. Vor Beginn des Versuches wurden zunächst die genspezifischen Primer designet und auf Primerdimere sowie andere störende Bindungen mit dem OligoAnalyzer3.1 von IDT (Integrated DNA-Technologies) (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) untersucht. Des Weiteren erfolgten vor der eigentlichen qPCR sowohl ein Primertest zur Bestimmung der optimalen Temperatur und Effektivität als auch eine Gelelektrophorese zur Kontaminationskontrolle und Größenbestimmung des Produktes. Es wurden für einen 10 µl Ansatz je 0,6 µl Primer (5 µM, sowohl forward als auch reverse), 2 µl 5x HOT FIREPol®qPCR Mix (ROX), 5,8 µl destilliertes Wasser und 1 µl cDNA (1:5 verdünnt) verwendet. Die qPCR wurde mit dem StepOnePlus Real-Time PCR-System und folgendem Programm durchgeführt: 15 Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen (15 Sek. bei 95 °C, 20 Sek. bei 58 oder 60 °C, 20 Sek. bei 72 °C).

5.2.2.3 Klontest-PCR aus *Escherichia coli*

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung eines DNA-Fragments in *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte eine Klontest-PCR. Es wurden 50 µl H₂O in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Mit einer kleinen Pipettenspitze wurden nun einzelne *E. coli* Kolonien von den Medium-Platten gepickt und die Pipettenspitzen mitsamt der gewonnenen Bakterienkolonie in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gestellt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 Minuten auf den Schüttelinkubator gestellt. Hierbei haben sich die Bakterienaggregate von den Pipettenspitzen gelöst und sind in Lösung gegangen. Das Klonwasser wurde im Anschluss direkt für eine PCR verwendet oder für einige Tage im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Nach der Detektion von positiven Klonen in der PCR, wurden diese durch das Ausstreichen des Klonwassers auf Medium-Platten gesichert oder aber in einer Übernachtkultur weiterverwendet. Für einen 20 µl PCR-Ansatz wurde normalerweise 1 µl Klonwasser verwendet. Die Menge wurde jedoch bei sehr kleinen Bakterienkolonien bis auf 5 µl Klonwasser erhöht. Für die Klontest-PCR wurden die Primerpaare pJET1.2 forward & pJET1.2 reverse, T7 forward & rev-2 sowie T7 reverse & dw-2 verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Kapitel 5.1.5 aufgeführt. Das Pipettierschema (siehe Tabelle 4 in Kapitel 5.2.2.1) und das PCR-Programm (siehe Tabelle 5 in Kapitel 5.2.2.1) für eine Klontest-PCR entsprach den Schemata der normalen Polymerase-Kettenreaktion.

5.2.2.4 Gel-Elektrophorese von DNA

Die Gel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit von ihrer Größe eingesetzt. Das Gel wurde aus Agarose und 1xTAE Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8, 0,11 % Essigsäure, ad 1000 ml) hergestellt und in einen Gelschlitten gegossen. Um Taschen für die DNA-Proben im Gel herzustellen, wurde ein Plastikkamm in das noch flüssige Gel eingebracht und das Ganze bei Raumtemperatur ausgehärtet. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt und das Gel in eine Laufkammer, die mit 1xTAE Puffer gefüllt war, eingebracht. Je Probe wurden ca. 10 µl DNA mit 2 µl DNA Loading Dye (6x) und 1 µl Midori gemischt und jeweils in eine Tasche im Laufgel vorsichtig pipettiert. Als Marker wurde für die vorliegende Arbeit SmartLadder von Eurogentec verwendet. Zur Auftrennung der DNA wurde nun für circa

30 Minuten eine Spannung von 130 V angelegt und das Gel anschließend mit Hilfe des ChemiDoc MP-System entwickelt.

5.2.2.5 DNA-Aufreinigung aus Elektrophorese-Gelen

In dieser Arbeit wurde zur DNA-Aufreinigung aus Elektrophorese-Gelen das QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Nach der durchgeführten Gel-Elektrophorese wurden die DNA-Banden unter einem Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht, vorsichtig mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die nachfolgende Quantifizierung der DNA-Konzentration zu verbessern, wurde darauf geachtet die Größe des Gelstückes so klein wie möglich zu halten und überschüssiges Gel, welches keine DNA enthalten hat, zu entfernen. Anschließend wurde die Aufreinigung nach dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll weiter fortgeführt.

5.2.2.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die enthaltene DNA-Konzentration einer Probe wurde photometrisch mit dem Spectrophotometer NanoDrop® ND-1000 gemessen. Zur Messung wurden zuerst 2 µl eines Negativwertes (Medium, in dem die DNA gelöst war) und schließlich 2 µl der jeweiligen Probe auf das Photometer pipettiert. Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Um die Reinheit der Probe beurteilen zu können, wurde zudem das Verhältnis von 260/280 nm (Proteinverunreinigung) und von 260/230 nm (Salzverunreinigung) ermittelt.

5.2.2.7 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden 5 µl DNA/Wassergemisch mit einer DNA-Konzentration von 400 - 500 ng mit 5 µl Primer (5 µM) gemischt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und zur Sequenzierung in das Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg geschickt.

5.2.2.8 Klonierung mit Hot Fusion

Die Klonierung mit Hot Fusion ist eine einfache und effiziente Methode zur Klonierung von DNA-Fragmenten, welche auf der Publikation „Hot Fusion: An efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase“ (Fu *et al.* 2014) basiert. Bei diesem Klonierungsverfahren können einzelne oder mehrere DNA-Fragmente in einen linearen Vektor eingefügt werden. Die DNA-Fragmente müssen hierfür einen ca. 17-30 bp langen, zum Vektor komplementären, Überhang besitzen (Fu *et al.* 2014). Dieser Überhang wird von einer T5-Exonuclease vom 5'-Ende beginnend sowohl am Fragment als auch am Vektor wegverdaut. Hierdurch entstehen jeweils am Vektor und am DNA-Fragment komplementäre Einzelstränge, die sich aneinanderlegen können. Im nächsten Schritt werden noch bestehende Lücken durch die Phusion Polymerase vom 3'-Ende her geschlossen (Fu *et al.* 2014). Zur Herstellung der DNA-Fragmente mit Überhang wurde eine PCR mit dem gewünschten Gen und spezifisch designten Primern durchgeführt. In dieser Arbeit wurde pET151D als Vektor verwendet.

Primer-Design für pET151D Klonierung mit Hot Fusion:

Fw 5'-GAAAACCTGTATTTTCAGGGNXXX-gene-spezifisch-sense-3'

Rv 5'-GAAATCAGTTTCTGTTCTAGTTAYYY-gene-spezifisch-antisense-3'

TTA= Stopcodon

N= beliebige Base

XXX= erste Codon des DNA-Fragmentes

YYY= letzte Codon des DNA-Fragmentes

Für die Klonierung wurden 1 µl 0,01 pmol mit EcoR1 vorverdauter Vektor (pET151D) und 1 µl 0,03 pmol DNA-Fragment mit 3 µl Wasser verdünnt und zu 5 µl 2x Hot Fusion Mix hinzugefügt. Das Gemisch wurde gut resuspendiert, für 1 Stunde bei 50 °C inkubiert und bis zur Transformation auf Eis gelagert. Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 5.2.4.3 beschrieben.

5.2.2.9 Übernachtkultur & Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Anlage einer Übernachtkultur wurden 4 ml LB-Medium mit 4 µl Carbenicillin oder 4 µl Ampicillin in ein Glasröhrchen pipettiert. Es wurden ca. 4 µl Klonwasser dem Medium hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkultur in 2 ml Eppis pipettiert und für 30 Sekunden bei 11.000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nur das Pellet weiterverarbeitet. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das DNA-Purification Set „NucleoSpin Plasmid“ der Firm Macherey-Nagel verwendet und nach dem Protokoll „Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*“ vorgegangen.

5.2.3 Arbeiten mit Proteinen

5.2.3.1 Gel-Elektrophorese mit Proteinen

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt eine einfache Methode dar, um Proteingemische ihrer Molekülgröße nach aufzutrennen. Hierbei enthält das Polyacrylamid-Gel zwei verschiedene Geltypen, das Sammel- und das Trenngel. Das Sammelgel besitzt einen neutralen pH-Wert und konzentriert die Proben. Das Trenngel hingegen ist von basischem pH-Wert und trennt die einzelnen Proteine ihrer Molekülgröße nach auf. Durch den Wechsel des pH-Wertes innerhalb des Gels von neutral auf basisch kommt es zu einem Stapelungseffekt der Proben an der Gelgrenze.

Bei dieser Art von Auftrennungsverfahren gilt es zu beachten, dass die Konzentration des Trenngels umso geringer sein sollte, je größer die Molekülgröße (MG) der aufzutrennenden Proteine ist.

Für die vorliegende Arbeit wurden in den meisten Fällen 12,5 %-ige Gele verwendet.

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Arbeitslösungen

Arbeitslösung	Zusammensetzung
30 % PAA-Lösung	30 % Polyacrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid
4x Lower Tris (für Trenngel)	1,5 M TrisHCL, pH 8,8, 0,4 % SDS
4x Upper Tris (für Sammelgel)	0,5 M TrisHCL, pH 6,8, 0,4 % SDS
TEMED	Tetramethylethylendiamin
10 % APS	0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H ₂ O gelöst
Elektrophorese Puffer	25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS
2xStop Mix	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 (10 ml), Glycerol (4 ml), 20 % SDS (4 ml), β -Mercaptoethanol (2 ml), einen winzigen Krümel Bromphenolblau

Für das Sammelgel wurden 1,5 ml 30 %-ige PAA-Lösung, 2,5 ml 4x Upper Tris, 6,5 ml H₂O gut gemischt. Anschließend wurde die Polymerisation durch Hinzugabe von 40 µl TEMED und 70 µl 10 %-ige APS gestartet. Das Gel wurde für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele

Trenngel	5 %	7 %	10 %	12 %	15 %	17,5 %
30 %PAA-Lösung	4 ml	6 ml	8 ml	10 ml	12 ml	14 ml
4x Lower Tris	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml
H ₂ O	14 ml	12 ml	10 ml	8 ml	6 ml	4 ml

Die Polymerisation erfolgte dann durch Zugabe von 40 µl TEMED und 120 µl 10 % APS (30 Minuten bei RT).

Arbeitsablauf: Im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen und mit Isobuthanol gesättigtem Wasser überschichtet, um eine Ausfransung des Gels durch Radikale in der Luft zu verhindern. Nach einer halben Stunde Wartezeit wurde das Isobuthanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein 10/15er Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Nachdem das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde es in die MINI Protean Gelelektrophoresekammer eingespannt, mit Elektrophorsepuffer übergossen und der Kamm für die Geltaschen entfernt. Bevor die Proben in die Geltaschen pipettiert wurden, wurden sie mit 2xStop-Mix für 10 Minuten bei 95 °C gekocht und anschließend bei maximaler G-Zahl für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Gel bei 150 Volt für circa 1 Stunde elektrophoriert.

5.2.3.2 Coomassie-Färbung eines Protein-Gels

Nach abgeschlossener Elektrophorese eines PAA-Protein-Gels konnten die Proteinbanden mit einer Coomassie-Färbelösung (1 g Coomassie Brilliant Blue R250, 450 ml Methanol, 450 ml H₂O, 100 ml Eisessig) im Gel sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das Gel für 10-20 Minuten in die Färbelösung gelegt und leicht geschüttelt. Um

die Proteinbanden im Gel noch deutlicher sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend für einige Minuten in H₂O in der Mikrowelle gekocht und somit entfärbt.

5.2.3.3 Proteinnachweis mit Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots konnten Proteinbanden von elektrophorierten PAA-Gelen auf eine Membran übertragen werden und dort mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Das elektrophorierte PAA-Gel wurde auf ein, zuvor mit Western Blot Puffer (3,06 g Tris, 14,4 g Glycin, ad. 800 ml H₂O, + 200 ml Methanol) befeuchtetes Whatman-Papier gelegt und mit einer ebenfalls befeuchteten Nitrocellulose-Membran (Blot-Membran) bedeckt. Diese wurde wiederum mit einem Whatman-Papier bedeckt und danach in die Blottingapparatur eingespannt. Hierbei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen PAA-Gel und Nitrocellulose gebildet hatten, da sonst die Proteinbanden nicht sauber übertragen werden konnten. Die Apparatur wurde in eine MINI Protean Blottingkammer eingespannt und mit Blotting Puffer übergossen. Es wurde nun für eine Stunde bei einer Stromstärke von 350 mA geblottet.

Nach dem Blotten konnten die Proteinbanden mit einer Ponceau-Färbung (0,2 % Ponceau S, 3 % TCA, in H₂O) sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde die Nitrocellulose-Membran für einige Minuten in die angesetzte Ponceau-Lösung gelegt. Die Färbung konnte durch mehrmaliges Waschen mit TBST oder PBS rückgängig gemacht werden.

Bevor die Proteinbanden mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden konnten, musste die Membran für eine Stunde in 5-prozentiger Magermilch (TBST + 5 % Magermilchpulver) geblockt werden. Anschließend wurde der erste Antikörper (proteinspezifischer Antikörper) mit TBST verdünnt und mit der Membran bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Eine weitere mögliche Methode war die Blot-Membran mitsamt der Antikörperlösung luftblasenfrei in einer kleinen Plastiktüte einzuschweißen. Hierdurch konnte vor allem die notwendige Menge an Antikörperlösung deutlich reduziert werden. Am nächsten Tag wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet, für 1-2 Stunden inkubiert. Der zweite Antikörper wurde zuvor ebenfalls mit TBST auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Nach abgeschlossener Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Blot-Membran erneut dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen. Der anschließende Nachweis der Proteine erfolgte über POX (engl.: horseradish peroxidase) oder alkalische Phosphatase, je nachdem was an den zweiten Antikörper gekoppelt war.

Alkalische Phosphatase: Zum Nachweis der Proteinbanden mit alkalischer Phosphatase wurde die Nitrocellulose-Membran in einem Gemisch aus NBT-BCIP und alkalische Phosphatase-Puffer so lange (bis zu 20 Minuten) inkubiert bis die Banden deutlich sichtbar geworden waren.

POX: Zum Nachweis der Proteinbanden mit POX wurde die Nitrocellulose-Membran auf eine Glasplatte gelegt und mit 2 ml ECL Western Blotting Substrat für 30 Sekunden überschichtet. Anschließend wurden die Banden durch Chemolumineszenz im ChemiDoc MP Imaging System sichtbar gemacht.

5.2.3.4 Quantitativer Western Blot

Der quantitative Western Blot ermöglicht es nicht nur gewünschte Proteine in einer Probe zu identifizieren, sondern auch deren Menge zu quantifizieren und Expressionsunterschiede der Proteine in verschiedenen Proben nachzuweisen.

Die Gel-Elektrophorese und der Proteinnachweis im Western Blot wurden auch beim quantitativen Western Blot wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben durchgeführt. Im Vorfeld wurde jedoch die optimale Menge an Protein, die bei der Gel-Elektrophorese aufgetragen werden sollte, bestimmt. Grund hierfür war die Tatsache, dass bei einer optimalen Probenmenge die Intensität der Proteinbande proportional zur aufgetragenen Probenmenge steigt (Pillai-Kastoori et al. 2020). Dieser Ideal-Bereich wurde mittels Verdünnungsreihe, die auf das Proteingel aufgetragen wurde, ermittelt. Nachdem nun die optimale Probenmenge festgestellt wurde, musste im nächsten Schritt eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben mit Hilfe von Pierce BCA Protein Assay Kit, wie in Kapitel 5.2.3.11 beschrieben, erfolgen. Anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentration der Proben und der optimalen Proteinmenge für den Western Blot konnte nun die aufzutragende Menge jeder einzelnen Probe berechnet werden. Auch bei den verwendeten Antikörpern wurde vor dem eigentlichen Versuch die optimale Verdünnung, welche die Proteinbande gut sichtbar gemacht hat, bestimmt. Wenn diese

Schritte alle erfolgt waren, konnte der eigentliche quantitative Western Blot durchgeführt werden. Hierbei wurde zur Normalisierung immer eine interne Kontrolle mitgeführt. Diese konnte ein sogenanntes Housekeeping-Protein, ein Protein, das sich in seiner Expression in den verschiedenen Proben nicht unterscheidet, oder das zelluläre Gesamtprotein sein (Pillai-Kastoori et al. 2020). In dieser Arbeit standen für die Proben des Fuchsbandwurmes zwei Housekeeping-Proteine, ELP (engl.: H17g protein tegumental antigen) und Actin, zur Verfügung. In den Vorversuchen hatte sich jedoch gezeigt, dass die Western Blots mit ELP eine bessere Bandenqualität als bei der Verwendung von Actin aufweisen. Daher wurde in den folgenden quantitativen Western Blots ELP als interne Kontrolle verwendet. Die spezifischen Banden des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie und des Housekeeping-Proteins ELP wurden mit Hilfe von POX im ChemiDoc MP Imaging System nachgewiesen. Der fertige Western Blot wurde mittels der Image Lab Software von Bio-Rad analysiert und die Menge des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie in jeder Probe bestimmt.

5.2.3.5 Proteinaufreinigung

Zur Aufreinigung von Proteinen wurde das Kit „Protino Ni-IDA 1000 Packed Columns“ von Macherey Nagel verwendet. Die *E. coli* Pellets, die zuvor aus Induktions-Übernachtskulturen gewonnen worden sind, wurden in 1xLEW-Puffer (Lysis-Equilibration-Wash Buffer) aufgenommen, auf Eis gekühlt und vorsichtig mit Ultraschall verflüssigt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung abpipettiert. Die Zell-Pellets wurden bei -20 °C eingefroren. Der Überstand, welcher die hergestellten Proteine enthielt, wurde nach dem Protokoll „Purification of polyhistidine-tagged proteins from *E. coli* under denaturing conditions“ weiterbearbeitet. Am Ende wurde die Elution des aufgereinigten Proteins mit zunächst 2x 500 µl und anschließend 2x 1 ml denaturierenden Elutionspuffer durchgeführt. Zwischen den einzelnen Elutionsschritten wurde jeweils eine Wartezeit von 5 Minuten eingehalten. Zur Bestimmung der Elution mit der höchsten Proteinmenge wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt und die Proteinbanden mit Hilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Anhand der Bandendicke konnte die Proteinmenge ungefähr abgeschätzt werden.

5.2.3.6 Herstellung von Antikörpern gegen rekombinanten TNF-Rezeptor

In dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen einen zuvor rekombinant hergestellten Tumornekrosfaktor-Rezeptor (TNFR) in Mäusen hergestellt. Hierfür wurde der extrazelluläre Bereich des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* (EmTNFR) mittels PCR amplifiziert, in einen Vektor kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert. In einer Flüssigkultur wurde durch die Hinzugabe von spezifischen Induktoren die Proteinexpression des rekombinanten TNF-Rezeptors induziert. Die Bakteriensuspension wurde wie in Kapitel 5.2.3.5 aufgereinigt, das aufgereinigte Protein in Elutionspuffer aufgenommen und im Verhältnis 10:1 mit Saponin (50 µg/µl) verdünnt. Durch die Ergänzung von Saponin zur Proteinlösung konnte, wie in früheren Veröffentlichungen aus dem Bereich der Immunologie (Campbell and Peerbaye 1992; White et al. 1991) beschrieben, die Immunantwort des beimpften Wirtes verstärkt und somit die Antikörperproduktion verbessert werden. Je 100 µl dieser Lösung wurden in eine Spritze aufgenommen und dreimal in einem Abstand von je zwei Wochen den Mäusen injiziert. In diesem Versuch wurden 2 Mäuse zur Herstellung der Antikörper und eine Maus als Negativkontrolle verwendet. Vor jeder Injektion und zwei Wochen nach der letzten Injektion der Proteinlösung wurden den Mäusen ca. 8 Tropfen Blut retrobulbär entnommen. Das Blut wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und für 3 Minuten bei 3.000 G zentrifugiert. Durch die Zentrifugation haben sich drei Schichten im Reaktionsgefäß ausgebildet. Erythrozyten am Boden des Reaktionsgefäßes, darüber Leukozyten und Thrombozyten als Buffy coat (eine dünne weiße Schicht) und ganz oben das Plasma mit den löslichen Komponenten des Blutes. Das Plasma, das die Antikörper enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert und bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert. Die hergestellten polyklonalen Antikörper gegen EmTNFR werden in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit α -EmTNFR genannt.

5.2.3.7 Antikörperaufreinigung

In dieser Arbeit wurden die wie in Kapitel 5.2.3.6 hergestellten Antikörper mittels Protein G Agarose von Upstate/Merck aufgereinigt. Zu Beginn wurden 2 ml Protein G Agarose in ein Reaktionsgefäß pipettiert, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Es folgte das mehrmalige Waschen mit dem Bindungs-Puffer (0,1 M Natriumphosphat pH 8). Nun wurden 150 µl Maus-Serum, das die gewünschten Antikörper enthielt, mit 800 µl Bindungspuffer verdünnt, in das Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 Minuten bei 4 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Serum entfernt und die Protein G Agarose mit den gebundenen Antikörpern mehrmals mit dem Bindungspuffer gereinigt. Zuletzt wurden die Antikörper durch das mehrmalige Hinzugeben von 1 ml Glycin (0,2 M; pH 2,5) eluiert. Zur Neutralisation (pH-Wert 5) wurden zu jedem Eluat 40 µl HEPES (0,5 M) hinzugefügt. Laut Hersteller ist die Neutralisation mittels 1 M Tris empfohlen, dies war jedoch bei der Weiterverwendung der Antikörper in einem Versuch mit Affi Gel 15 nicht möglich. Daher wurde die Neutralisation mit HEPES durchgeführt.

5.2.3.8 Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie können gewünschte Analyte (Proteine bzw. Antikörper) aus einer Lösung verschiedener Stoffe chromatographisch aufgetrennt werden. Hierbei wird ein für den Analyten spezifischer Ligand kovalent an eine feste Matrix gekoppelt. Anschließend wird die Matrix mit der Lösung, die den gewünschten Analyten enthält, inkubiert. Über eine spezifische Liganden-Analyten-Bindung wird der Analyt aus der Lösung entfernt und bindet an die Matrix. Nach ausgiebigem Waschen kann schließlich der Analyt durch Auftrennen der spezifischen Liganden-Analyt-Bindung von der Matrix gelöst und eluiert werden.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Versuche mittels Affinitätschromatographie durchgeführt.

Elution von polyklonalen α -EmTNFR aus Maus-Serum: Zur Elution von polyklonalen Antikörpern gegen das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* aus dem aufgereinigten Maus-Serum wurde Affi-Gel 15 von BioRad verwendet und nach dem Protokoll für wässrige Bedingungen vorgegangen. Zu Beginn wurden je

1 ml Affi Gel 15 in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mehrmals mit kaltem deionisiertem Wasser gewaschen. Da bei dieser und der folgenden Arbeit kein Büchner Trichter, sondern 2 ml Reaktionsgefäße verwendet wurden, wurde der Überstand stets mit einer blauen Pipette mit aufgesetzter gelber Spitze abgesogen (CAVE: keine Agarosekügelchen mit abpipettieren). Pro Milliliter Affi Gel 15 wurden mindestens 0,5 ml Proteinlösung (in diesem Versuch der rekombinante TNF-Rezeptor) in das Reaktionsgefäß hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Drehen inkubiert. Danach wurde die Matrix mit 4 M Urea + 1 M Ethanolamin-HCl blockiert, mehrmals mit 1x PBS + 0,1 % Tween20 gewaschen und mit 1x PBS + 0,1 % Tween20 + 3 % BSA nochmals für eine halbe Stunde blockiert. Nun wurde das mit PBS/BSA verdünnte und aufgereinigte Maus-Serum zur Matrix pipettiert und über Nacht bei 4 °C unter ständigem Drehen inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 100 mM Glycin + 0,05 % Tween20 (pH 2,9) eluiert. Der saure pH-Wert war von entscheidender Rolle, da die spezifische Liganden-Analyt-Bindung sonst nicht gelöst werden konnte.

Isolation eines löslichen Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* aus Kulturmedium: Zur Isolation eines möglichen löslichen Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* (Analyt) wurden die hergestellten polyklonalen Antikörper (Ligand) kovalent an Affi Gel 15 gebunden und mit Kulturmedium aus der MZ-Zellkultur inkubiert. Der lösliche TNF-Rezeptor konnte über den Liganden an Affi Gel 15 binden und somit aus dem Kulturmedium extrahiert werden. Nach mehreren Waschschritten wurde der lösliche TNF-Rezeptor durch das Lösen der Liganden-Analyt-Bindung eluiert. Das Kulturmedium wurde zuvor über mehrere Wochen beim Mediumswechsel der MZ-Kultur gesammelt und im Gefrierschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung des Kulturmediums wurde dieses bei Zimmertemperatur langsam aufgetaut und anschließend steril filtriert. Auch in diesem Versuch wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll für wässrige Bedingungen und wie im oberen Abschnitt beschrieben vorgegangen. Nach der Elution wurde eine Proteinfällung nach Wessel-Flügge, siehe Kapitel 5.2.3.9, und anschließend ein Western Blot, siehe Kapitel 5.2.3.3, durchgeführt.

5.2.3.9 Proteinfällung nach Wessel-Flügge

Zur Fällung und Konzentrierung von Proteinen für die SDS-Gelelektrophorese wurde die Methode nach Wessel-Flügge eingesetzt (Wessel and Flügge 1984). Hierbei wurde zu einem Teil Proteinlösung ein Teil Methanol hinzugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde $\frac{1}{4}$ -Teil Chloroform hinzugefügt, gut gemischt und für 5 Minuten bei 12.000 G zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren im Reaktionsgefäß zwei Phasen erkennbar. Zwischen den Phasen befand sich die Interphase, in der sich die ausgefällten Proteine befanden. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert, 500 μ l Methanol zum Rest hinzugegeben und für 3 Minuten bei 12.000 G zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich am Boden des Reaktionsgefäßes das ausgefällte Protein als Pellet abgesetzt. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet getrocknet und danach in 2x StopMix aufgenommen.

5.2.3.10 Dialyse

Die Dialyse ist ein simples Verfahren, um ungewünschte Salze/Reagenzien aus einer Proteinlösung zu entfernen.

Hierfür wurde in dieser Arbeit die Proteinlösung in einen semipermeablen Dialyseschlauch gefüllt. Dieser wurde an beiden Enden gut verschlossen und über Nacht gegen den Dialysepuffer (1.000 bis 10.000-faches Volumen der Probe) dialysiert. Aufgrund des osmotischen Gradienten sind die ungewünschten Reagenzien über die semipermeable Membran aus der Proteinlösung in den Puffer gewandert. In dieser Arbeit wurde die Dialyse zur Elimination von Glycin aus der Antikörperlösung nach der Aufreinigung mit Protein G Agarose verwendet. Außerdem wurde die Dialyse zur Verringerung der Urea-Konzentration in der Elutionslösung nach der Aufreinigung des rekombinanten TNF-Rezeptors verwendet.

5.2.3.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Pierce BCA Protein Assay Kit: Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet. Die Proben wurden 1:5 und 1:10 verdünnt und je 10 µl in eine Mikrowell-Platte pipettiert. Gleichzeitig wurden je 10 µl der BSA-Verdünnungen und eine Negativkontrolle aufgetragen. In jedes Mikrowell wurden 200 µl Working Reagent (Gemisch aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm gemessen und die Absorption der Negativkontrolle sowohl von der Absorption der BSA-Standards als auch von der Absorption der Proben subtrahiert. Nach Erstellung einer Standardkurve anhand der Absorption der BSA-Standards gegenüber der Proteinkonzentrationen konnten in jeder einzelnen Probe die Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

Amido Black Staining: Eine weitere Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen ist das Amido Black Staining. Diese Methode war deutlich zeitaufwendiger, konnte aber auch angewandt werden, wenn die Proteinlösung Störsubstanzen wie z.B. Glycerol oder SDS enthielt. Für diese Methode wurden 250 µl Probe, mit einem Proteingehalt von 1-10 µg, benötigt. Diese wurde mit 30 µl 1 M TRIS-HCl und anschließend mit 70 µl 50 % TCA vermengt und für 2 Minuten bei RT inkubiert. Nun wurden Filterpapier und Nitrocellulose in 5 % TCA-Lösung eingeweicht und in einem Schleicher & Schuell Dot Blot System eingespannt. In jedes Well wurden 400 µl 5 % TCA-Lösung gefüllt und durch einen Vakuumpzug durch das Filterpapier und die Nitrocellulose abgesaugt. Danach konnten die Proben in die Wells pipettiert und ebenfalls mit Vakuum abgesaugt werden. Die Proteine sollten auf der Nitrocellulose kleben bleiben. Nach einem erneuten Waschschrift mit 400 µl 5 % TCA-Lösung wurde die Nitrocellulose aus der Apparatur entnommen und für 2 Minuten in 0,1 % Amidoblack-Färbelösung (MeOH: Hac: H₂O = 45: 10: 45) inkubiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und mit MeOH: Hac:H₂O = 270: 6: 24-Lösung dreimal für je eine Minute entfärbt. Aus der getrockneten Nitrocellulose wurden die Dots einzeln ausgeschnitten und in 2 ml Reaktionsgefäße mit je 200 µl Elutionslösung (25 mM NaOH,

50 μ M EDTA, 50 % EtOH) für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration bei 620 nm.

5.2.3.12 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die Fluoreszenzmarkierung ist eine einfache Methode zur Markierung von Proteinen oder auch Antikörpern mit einem Fluoreszenzfarbstoff, um die zum Antikörper spezifischen Oberflächenantigene in Flüssigkeiten, Geweben oder Zellen detektieren zu können. Im Folgenden wird eine Methode zur Antikörpermarkierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) beschrieben.

Zuerst wurde die Antikörperlösung mit PBS auf eine Konzentration von 800 μ g/ml und ein Endvolumen von 2 ml verdünnt. FITC wurde mit DMSO auf 3 μ g/ μ l verdünnt, in je 2 μ l Schritten bis zu einem Gesamtvolumen von 80 μ l langsam zum Antikörper pipettiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Hierbei war darauf zu achten, dass der pH-Wert konstant bei 9 gehalten wurde. Anschließend wurde das Gemisch in ein Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht bei 4 °C gegen PBS mit 1 % Glycerin (pH 7,2) dialysiert. Am nächsten Tag wurde das Dialysat 1:1 mit sterilem Glycerin verdünnt und bei -20 °C gelagert.

5.2.4 Arbeiten mit *E. coli*

5.2.4.1 Verwendete *E. coli* Stämme

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten *E. coli* Stämme

Stamm	Hersteller	Genotyp
BL21DE3	NEB	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hsdS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ nin5
Rossetta DE3	Novagen	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)
SHuffle T7	NEB	F' lac, pro, lacIq / Δ (ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ (phoA)PvuII phoR ahpC* galE (or U) galK λ att::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) Δ trxB rpsL150(StrR) Δ gor Δ (malF)3
SHuffle T7 rare	Im Haus	SHuffle T7 + pRARE
TOP10	Invitrogen	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

5.2.4.2 Verwendete Medien

LB Medium (Luria-Bertani): 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl in 1000 ml Wasser lösen, pH bei 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren

SOC-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,25 M KCl, 5 ml 2 M MgCl₂, 20 ml 1 M Glucose in 1000 ml Wasser lösen, pH bei 7 mit NaOH einstellen und autoklavieren.

Je nach Antibiotika-Resistenz des Plasmides wurden bei der Verwendung von LB-Medium Antibiotika, wie zum Beispiel Ampicillin (100 μ g/ml), Carbenicillin (100 μ g/ml) oder Chloramphenicol (75 μ g/ml), hinzugefügt.

5.2.4.3 Transformation

Zur Transformation mit TOP10 Zellen wurde 1 µl des Klonierungsansatzes mit Hot Fusion verwendet. Bei BL21 Zellen wurden bis zu 5 µl verwendet. Der Klonierungsansatz wurde auf Eis heruntergekühlt und vorsichtig in auf Eis auftauende Bakterienstämme untergerührt (nicht resuspendiert). Der gesamte Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis, für 40 Sekunden in einem Heizblock mit 42 °C und anschließend nochmals für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurden ca. 200 µl SOC-Medium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Carbenicillin (50 µg/ml), je nach Antibiotika-Resistenz des Plasmides, plattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag konnten die gewachsenen Klone gepickt und mit einer Klontest-PCR beurteilt werden.

5.2.4.4 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* ermöglichte es, große Mengen eines gewünschten Proteins herzustellen. Zuvor ist mittels PCR das gewünschte Gen amplifiziert worden, in einen entsprechenden Vektor kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert worden. Nach der Bestätigung einer erfolgreichen Transformation mittels Klontest-PCR konnte die Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli* begonnen werden.

Hierfür wurde in dieser Arbeit zunächst flüssiges Kulturmedium mit einem Antibiotikum, entsprechend der Antibiotika-Resistenz des Plasmides, angesetzt. Mit einer Pipettenspitze wurde von der positiv getesteten *E. coli*-Kolonie ein kleiner Teil entnommen und in das Flüssigmedium überführt. Dies wurde über Nacht bei 37 °C und unter ständiger Bewegung inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Induktion der Expression des gewünschten Proteins. Die Induktion war von dem verwendeten Expressionssystem abhängig. In dieser Arbeit wurde sowohl IPTG (1 M) als auch T7 Autoinduktionszucker und Autoinduktionsmedium verwendet. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Kultur über Nacht bei 37 °C unter ständiger Bewegung. Anschließend wurde das Flüssigmedium in Reaktionsgefäße gefüllt, bei 4.000 G für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Die entstandenen Pellets wurden, wie in Kapitel 5.2.3.5 beschrieben, aufgereinigt und weiterverarbeitet.

5.2.5 Arbeiten mit *E. multilocularis*

5.2.5.1 Verwendete Medien

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l) GlutaMAX (GIBCO)
Komplettes DMEM	DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin G + 100 U/ml Streptomycin (=PenStrep 1000 U/ml, Biochrom KG)
cDMEM (=A7)	Steril filtrierter Überstand von Reuber H35 Kultur (1×10^6 Zellen in 50 ml kompl. DMEM für 7 d in 75 cm ² Flasche, vor Verwendung β -Mercaptoethanol 1:100000, 10 μ M batho- cuproine disulfonic acid und 100 μ M L-cystein hinzugefügt

5.2.5.2 Verwendete Isolate

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Isolate

Isolat	Jahr der Isolation	Originalwirt	Verwendung
DDD16	2016	Macaca fascicularis	Isolierung von Protoskolices
GH09	2009	Macaca mulatta	MZ & PZ-Versuche, EmTNFR-Lokalisation
H95	1995	Vulpes vulpes	EmTNFR-Lokalisation
Ingrid	2010	Macaca fascicularis	EmTNFR-Lokalisation
J2012	2012	Macaca fascicularis	MZ & PZ-Versuche, EmTNFR-Lokalisation
MS1010	2010	Canis familiaris	MZ & PZ-Versuche

MZ= Metazestoden; PZ=Primärzellen

5.2.5.3 *In vivo* Kultursystem & Isolierung von Metazestoden-Material

Das *in vivo* Kultursystem ermöglicht es verschiedene *E. multilocularis* Isolate, die von an der AE erkrankten Affen, Hunden und auch Menschen stammen, über Jahre hinweg am Leben zu halten, sie zu vermehren und an ihnen zu forschen (Spiliotis and Brehm 2009). Hierfür wurden zwischen 0,2 und 0,8 ml bearbeitetes Metazestoden-Material mit einer dünnen Kanüle in den Peritonealraum von mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*, Gerbil) gespritzt. Nach 2-3 Monaten war durch das Wachstum des Metazestoden-Materials eine Bauchumfangszunahme bei den Mäusen zu erkennen. Nun wurden die Gerbils mit CO₂ getötet und das Metazestoden-Material unter sterilen Bedingungen entnommen. Hierbei war darauf zu achten, dass bei der Entnahme des Materials der Magen-Darmtrakt des Gerbils nicht verletzt wurde, um mögliche Kontaminationen mit Bakterien zu verhindern. Das entnommene Material wurde in kleine Stücke geschnitten, durch ein feines Teesieb passiert, mindestens dreimal mit 1x PBS

gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 1x PBS mit 20 µg/ml Levofloxacin inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Metazestoden-Material dreimal mit 1x PBS gewaschen. Es wurde nun in die *in vitro* Kultur überführt oder in der *in vivo* Kultur weiterverwendet, in dem es erneut in den Peritonealraum einer mongolischen Rennmaus injiziert wurde.

5.2.5.4 *In vitro* Kultivierung von *E. multilocularis*

Im *in vitro* Kultursystem wachsen und entwickeln sich die MZ in Flüssigmedium und in Anwesenheit von Fütterzellen, wie zum Beispiel RH⁻-Zellen (Rattenhepatozyten) (Spiliotis *et al.* 2004).

Hierfür wurde 1 ml Metazestoden-Material, das zuvor aus einem Gerbil entnommen und über Nacht mit PBS und Antibiotikum inkubiert war, mit circa 50 ml komplettem DMEM und circa 10⁶ frisch trypsinisierten RH⁻-Zellen (Rattenhepatozyten, ATC No. CRL-1600) in eine T-75 Kulturflasche überführt und bei 37 °C in einem Brutschrank mit einem CO₂ Gehalt von 5 % kultiviert. Dabei kam es zu einer Adhäsion der Fütterzellen am Boden der Zellkulturflasche und die MZ, die als blasenartige Strukturen zu erkennen waren, sind frei im Medium geschwommen. Der Wechsel von Medium und Fütterzellen erfolgte wöchentlich. Hierbei wurde das alte Medium mit einer Glaspipette und einer Saugpumpe vorsichtig aus der Kulturflasche abgesaugt und durch 50 ml neues Medium ersetzt. Außerdem wurden neue RH⁻-Zellen in die Flasche pipettiert. Wenn in einer Zellkulturflasche mehr als 20 ml MZ enthalten waren, wurden diese entweder in eine größere Kulturflasche mit 150 ml Medium überführt oder auf zwei kleine Flaschen aufgeteilt. Bei einem Vesikel-Durchmesser von ca. 3-5 mm konnten diese gut für Versuche verwendet werden.

5.2.5.5 Axenische Kultursystem

Das axenische Kultursystem, in dem die MZ ohne Fütterzellen wachsen, ermöglicht es Versuche am Echinokokken-Material ohne den störenden Einfluss von Fütterzellen durchzuführen (Spiliotis and Brehm 2009). Durch die Abwesenheit der Fütterzellen konnte gewährleistet werden, dass die gemessenen Effekte ausschließlich durch den Einfluss auf das Echinokokken-Material entstanden sind. Allerdings benötigten die Vesikel zum Überleben bestimmte Stoffe, die von den Fütterzellen in das Flüssigmedium

abgegeben wurden. Daher wurde in dieser Arbeit in der axenischen Kultur als Medium cDMEM verwendet, das zuvor eine Woche mit RH⁻-Fütterzellen inkubiert war und somit die von den Fütterzellen abgegebenen Stoffe enthielt. Zusätzlich waren für das Überleben der Vesikel in der axenischen Kultur reduzierende Bedingungen, die durch die Zugabe von 10 µM Bathocuproinedisulfonic-Acid, 100 µM L-Cystein und 0,01 % β-Mercaptoethanol und durch den Austausch der Gasphase mit Stickstoff erreicht wurden, notwendig. Um möglichst keine RH⁻-Zellen mit in die axenische Kultur zu überführen, wurden die Vesikel mehrmals mit PBS gewaschen, für 3 Minuten in sterilem Wasser inkubiert, nochmals ausgiebig mit PBS gewaschen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Nach einigen Tagen unter axenischen Bedingungen konnten die MZ für Versuche, wie zum Beispiel Wachstumsfaktorenversuche, oder die Herstellung von Primärzellen verwendet werden.

5.2.5.6 Behandlungsversuche mit Metazestoden-Material

Behandlungsversuche haben die Untersuchung von Einflüssen verschiedener löslicher Faktoren, wie zum Beispiel Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, auf das Wachstum und die Differenzierung von MZ in der *in vitro* Kultur ermöglicht. Um störende Einflüsse der Fütterzellen auf die Versuche zu verhindern, wurden Behandlungsversuche stets in der axenischen Kultur und unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Bevor der eigentliche Versuch begonnen werden konnte, wurden die MZ, wie in Kapitel 5.2.5.5 beschrieben, in das axenische Kultursystem überführt. Nachdem die Vesikel für einige Tage in der axenischen Kultur inkubiert waren, wurden sie nun mehrmals mit 1x PBS gewaschen. Hierbei wurden orangefarbene Vesikel, also verletzte oder tote Vesikel, vorsichtig mit einer 10 ml Stabpipette entfernt und verworfen. Die restlichen Vesikel wurden in 1x PBS mit etwas DMEM gegeben und nun in der gewünschten Anzahl mit einer Stabpipette vorsichtig in Wellplatten, 50 ml Plastikröhrchen oder kleine Kulturflaschen pipettiert. Die Vesikel wurden unter einem Lichtmikroskop betrachtet und notfalls schlecht aussehende Vesikel (nicht ganz runde Vesikel; trübe Vesikel; Vesikel mit Tochtervesikeln oder mit Einschlüssen) entfernt. Das PBS-/DMEM-Gemisch wurde aus den Gefäßen abpipettiert und durch cDMEM mit reduzierenden Reagenzien und den zu untersuchenden Faktoren in gewünschter Konzentration ersetzt. Die Gasphase wurde durch Stickstoff ausgetauscht und der Versuchsansatz in einem Brutschrank bei 37 °C

und 5 % CO₂ gelagert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, neue Faktoren hinzugegeben und die Entwicklung der Vesikel unter dem Lichtmikroskop beurteilt und dokumentiert. Zu gewünschten Zeitpunkten konnten einzelne Vesikel als Probe entnommen und für Untersuchungen von Expression oder Transkription verwendet werden.

5.2.5.7 Lokalisation von EmTNFR in MZ

Auf der Publikation „a rapid and convenient method for Fluorescence Analysis of In Vitro Cultivated Metacystode Vesicles from *Echinococcus multilocularis*“ basierend wird ein Versuch zur Lokalisation von EmTNFR in MZ durchgeführt (Cheng, Liu, *et al.* 2015). Zu Beginn wurden die Objektträger, auf denen später die Vesikel fixiert wurden, mit Ethanol gereinigt, für 5 Minuten in 0,01 % Poly-L-Lysin-Lösung inkubiert und anschließend bei RT über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag konnten die gewünschten Vesikel aus der *in vitro* Kultur entnommen, in eine 12-Well-Platte überführt und dort zweimal mit 1x PBS gewaschen werden. Nun wurden 1-5 Vesikel (je nach Größe) auf einen poly-lysinieren Objektträger pipettiert, das übrige PBS mit Whatman-Papier abgesaugt und die Vesikel vorsichtig mit einer Kanüle aufgestochen. Die ausgetretene Hydatidenflüssigkeit wurde ebenfalls mit Whatman-Papier entfernt und die Vesikel mit 50 µl 4 % PFA bedeckt. Ein 2. Objektträger wurde vorsichtig und möglichst ohne den Einschluss von Luftblasen auf die Vesikel gelegt und für 15-30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger ohne sie gegeneinander zu verschieben für 10 Minuten auf Trockeneis schockgefrostet und für 15-20 Sekunden bei RT inkubiert. Nun wurden die Objektträger auf die lange Kante gestellt, vorsichtig festgehalten und mit einer sauberen Skalpellklinge voneinander getrennt. Hierbei sollten die Vesikel so durchtrennt werden, dass auf jedem Objektträger je eine Hälfte des Vesikel mit glatten Rändern haftet und die späteren Antikörper oder Marker direkt an die Germinalschicht der Vesikel binden könnten. Die Vesikelhälften wurden zur Fixierung zuerst in 100 % Ethanol und dann in 70 % Ethanol inkubiert und wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger mit den Vesikelhälften für je 10 Minuten in 100 %, 75 %, 50 % und 25 % Ethanol inkubiert und anschließend dreimal

in 1x PBS gewaschen. Nun folgte eine 30-minütige Blockierung mit 1x PBS+5 % Schafserum + 0,5 % TritonX100 und drei weitere Waschschr tte mit 1x PBS für je 10 Minuten. Um eine geringere Menge an Antikörpern verwenden zu können, wurde mit einem Fettstift (PAP pen for immunostaining) ein Kreis um die Vesikel gezogen. Der in 1x PBS + 1 % BSA + 0,5 % TritonX100 verdünnte 1. Antikörper (α -EmTNFR) wurde nun in den Kreis pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vesikel erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für mindestens 2 Stunden mit dem 2. Antikörper inkubiert. In dieser Arbeit wurde als 2. Antikörper α -mouse Alkalische Phosphatase (1:1000 verdünnt) verwendet. Zum Entwickeln wurde nach einem erneuten Waschschr tt mit 1x PBS ein Gemisch aus alkalische Phosphatase Puffer und NBT-BCIP für ca. 30 Minuten auf die Vesikel pipettiert. Nun konnten die Vesikel unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden. Ein zusätzlicher Schr tt war das Gegenfärben mit Hoechst (1:2000 verdünnt). Hierdurch wurde die DNA in den Zellen angefärbt. Zuletzt erfolgte ein weiterer Waschschr tt mit 1xPBS. Die fertigen Vesikelhälften wurden in Entellan® eingebettet und konnten so im Kühlschrank für einige Wochen aufbewahrt werden.

5.2.5.8 Isolierung & Kultivierung von *E. multilocularis* Primärzellen

Für die Prim rzellisolierung wurden ca. 2-3 Monate alte Vesikel aus der *in vitro* Kultur verwendet und vor der Isolierung für einige Tage in das axenische Kultursystem überführt. Die Isolierung der PZ erfolgte nach der Publikation von Uriel Koziol (Koziol *et al.* 2014), die einige Verbesserungen zur ursprünglichen Publikation (Spiliotis and Brehm 2009) enthielt.

5.2.5.9 Behandlungsversuche mit Primärzellen

Behandlungsversuche mit Primärzellen haben die Untersuchung möglicher Einflüsse verschiedener löslicher Faktoren auf die Entwicklung und das Wachstum von PZ ermöglicht. Ähnlich wie bei den Behandlungsversuchen mit MZ (siehe Kapitel 5.2.5.6) wurden PZ-Versuche ebenfalls unter axenischen (A7-Medium) und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die zu untersuchenden Faktoren, wie zum Beispiel TNF- α , wurden in den gewünschten Konzentrationen in das Medium pipettiert und alle zwei bis

drei Tage beim Mediumswechsel erneuert. Veränderungen im Aussehen der PZ und die Ausbildung von Vesikeln wurden unter dem Lichtmikroskop regelmäßig beurteilt und fotodokumentiert. Proben zur Untersuchung von Veränderungen im Expressions- oder Transkriptionsprofil der PZ wurden zu den gewünschten Zeitpunkten entnommen. Die PZ-Versuche wurden in der Regel über einen Zeitraum von drei Wochen durchgeführt.

Für die statistische Analyse der Ergebnisse aus den Behandlungsversuchen mit PZ wurden mit dem Programm GraphPadPrism7 für Windows (GraphPad Software by Dotmatics, San Diego, California, USA) verwendet. Es wurde ein Ordinary one-way ANOVA-Test mit einem multiplen Vergleichstest Dunnett-Test für alle Zeitpunkte zum Vergleich der Behandlungsgruppen (Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α) mit der Kontrollgruppe durchgeführt.

5.2.5.10 siRNA Knockdown von *emtnfr*

Zur genaueren Untersuchung der Funktion und Auswirkung von *emtnfr* in der Entwicklung und im Wachstum von Primärzellen wurde ein Genknockdown mit Hilfe von RNA-Interferenz nach dem Protokoll von (Spiliotis *et al.* 2010) durchgeführt. Hierbei wurde eine doppelsträngige zum Zielgen komplementäre RNA-Sonde designet und durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Die RNA-Sonde hatte an die Ziel-mRNA gebunden, diese in mehrere Bruchstücke gespalten und somit das Gen ausgeschaltet, obwohl es immer noch transkribiert wurde. Die hierfür notwendige siRNA wurde anhand der Gensequenz und mit Hilfe von Stealth RNAi siRNA im BLOCK-iT RNAi Designer von ThermoFischer Scientific (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>) designet. Zur Verbesserung der Effizienz und zur Verhinderung von Fehlbindungen an andere mRNA wurden die allgemeinen Designregel von (Ui-Tei and Saigo 2004), (Reynolds *et al.* 2004) und (Amarzguioui and Prydz 2004) auf der Internetseite <http://sidirect2.rnai.jp/> beachtet. Die fertig designete siRNA wurde bei Sigma Aldrich bestellt und in 100 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert. Als Arbeitshilfe wurde zusätzlich zu dem Protokoll von (Spiliotis *et al.* 2010) das in Kapitel 5.2.5.10.1 aufgeführte Protokoll verwendet. Um gleiche Bedingungen für die Primärzellen mit RNAi und die Negativkontrolle herzustellen, wurden beide Ansätze elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in filtriertem A7-Medium resuspendiert, je 100 μ l in

eine 96-Wellplatte pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank inkubiert. An Tag 2 wurden pro Well 100 µl frisches A7-Medium hinzugefügt. An Tag 3 wurden Proben für eine qPCR entnommen, 100 µl altes Medium abpipettiert und Neues hinzugefügt. Um Effekte von TNF- α auf die Entwicklung und das Wachstum der PZ untersuchen zu können, wurde sowohl ein Teil der Zellen aus der Negativkontrolle als auch aus den RNAi Zellen ab Tag 3 mit TNF- α in gewünschter Konzentration behandelt. Hierfür wurde dem Medium bei jedem Mediumswechsel 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α hinzugefügt. Veränderungen im Aussehen und der Entwicklung der Primärzellen wurden mit einem Lichtmikroskop über einen Zeitraum von circa 3 Wochen beobachtet und fotodokumentiert. Des Weiteren wurden in regelmäßigen Abständen neu ausgebildete Vesikel gezählt.

Zur Auswertung des Versuches wurden die an Tag 12 aufgenommenen Bilder der einzelnen Versuchsgruppen mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (Schindelin et al. 2012) bearbeitet. Hier wurde der Durchmesser der Kavitäten ermittelt und für jedes einzelne Bild bzw. die einzelnen Versuchsgruppen und ihre Replikate ein Mittelwert des Durchmessers der Kavitäten berechnet. Für die statistische Analyse der Ergebnisse aus den siRNA-Versuchen mit PZ wurde mit dem Programm GraphPadPrism7 für Windows (GraphPad Software by Dotmatics, San Diego, California, USA) und den zuvor ermittelten Mittelwerten der Durchmesser der Kavitäten verwendet. Es wurde ein ungepaarter T-Test sowohl zwischen der Gruppe „siRNA with tnf“ und der Gruppe „control with tnf“ als auch zwischen der Gruppe „siRNA“ und der Gruppe „control“ durchgeführt.

5.2.5.10.1 siRNA Protokoll

Das folgende Protokoll wurde von Raphaël Duvoisin, PhD-Student und ehemaliger Mitarbeiter der AG Brehm, verfasst und von mir ins Deutsche übersetzt.

Tag -1: Primärzellisolation

Isoliere Primärzellen nach dem normalen Protokoll. Filter die Zellen durch einen 40 µm Filter bevor die Messung der OD600 durchgeführt wird. Das gewährleistet, dass Zellklumpen aus der Kultur entfernt werden. Dies hilft bei der Bildung von kleinen in der Größe homogenen Aggregaten. Verteile jeweils 500 Units Primärzellen in circa 2,5 ml

A7 Medium (mit oder ohne reduzierende Reagenzien) in eine 6-Wellplatte und stelle diese über Nacht in den Inkubator bei 37 °C.

Tag 0: Elektroporations-Tag

Schaue am Morgen nach deinen Zellen. Abhängig von verschiedenen Faktoren (gutes oder schlechtes Isolat, Alter der MZ, Alter des Isolates, etc.) werden die Zellen Aggregate gebildet haben. Diese lösen sich voneinander schon allein durch den Transport zum Mikroskop. Wenn man noch keine kleinen Aggregate unter dem Mikroskop sieht (dann sind die Zellen mehr oder weniger noch einzelne Zellen), dann bedeutet das, dass deine Zellkultur ein bisschen langsam ist oder dass es ein Problem mit deinen Zellen gibt (in meiner Erfahrung, ist es manchmal nicht wert die Elektroporation durchzuführen, da die Zellen wahrscheinlich die Elektroporation nicht überleben). Man kann versuchen noch weitere 4 Stunden zu warten und erneut einen Blick auf die Zellen zu werfen um zu schauen ob sie besser aussehen. Wenn dies nicht der Fall ist, dann wiederhole die Primärzellisolation. Auf der anderen Seite, kann es manchmal sein, dass die Zellen bereits große Aggregate gebildet haben. In diesem Fall kann man normal fortfahren.

Resuspendiere die Zellen zweimal mit einer 10ml Pipette und der Ausübung von ein bisschen Druck. Dies wird alle möglichen übriggebliebenen Zellschichten entfernen und kleine Aggregate bilden. Füge dann 2 Wells zusammen, sodass ungefähr 1.000 Units in circa 5ml sind. Lege diese für 3 Stunden erneut in den Inkubator. Markus hat erwähnt, dass dies eine gute Möglichkeit ist zur Bildung von kleinen Aggregaten, die in der Größe homogen sind und der Elektroporation standhalten (schaue dir für mehr Informationen sein Paper „*Echinococcus multilocularis* primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference“ an).

Als nächstes sammle die Aggregate vorsichtig mit einer 10 ml Pipette ein und gebe sie in einen Falcon Reagenzglas. Zentrifugiere dies für 2 Minuten bei 80 G und verwerfe den Überstand, der Trümmer und freischwimmende Zellen enthalten kann. Resuspendiere das Pellet in A7 Medium (ich versuche in der Regel eine Konzentration von 1 Unit/ μ l beizubehalten, daher verwende ich 1 ml für 1.000 Units. Wenn du mit sehr vielen Zellen arbeitest, dann denke an das Volumen des Pellets. Jetzt sind die Zellen bereit zur Elektroporation und können so wie sie jetzt sind für einige Stunden aufbewahrt werden,

falls man zu viele Zellen zu elektroporieren hat und man zwei oder drei Elektroporations-Serien durchführen muss.

Was ich an dieser Stelle gerne mache: Direkt nach dem die Zellen resuspendiert wurden und die Aggregate homogen verteilt sein sollten, pipettiere ich diese in 2 ml Eppis, eines für jede Probe (z.B., wenn man 400 Units für die Negativkontrolle und 400 Units für die siRNA elektroporieren möchte, dann pipettiert man 400 µl der Aggregate in zwei verschiedene Eppis.) Die Aggregate können auch gut einige Stunden in Eppis gelagert werden.

Da nun die Zellen fast fertig für die Elektroporation sind, kann man die Werkbank vorbereiten. Eine Sache sollte man auf jeden Fall im Kopf behalten, sobald man das Medium entfernt und durch Elektroporationspuffer ersetzt, hat man ein Zeitfenster von 30 Minuten zur Elektroporation und zum erneuten Wechsel des Elektroporationspuffer durch Medium. Falls dies länger dauern sollte, und das passiert manchmal, werden die Zellen nicht mögen und möglicherweise sterben. Daher empfehle ich, dass alles vorbereitet und bereit ist bevor man den Elektroporationspuffer zu den Zellen gibt. Außerdem ist es empfohlen die Elektroporationen in kleine Serien, die kürzer als 30 Minuten dauern, zu unterteilen. Es hilft auch die Elektroporation zu zweit durchzuführen, das beschleunigt den Prozess ungemein und ermöglicht es mehr Elektroporationen durchzuführen.

Bringe den Elektroporator zur Werkbank. Reinige den Elektroporator und die Kabel und stecke den Elektroporator in die Steckdose (kontrolliere, dass der Strom in der Werkbank an ist).

Man benötigt außerdem:

- 2 ml Eppis
- 2 transparente Racks, die sich für 2 ml Eppis eignen
- So viele 1 mm Küvetten wie benötigt
- Die gleiche Anzahl an Einmal-Plastik-Pipetten
- Elektroporationspuffer (EB)

- PBS
- Tauge deine siRNA auf und bewahre sie im Kühlschrank oder auf Eis auf

Die Aggregate werden in 1mm Küvetten elektroporiert, 50 Units pro Elektroporation, in 90 µl siEB (Mix aus EB und siRNA). Folglich muss man ein bisschen EB in 2 ml Eppis pipettieren. Zum Beispiel: Man benötigt 400 Units für eine Probe. Das bedeutet, dass man 8 x 50 Units elektroporiert, also benötigt man $8 \times 90 = 720$ µl siEB. Wobei das das perfekte Volumen nach dem Zusammenführen von siRNA, EB und Zellen ist. Wenn die Pellets klein sind, dann empfehle ich das Volumen zu ignorieren, das gibt ein bisschen die Möglichkeit zur Kompensation des Verlustes von Volumen durch das Pipettieren. Für jede elektroporierten 50 Units, werden 2 µl siRNA benutzt. In unserem Fall bedeutet das $8 \times 2 = 16$ µl siRNA, also pipettiere $720 - 16 = 704$ µl EB in die 2 ml Tubes. Ich warte in der Regel bis zum letzten Moment um die siRNA hinzuzugeben, aber wahrscheinlich kann man sie auch jetzt schon hinzufügen.

Beschrifte alle Küvetten und organisiere deinen Arbeitsplatz um einen reibungsfreien Ablauf der Elektroporation zu gewähren. (Ich benenne meine Küvetten gerne A, B, C, D... und ordne meine Eppis alle in der gleichen Reihenfolge.) Man sollte drei Reihen an Eppis haben, eine mit den Zellen, eine mit EB und eine dritte Reihe mit leeren Eppis und den Einmal-Plastik-Pipetten (hier kommen die elektroporierten Zellen rein). Da in der Regel ein Rack mit all den Eppis sehr voll wird, sollte man die letzte Reihe in ein zweites Rack stellen.

Nach der Vorbereitung der Eppis, wird nun der Elektroporator vorbereitet. Schalte den Elektroporator an, verwende „Time constant protocols“. Gebe nun ein: Voltage: 200 V, Cuvette: 1 mm, TC (time constant): 0,6 msec.

Jetzt kommt der Zeitpunkt nochmals nachzudenken ob man die Elektroporation durchführt oder nicht. Alles sollte nun klar sein. Wenn die Eppis vorbereitet, die Küvetten beschriftet, die Maschine angeschaltet und EB vorbereitet sind, kann man mit dem Waschen der Zellen starten.

Zuerst füge 1 Volume von PBS zu den Aggregaten und zentrifugiere für 1 Minute bei 100 G. Währenddessen pipettiere ich in der Regel die siRNA zu den EB Eppis. Für die Kontrollgruppe pipettiere ich in der Regel PBS anstelle von siRNA zu EB. Entferne nach

der Zentrifugation den Überstand und resuspendiere die Aggregate in PBS/EB (50 % PBS und 50 % EB). Zentrifugiere erneut für 1 Minute bei 100 G.

Informiere nun deine Hilfsperson, dass du gleich zur Elektroporation bereit bist.

Resuspendiere die Aggregate vorsichtig in siEB und homogenisiere sie. Wenn das letzte Pellet resuspendiert ist, kann mit der Elektroporation gestartet werden. Pipettiere vorsichtig 90 µl der homogenisierten Aggregate in die 1mm Küvette. Schmeiße die Pipettenspitze noch nicht weg. Zum Zeitsparen kannst du die Pipettenspitze im offenen 2 ml Eppi mit den Zellen belassen und wieder verwenden. Das verhindert auch den Verlust von Aggregaten, die eventuell noch an der Pipettenspitze kleben. Mache dir nicht die Mühe, die Kappe auf die Küvette zu machen, aber dann solltest du sehr sauber arbeiten. Platziere die Küvette im Elektroporator. Schließe die Klappe und drücke auf den roten Knopf. Es sollte ein BIP-Geräusch ertönen und dann ein TCHACK, das den Schock widerspiegelt. Falls etwas schief läuft, bzw. eine Fehlermeldung auf dem Gerät auftaucht, dauert es ein bisschen bis der Schock ausgelöst werden kann. Es sollte aber eine Information auf dem Gerät erscheinen. Daher ist es sinnvoll auf die Anzeige zu achten. Die angezeigten Werte sollten für alle Proben gleich sein. Es sollten 200 V und eine TC zwischen 0,6 und 0,7 msec angezeigt werden. Schalte eine Stoppuhr an um zu sehen wie lange du bis zur Beendigung der letzten Elektroporation benötigst.

Jetzt sind deine Zellen elektroporiert. Die Aggregate setzen sich meist sehr schnell am Boden der Küvetten ab und das Einsammeln ist dadurch erschwert. Also sollte man schnell sein. Verwende die Einmal-Plastik-Pipette und transferiere die Zellen vorsichtig in die Eppis. Verwende die Plastikpipette mehrmals und lasse sie im Eppi. Führe diesen Vorgang so lange durch bis alle Zellen elektroporiert sind.

Im Originalprotokoll von Markus wird eine Inkubationszeit von genau 12 Minuten bei 37°C im Inkubator direkt nachdem alle Zellen elektroporiert worden sind empfohlen. Da ich immer sehr viele Zellen elektroporiere, verkürze ich die Zeit in der Regel, damit die Zellen nicht zu lange im EB sind. Wenn ich das 30 Minuten Limit bereits überschritten habe, lasse ich die Zellen nur 2-3 Minuten bei 37 °C im Inkubator.

Am Ende werden die Aggregate in den Eppis für 1 Minute bei 100 G zentrifugiert und die Pellets in A7 Medium resuspendiert. Wie man die Aggregate nun in die Wells verteilt,

hängt vom Experiment ab. Bei der Wiederholung eines Experimentes verwende ich in der Regel eine andere Art der Kultivierung um sicher zu gehen, dass der beobachtete Phenotyp nicht von der Anzahl der Zellen pro Well abhängt. Aber in der Regel kultiviere ich 100 Units in 96-Well-Platten oder 200 Units in 48-Well-Platten.

Tag 1: Kontrolle der Zellen

Schaue dir deine Zellen unter dem Mikroskop an. Die Zellen können sehr schlecht aussehen, aber mache dir nicht zu große Sorgen, sie können auch wieder Aggregate bilden. Manchmal ist das Medium schon verbraucht, dann erneuere ich es. In der Regel ist es noch zu früh um einen Phenotyp zu erkennen.

Tag 2-3: Sammle Proben für die quantitative Echtzeit-PCR

Ich sammle in der Regel am dritten Tag nach der Elektroporation Zellen zur Kontrolle meines Genes und zur Kontrolle des Knock-downs. Manchmal ist der Knock-down nur an Tag 2 zu sehen.

Kultiviere deine Zellen nun weiter und kontrolliere regelmäßig den Phenotyp.

5.2.5.11 Isolierung des löslichen EmTNFR aus Zellkulturüberständen

Die lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* sollte mit den hergestellten polyklonalen Antikörpern α -EmTNFR aus dem Medium der MZ-Kultur isoliert werden. Vor dem eigentlichen Versuch wurde, wie in Kapitel 5.2.3.8 beschrieben, das Maus-Serum mittels Protein G aufgereinigt und anschließend das Eluat nach dem Protokoll des Herstellers kovalent an Affi Gel 15 gebunden. Über mehrere Wochen wurde das Medium aus der MZ-Kultur gesammelt, im Gefrierschrank gelagert und vor der Verwendung langsam bei RT aufgetaut und steril filtriert. Das vorbereitete Affi-Gel 15 mit den kovalent gebundenen Antikörpern wurde mit dem steril filtrierten Kulturmedium über Nacht bei 4 °C und leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium von Affi-Gel entfernt und der lösliche Rezeptor eluiert. Hierfür wurden 1 ml 100 mM Glycin + 0,05 % Tween 20 (pH 2,9) auf die Affi-Gelkügelchen gegeben, für einige Minuten unter Schütteln inkubiert und anschließend abpipettiert. Dieser Vorgang wurde ca. zehnmal wiederholt. Die Elutionen wurden in einem Western

Blot zum Nachweis einer löslichen Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis* weiterverwendet.

5.2.5.12 EdU Labeling von MZ und EdU-Detektion

5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) ist ein Thyminanalogon und kann während der Replikationsphase ohne die Notwendigkeit einer Denaturierung von der DNA-Polymerase in die DNA eingebaut werden. Durch die Hinzugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes kann die DNA-Synthese und damit proliferierende Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Salic and Mitchison 2008).

In dieser Arbeit wurden zur Analyse der Proben ein Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5, Leica Microsystems) verwendet. Die EdU-Markierung von MZ wurde nach den Protokollen von (Koziol *et al.* 2014) durchgeführt. Die EdU-Detektion wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Click-iT® EdU Alexa Fluor® 555 Imaging Kit (Life Technologies) durchgeführt.

5.2.6 Whole-mount *in situ* Hybridisierung (WMISH)

Die Whole-mount *in situ* Hybridisierung ermöglicht es gewebe- oder zelltypspezifische Expressionsmuster von Proteinen durch die Hybridisierung einer zuvor hergestellten RNA-Sonden an mRNA zu visualisieren (Tautz and Pfeifle 1989). Zusätzlich kann durch den Vergleich unterschiedlicher Proben der zeitliche Verlauf der Proteinexpression untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die Whole-mount *in situ* Hybridisierung (WMISH) von *E. multilocularis* MZ nach den Protokollen von Uriel Koziol durchgeführt (Koziol *et al.* 2014). Die einzelnen und detaillierten Protokolle zu WMISH, der Reagenzienherstellung und *in vitro* Synthese sowie Quantifizierung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden sind bei (Koziol 2014) zu finden. Zunächst wurden spezifische Genfragmente für *emtnfr* mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 5.1.5 aufgelistet. Die cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe des CloneJET™ PCR Cloning Kit in pJET1.2 kloniert. Durch den Verdau mit passenden Restriktionsenzymen wurden die Proben linearisiert. Die linearisierten sense und anti-sense Proben wurden durch

in vitro-Transkription mit den Polymerasen T7 und SP6 durch die vom Hersteller empfohlene Verwendung des DIG RNA-Markierungsmix (Roche, Basel) mit Digoxigenin markiert. Die Quantifizierung der Proben erfolgte nach dem Protokoll von (Koziol 2014). Zur Untersuchung einer Ko-Lokalisation wurden die MZ vor der WMISH mit EdU, wie in Kapitel 5.2.5.12 beschrieben, behandelt. Die EdU-Detektion erfolgte nach der WMISH, wie in Kapitel 5.2.5.12, beschrieben. Mit dem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5, Leica Microsystems) wurden die Proben untersucht und z-stack Bilder hergestellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Fiji (Schindelin *et al.* 2012; Schroeder *et al.* 2021).

Die Whole-mount *in situ* Hybridisierungsversuche wurden von Monika Bergmann durchgeführt.

5.2.7 Bioinformatische Analysen

5.2.7.1 Phylogenie des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis*

Zur Untersuchung der Phylogenie des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* (EmTNFR) wurden die Proteinsequenzen von TNF-Rezeptoren verschiedener Organismen in BioEdit verglichen (alignment) (Hall 1999). Hierfür wurden Proteinsequenzen von TNFR1, TNFR2 und TNFR16 (p75^{NTR}) der verschiedenen Organismen verwendet. Zum Vergleich wurde aus der vollständigen Proteinsequenz nur der Abschnitt verwendet, der die konservierte Domäne von TNFR (cd00185) codiert. Anschließend wurde ein phylogenetischer Baum mit der neighbor-joining method von MEGA Software (<https://www.megasoftware.net/>) erstellt. Die verwendeten Proteinsequenzen sind im Kapitel 11.5 aufgeführt.

5.2.7.2 *In silico* Analyse der TNF- α Signalwegmitglieder bei *E. multilocularis*

Zur Identifikation von verschiedenen Mitgliedern des TNF- α Signalweges in *E. multilocularis* wurde ein von Goeddel und Chen beschriebener TNF- α Signalweg als Grundlage verwendet (Goeddel and Chen 2005). Zu Beginn der Untersuchung wurde das Fuchsbandwurm-Proteom nach schon bereits vorhergesagten oder schon experimentell nachgewiesenen und untersuchten Proteinen des TNF- α Signalweges untersucht. Anschließend erfolgte eine *in silico* Analyse zur Untersuchung bisher noch nicht untersuchter Mitglieder des TNF- α Signalweges. Hierfür wurden homologe Proteine bei Plathelminthen, wie zum Beispiel *Schistosoma mansoni*, oder beim Menschen gesucht und bei Wormbase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) über ein Protein-Nukleotid-Datenbank-Vergleich (TBLASTN) mit dem Genom des Fuchsbandwurmes verglichen. Zur Verifikation der gefundenen Sequenzen wurde eine Rückwärtssuche mit BLASTP bei NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastx) in der Datenbank „UniProtKB/Swiss-Prot(swissprot)“ sowohl ohne die Angabe eines spezifischen Organismus als auch gegen den Organismus *Homo sapiens* mit dem Algorithmus DELTA-BLAST (engl.: Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) durchgeführt. Wenn bereits Signalwegmitglieder in den Transkriptomdaten von *E. multilocularis* vorhergesagt waren, wurden deren Proteinsequenzen zur Rückwärtssuche mit BLASTP bei NCBI verwendet.

5.2.7.3 *In silico* Analyse der p75^{NTR}-Signalwegmitglieder bei *E. multilocularis*

Zur Identifikation der verschiedenen Mitglieder des p75^{NTR}-Signalweges wurde eine Grafik aus dem Paper „The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor“ verwendet (Kraemer et al. 2014). Das weitere Vorgehen zur Identifikation von p75^{NTR}-Signalwegmitgliedern in *E. multilocularis* erfolgte wie in Kapitel 5.2.7.2 beschrieben.

6 Ergebnisse

6.1 Identifikation der *emtnfr* Gensequenz

Im Rahmen der Entschlüsselung des Fuchsbandwurm-Genoms, *E. multilocularis*, wurde die Gensequenz eines Rezeptors identifiziert, die zu der Gensequenz der Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie sehr hohe Ähnlichkeiten aufweist (Tsai *et al.* 2013). Dieses Gen eines möglichen Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie in *E. multilocularis* (EmuJ_000990500.1) liegt auf dem Vorwärtsstrang des Genoms im scaffold 02, besitzt 4 Exons und eine Länge von circa 732 Basenpaaren (es wurde die Genomversion WBPS7 verwendet). Die Genvorhersage wurde mit Hilfe von ExPASy – PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) analysiert. Diese kodiert einen löslichen, nicht an eine Membran gebundenen Rezeptor, bestehend aus einem Signalpeptid und vier TNFR/NGFR cysteinreichen Domänen, die charakteristisch für die TNF-Rezeptor-Superfamilie sind. Durch BLAST-Analysen (BLASTP) der vorhergesagten Proteinsequenz mit der Datenbank der Internetseite WormBaseParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) konnten Homologien zu Mitgliedern der TNFR-Superfamilie weiterer Helminthen, wie zum Beispiel *E. granulosus* (E-value 4.8e-157) und *Schistosoma mansoni* (E-value 4.5e-61) nachgewiesen werden. Ein Rezeptor der TNFR-Superfamilie bei *E. granulosus* wurde ebenfalls während der Genomschlüsselung des Hunde- und des Fuchsbandwurmes vorhergesagt (Tsai *et al.* 2013). Der Rezeptor der TNFR-Superfamilie in *Schistosoma mansoni* konnte bereits im Jahr 2009 experimentell nachgewiesen (Oliveira *et al.* 2009). Weitere BLAST-Analysen wurden auf der Internetseite NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gegen die Datenbank UNIProtKB/SwissProt durchgeführt. Hier konnte eine signifikante Homologie zum Mitglied 16 der TNFR-Superfamilie verschiedener Säuger, wie zum Beispiel *Gallus gallus* (E-value 1e-22), *Rattus norvegicus* (E-value 1e-17) und *Mus musculus* (E-value 2e-17), nachgewiesen werden. Auch zu Typ 16 der TNFR-Superfamilie des Menschen, *Homo sapiens*, wurden signifikante Homologien (E-value 1e-17) detektiert. Anschließend wurden mit Mitgliedern der TNFR-Superfamilie, sowohl von Säugern als auch von Helminthen, BLAST-Analysen gegen das Genom von *E. multilocularis* durchgeführt. In dieser Analyse konnte nur eine einzige Kopie im gesamten Fuchsbandwurm-Genom, die der vorhergesagten Version entsprach, nachgewiesen werden. Somit kann *emtnfr* zu den Single-copy-Genen gezählt werden. Gleichzeitig konnte in dieser Analyse nachgewiesen werden, dass die

Vorhersage des Genes nur den Beginn der Nucleotidsequenz widerspiegelt und ein großer Abschnitt der Gensequenz nicht vorhergesagt wurde. Somit war die Genvorhersage, die in der Genomversion WBPS7 gemacht wurde, unvollständig. Es wurden zusätzlich zu den vorhergesagten vier Exons drei weitere Exons identifiziert, die durch ein sehr langes Intron von den vorhergesagten Exons getrennt sind und das C-terminale Ende mit einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne kodieren. Die vollständige Gensequenz von *emtnfr* liegt auf dem Vorwärtsstrang des Genoms auf pathogen_EmW_scaffold_02 von Position 6649326 bis Position 6661107 (in der Genomversion WBPS7) und besteht aus 7 Exons mit einer Gesamtlänge von 1422 Basenpaaren. Exon 1 hat eine Länge von 111 Basenpaaren, Exon 2 eine Länge von 207 Basenpaaren, Exon 3 eine Länge von 143 Basenpaaren und Exon 4 eine Länge von 212 Basenpaaren. Mit Exon vier endet die vorhergesagte Gensequenz und es folgt ein sehr langes Intron, das die ersten vier Exons von den restlichen drei Exons trennt. Exon 5 ist 327 Basenpaare lang, Exon 6 hat eine Länge von 99 Basenpaaren und das letzte Exon, Exon 7, besitzt eine Länge von 323 Basenpaaren, wobei die letzten beiden Exons nur durch ein sehr kurzes Intron voneinander getrennt sind. Eine schematische Darstellung des Gens sowie der Struktur des kodierten Proteins erfolgt in Abbildung 7 und Abbildung 10.

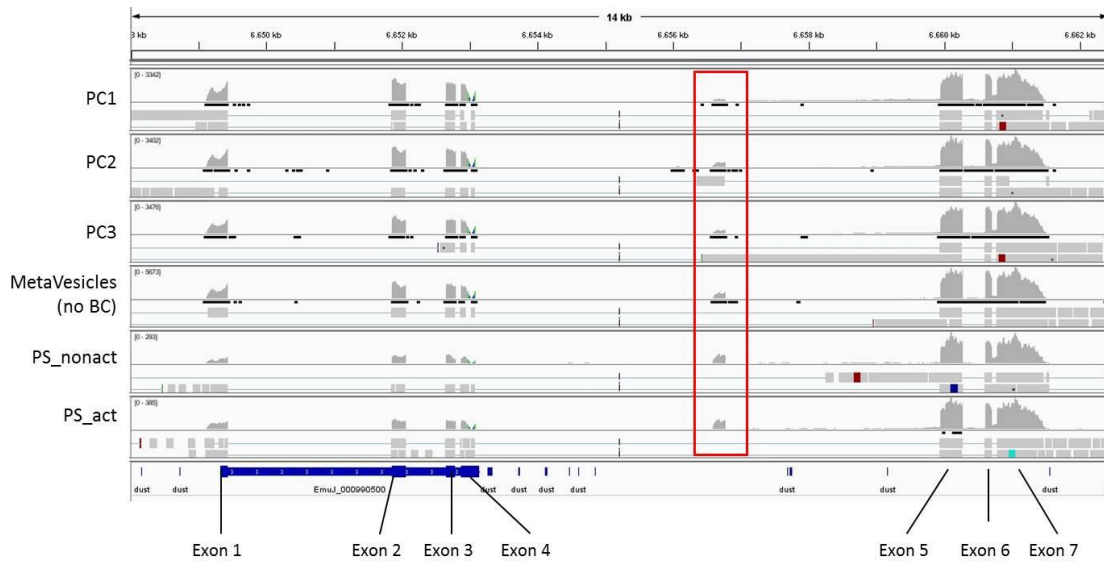


Abbildung 7: Darstellung der Genstruktur von *emtnfr* (EmuJ_000990500) in IGV: Referenzgenom: *Echinococcus multilocularis*.PRJEB122.WBPS7; Proben: Primärzellen Stadium 1 (PC1), Primärzellen Stadium 2 (PC2), Primärzellen Stadium 3 (PC3), MZ ohne Brutkapseln (MetaVesicles no BC), nicht aktivierte Protoskolicen (PS_nonact), aktivierte Protoskolicen (PS_act); die Gensequenzen von *emtnfr* in verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes werden in IGV mit einander verglichen und Exons und Introns bestimmt. Die blauen Balken stellen die Vorhersage von *emtnfr* dar. Die hellblauen Linien stellen Introns dar. Die grauen Balken entsprechen RNAseq Fragmenten, die mit dem Referenzgenom verglichen und zugeordnet worden sind. Roter Kasten markiert Anhäufung von RNAseq Fragmenten in Intron4, die zum Referenzgenom zugeordnet worden sind, und vermutlich einen alternativen Transkriptionstart enthalten.

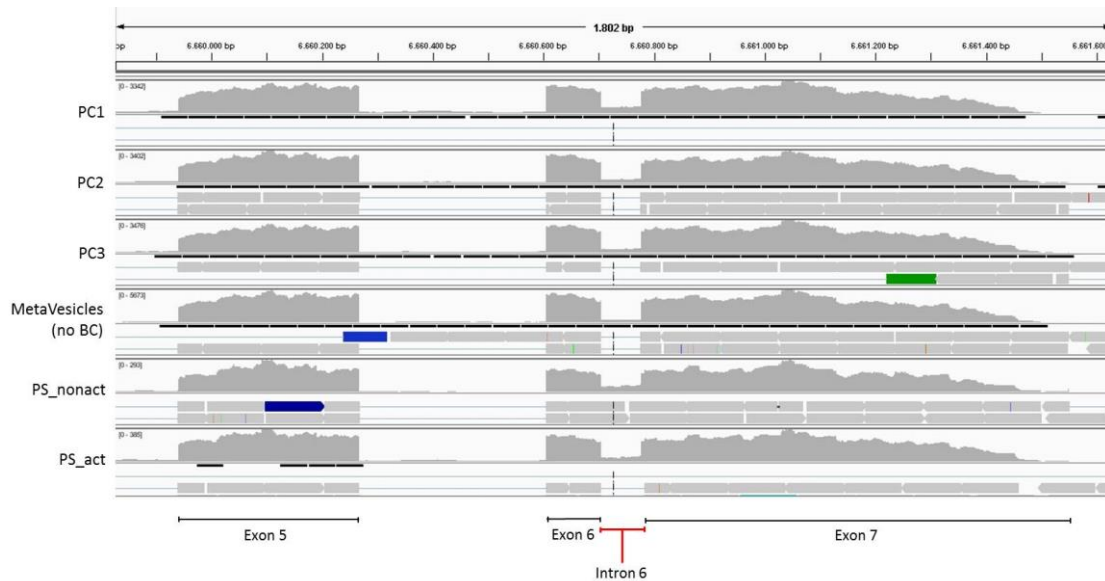


Abbildung 8: Vergrößerte Darstellung der letzten 3 Exons von *emtnfr* in IGV: Probenbeschreibung siehe in Abbildung 13. Die letzten drei Exons (graue Balken) der Gensequenz von *emtnfr* werden in IGV vergrößert dargestellt. Das Intron 6, das zwischen Exon 6 und 7 liegt, wird durch einen roten Strich markiert. Hier zeigen sich viele zugeordnete RNAseq Fragmente, die Hinweise auf ein Alternatives Splicing geben.

Anhand genauerer Untersuchungen von Transkriptomdaten unterschiedlicher Stadien des Fuchsbandwurmes im Programm IGV ([Downloads | Integrative Genomics Viewer \(broadinstitute.org\)](#)) konnte ein alternatives Transkript von *emtnfr*, das durch alternatives Splicing entsteht, vermutet werden. Zu Intron 6, das zwischen Exon 6 und 7 liegt, konnten in allen Entwicklungsstadien des Fuchsbandwurmes unterschiedlich häufig RNAseq Fragmente zugeordnet werden. Eine häufige Transkription des Introns konnte bei Primärzellen (PC1, 2, 3) und MZ ohne Brutkapseln (MetaVesicles no BC) sowie bei aktivierten und nicht aktivierten Protoskolices (PS_act & PS_nonact) nachgewiesen werden. Sowohl beim adulten Fuchsbandwurm als auch bei den älteren MZ, die bereits Brutkapseln ausgebildet haben, wurde eine sehr geringe Transkription von Intron 6 nachgewiesen. Aufgrund der häufigen Transkription von Intron 6 wird an dieser Stelle der Gensequenz ein alternatives Splicing vermutet, das ein alternatives Transkript von *emtnfr* hervorruft. Bei diesem alternativen Transkript erfolgt nach der Transkription der ersten sechs Exons die Transkription von Intron 6, die jedoch aufgrund eines Stopcodons noch im Intron abbricht und somit Exon 7 nicht transkribiert wird. Hierdurch entsteht nach Exon 6 ein Abschnitt mit 33 Basenpaaren. Das alternative Transkript hat eine

Gesamtlänge von 1104 Basenpaaren und wird im Folgenden *emtnfr-v2* genannt. Sowohl die kodierende Sequenz des Mitgliebes der TNF-Rezeptor-Superfamilie *emtnfr* als auch die kodierende Sequenz des alternativen Transkriptes sind in Kapitel 11.3 zu finden.

Bei weiterer Betrachtung von *emtnfr* in IGV (Integrative Genomics Viewer) fiel eine deutliche Anhäufung zugeordneter RNAseq Fragmente in der Mitte von Intron 4 in allen Fuchsbandwurmstadien auf (siehe roter Kasten in Abbildung 7). Im Sashimi Plot, der Splicingstellen in RNAseq Daten visualisiert (Katz *et al.* 2015), konnte zusätzlich eine Verbindung zwischen den gehäuft zugeordneten RNAseq Fragmenten in Intron 4 mit den folgenden Exons 5, 6 und 7 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). Eine Verbindung von Exon 4 zu der Anhäufung der reads in Intron 4 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich war zu Beginn der zugeordneten RNAseq Fragmente in Intron 4 ein potientes Startcodon nachweisbar, sodass es sich hierbei um einen alternativen Transkriptomstart handeln könnte. Hierdurch entsteht eine neue kodierende Sequenz aus den zugeordneten RNAseq Fragmenten in Intron 4 sowie den Exons 5, 6 und 7, die eine Gesamtlänge von 930 Basenpaaren besitzt. Das Leseraster ist bis zum Stopcodon der kodierenden Sequenz von *emtnfr* durchgängig. Dieses weitere alternative Transkript von *emtnfr* wird im Folgenden *emtnfr-v3* genannt. Die kodierende Sequenz von *emtnfr-v3* ist ebenfalls in Kapitel 11.3 zu finden. Die Analyse der Proteinsequenz von EmTNFR-v3, die mit SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) durchgeführt wurde, ergab lediglich Regionen von geringer Komplexität sowie eine Vorhersage einer Todesdomäne von Aminosäure 168 bis Aminosäure 270 mit einem E-Value von 50,4. In der Analyse der Proteinsequenz mit PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) wurde eine Transmembrandomäne des TNF-Rezeptors Typ 16 und eine Todesdomäne vorhergesagt. Die kodierende Sequenz der Transmembrandomäne wurde zwischen Aminosäure 83 bis Aminosäure 115 (E-Value: 7.3e-15) und die kodierende Sequenz der Todesdomäne zwischen Aminosäure 182 und 275 mit einem E-Value von 0,25 beschrieben.

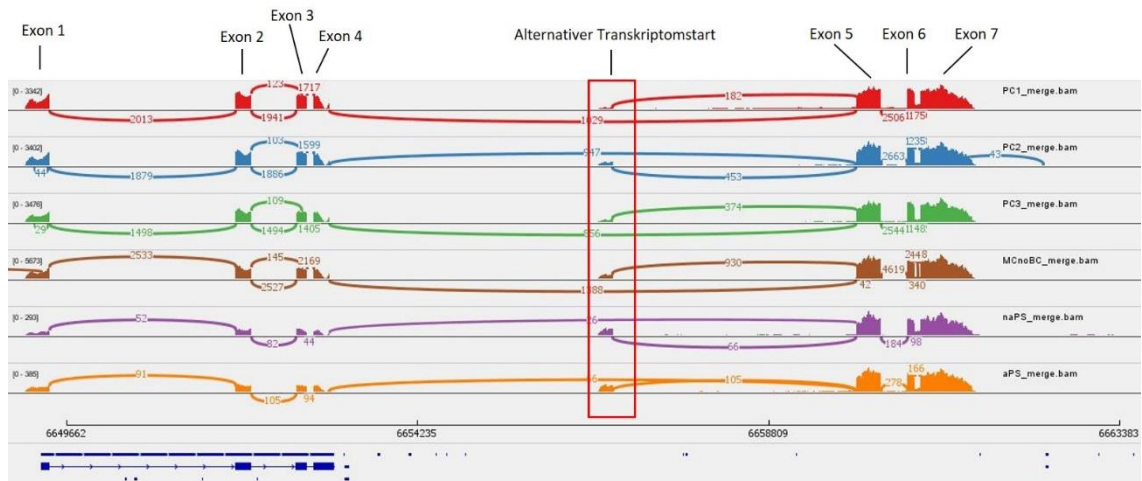


Abbildung 9: Sashimi Blot der Genstruktur von *emtnfr*: Probenbeschreibung siehe Abbildung 7; im Sashimi Blot werden die zugeordneten RNAseq Fragmente als Balken dargestellt. Die Splicing-Stellen, die die Exons mit einander verbinden, werden als Bögen dargestellt. Es wird nur der Vorwärtsstrang dargestellt und die minimale Übereinstimmung der Splicing-Stellen ist auf 25 eingestellt. Der rote Kasten markiert eine Anhäufung von RNAseq Fragmenten in Intron4. Die Bögen zwischen dieser Stelle und den folgenden Exons weisen auf eine Verbindung zwischen dieser Stelle und den folgenden Exons hin. Aufgrund dieser Erkenntnisse und des Nachweises eines Startcodons zu Beginn der rot markierten Stelle wird hier ein alternativer Transkriptomstart vermutet. Durch diesen alternativen Transkriptomstart entsteht eine neue Isoform von *emtnfr*. Diese wird im Folgenden *emtnfr-v3* genannt.

6.2 Charakterisierung der Proteinstruktur von EmTNFR

Nachdem die vollständige Nucleotidsequenz von *emtnfr* untersucht wurde, konnte die Charakterisierung der Proteinstruktur erfolgen. Die vollständige Aminosäuresequenz des Rezeptors der TNFR-Superfamilie bei *E. multilocularis* mit einer Gesamtlänge von 473 Aminosäuren konnte mit Hilfe des ORF Finder (Open Reading Frame Finder) ([Home - ORFfinder - NCBI \(nih.gov\)](#)) gefunden werden. Mit SignalP 4.1 ([SignalP-5.0 \(dtu.dk\)](#)) wurde die Signalsequenz des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie zwischen der ersten Aminosäure (Methionin) und der 18. Aminosäure (Alanin) detektiert, die im unten folgenden Schaubild (Abbildung 10) durch einen roten Balken dargestellt wurde. Die Schnittstelle der Signalsequenz (engl.: cleavage site) konnte zwischen der 18. und der 19. Aminosäure (zwischen Alanin & Methionin) nachgewiesen werden. Das N-terminale Ende der Proteinsequenz stellt mit einer Länge von 249 Aminosäuren die extrazelluläre Domäne des Rezeptors dar. Zwischen der 250. Aminosäure (Tyrosin) und der 272. Aminosäure (Phenylalanin) befindet sich die Transmembrandomäne des Rezeptors, die den extrazellulären mit dem intrazellulären Bereich verbindet. Die intrazelluläre Domäne des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis*, die sich zwischen der 273. Aminosäure (Tyrosin) und der 473. Aminosäure (Histidin) erstreckt, wird durch das C-terminale Ende der Sequenz gebildet. EmTNFR gehört aufgrund des extrazellulär gelegenen N-Terminus, wie die meisten anderen Mitglieder der TNFR-Superfamilie, zu den Typ1 Transmembranproteinen. Mit den Programmen ProSite ([ExPASy - PROSITE](#)), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) und InterPro ([InterPro \(ebi.ac.uk\)](#)) wurde die Proteinsequenz des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* analysiert. Es konnten vier cysteinreiche Domänen (CRD), das Charakteristikum der TNF-Rezeptor-Superfamilie, im extrazellulären Abschnitt des Rezeptors identifiziert werden. Die erste CRD erstreckt sich von Aminosäure 40 (Cystein) bis Aminosäure 79 (Cystein) mit 3 Disulfidbrücken, die von der 40. AS (Aminosäure) zur 57. AS, von der 58. AS bis zur 71. AS und von der 61. AS bis zur 79. Aminosäure reichen. Die zweite CRD befindet sich bei Aminosäure 82 (Cystein) bis Aminosäure 125 (Cystein) mit 3 Disulfidbrücken (82. - 98. AS, 101. - 117. AS, 104. - 125. AS). Die dritte cysteinreiche Domäne reicht von Aminosäure 127 (Cystein) bis Aminosäure 164 (Cystein) mit ebenfalls 3 Disulfidbrücken (127. - 140. AS, 143. - 156. AS, 146. - 164. AS). Die Proteinsequenz von Aminosäure 167 (Cystein) bis Aminosäure 206 (Cystein) umfasst die

vierte und letzte CRD mit ebenfalls 3 Disulfidbrücken (167. - 182. AS, 185. - 198. AS, 188. - 206. AS). Die TNFR-Domänen werden in Abbildung 10 durch grüne Balken dargestellt. Im intrazellulären Bereich des Rezeptors konnte mit SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) und InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) eine mögliche Todesdomäne mit einem E-Value von 50,4 von Aminosäure 355 (Valin) bis Aminosäure 409 (Threonin) mit der Accession number cd01670 detektiert werden, welche vermuten lässt, dass EmTNFR zur Gruppe der TNF-Rezeptoren mit einer intrazellulären Todesdomäne wie auch TNFR1 oder TNFR16 gehört. Bei einem Vergleich der EmTNFR Proteinsequenz mit Referenzproteinen des Menschen (*Homo sapiens*) mit NCBI Blast konnte die höchste Ähnlichkeit zum menschlichen TNF-Rezeptor 16, auch bekannt als low affinity nerve growth factor receptor oder p75^{NTR}, festgestellt werden (max score 105, query cover 77 %, E-Value 8e-25, ident 27 %) ([BLAST: Basic Local Alignment Search Tool \(nih.gov\)](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)). Die höchste Übereinstimmung der Proteinsequenzen konnte am N-Terminus und damit an der extrazellulären und Liganden bindenden Domäne detektiert werden. Die Isoform von EmTNFR (EmTNFR-V2) unterscheidet sich in seiner Proteinstruktur nur im intrazellulären Bereich von EmTNFR. Die extrazelluläre Region und die Transmembrandomäne stimmen mit EmTNFR überein. Da bei der Isoform von *emtnfr* (*emtnfr-v2*) Exon 7, das den Großteil der intrazellulären Todesdomäne kodiert, nicht translatiert wird, besitzt EmTNFR-V2 keine intrazelluläre Todesdomäne und gehört damit nicht in die Gruppe der Todesrezeptoren. Mit Hilfe von SMART, InterPro und Prosite konnte bei EmTNFR-V2 keine Todesdomäne nachgewiesen werden. Die zusätzliche Variante von EmTNFR (EmTNFR-V3), die durch einen alternativen Transkriptomstart in Intron 4 entsteht, besitzt keine cysteinreiche Domänen in der extrazellulären Region, da diese hauptsächlich durch die ersten vier Exons kodiert werden und diese der kodierenden Nucleotidsequenz von *emtnfr-v3* fehlen. EmTNFR-V3 besitzt laut der Untersuchung mit SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) eine Transmembrandomäne von Aminosäure 86 bis Aminosäure 108 und eine Region von geringer Komplexität von AS 153 bis AS 153. Mit Hilfe von InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) konnte die extrazelluläre Region von der ersten bis zur 88. Aminosäure, die Transmembrandomäne von der 89. bis 109. Aminosäure und die intrazelluläre Region von der 110 bis 309. Aminosäure bestimmt werden. In der

intrazellulären Region wurde eine Todesdomäne (cd01670) von Aminosäure 191 bis Aminosäure 245 detektiert. Cysteinreiche Domänen im extrazellulären Bereich konnten bei EmTNFR-V3 nicht nachgewiesen werden. Die Angaben zu den genauen Längen der einzelnen Regionen und der Todesdomäne von EmTNFR-V3 unterscheiden sich um einige Aminosäuren in den verwendeten Programmen. Die Aminosäuresequenz von EmTNFR, EmTNFR-V2 und EmTNFR-V3 sind in Kapitel 11.4 aufgelistet.

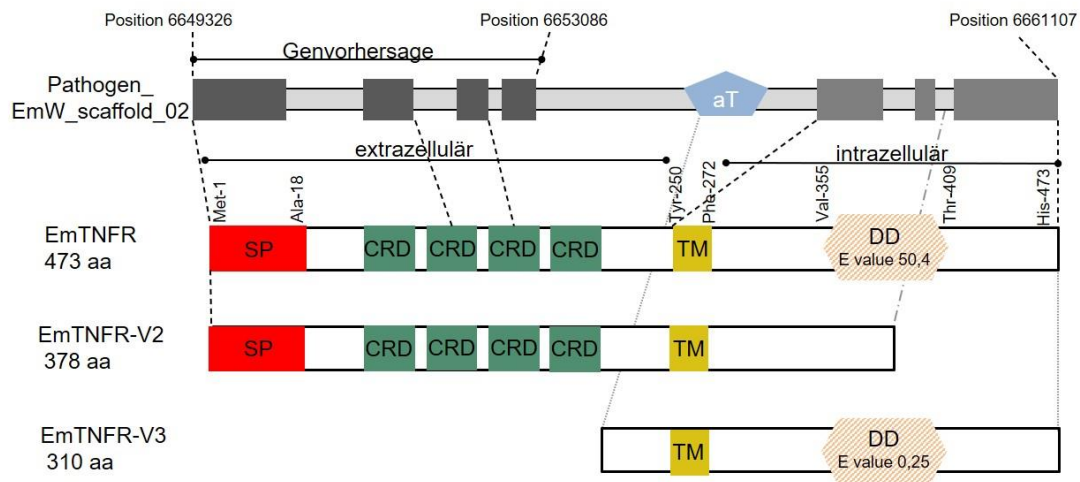


Abbildung 10: Schematische Darstellung von EmTNFR, EmTNFR-V2 und EmTNFR-V3: Jeder schwarze Balken stellt ein Exon und dessen Lokalisation dar. *emtnfr* liegt auf dem Vorwärtsstrang des Genoms im scaffold_02. Die dunkelgrauen Balken stellen die vorhergesagten Exons dar, die durch ein sehr langes Intron (hellgraue Balken) von den drei nicht vorhergesagten Exons (mittelgraue Balken) getrennt sind. Im Intron 4, also zwischen Exon 4 und Exon 5, befindet sich ein alternativer Transkriptomstart (aT). Durch die Transkription aller Exons entsteht EmTNFR mit einem Signalpeptid (SP), vier cysteinreichen Domänen (CRD), einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Todesdomäne (DD). EmTNFR-V2 entsteht durch ein alternatives Splicing nach Exon 6, hierdurch kommt es zum Abbruch der Sequenz in Intron 6. EmTNFR-V2 besitzt keine intrazelluläre Todesdomäne. EmTNFR-V3 entsteht durch einen alternativen Transkriptomstart (aT). Im intrazellulären Bereich existiert bei EmTNFR-V3 eine Todesdomäne, jedoch besitzt EmTNFR-V3 keine cysteinreichen Domänen im extrazellulären Bereich.

6.3 EmTNFR Sequenzhomologien und Erstellen eines phylogenetischen Baumes

Die Proteinsequenz des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* wurde mit 23 weiteren Proteinsequenzen verschiedener Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie mit Hilfe von BioEdit (Hall 1999) verglichen und in MEGA X (Kumar *et al.* 2018) mit der Neighbor-Joining Methode (Saitou and Nei 1987) ein phylogenetischer Baum erstellt. Die Proteinsequenzen der unterschiedlichen TNF-Rezeptoren wurden der Proteindatenbank der Internetseite NCBI entnommen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Zum Vergleich der TNF-Rezeptoren wurden nur die Proteinsequenzen der konservierten Domäne der TNFR-Superfamilie im extrazellulären Bereich (cd00185) eingesetzt. Es wurden die TNF- α bindenden Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, verschiedener Vertebraten und Invertebraten, die ebenfalls Vertreter von Todesrezeptoren (TNFR1) bzw. Vertreter von TRAF-interagierenden Rezeptoren (TNFR2) sind, verwendet. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von EmTNFR zum humanen TNF-Rezeptor Typ 16 (auch p75^{NTR} genannt) wurden zusätzlich TNFR16 verschiedener Vertebraten und Invertebraten zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes hinzugefügt. Die verwendeten Aminosäuresequenzen sind mit ihrer Zugangsnummer in Anhang 11.5 aufgelistet.

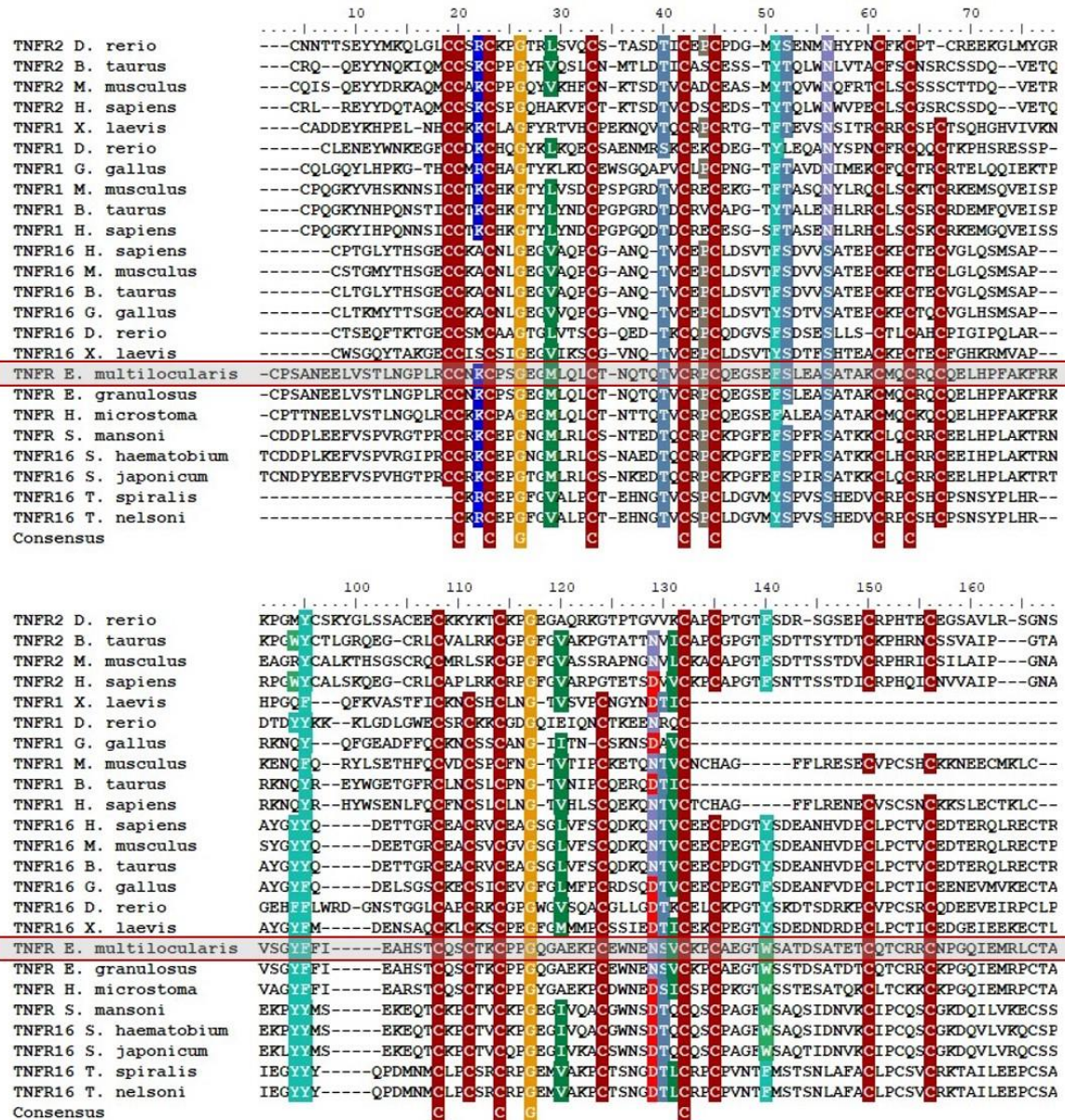


Abbildung 11: Alignment der Proteinsequenzen verschiedener TNF-Rezeptoren: Aminosäuresequenzen der konservierten Domäne von TNF-Rezeptoren (cd00185) von Vertebraten und Invertebraten wurden mit der konservierten Domäne des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* verglichen. Die farbig unterlegten Aminosäuren zeigen eine hohe Übereinstimmung in den verglichenen Sequenzen an (70-100%). Der Consensus markiert die 100-prozentige Übereinstimmung von Aminosäuren in allen verglichenen Sequenzen.

Im Vergleich der einzelnen Sequenzen von diversen TNF-Rezeptoren sind Aminosäuren aufgefallen, die in allen verglichenen Sequenzen übereinstimmen. Dies war vor allem die Aminosäure Cystein, die in den cysteinreichen Domänen, die ein Charakteristikum der TNFR-Superfamilie sind, vermehrt vorkommt. Das Charakteristikum der

TNFR-Superfamilie ist somit in allen verglichenen TNF-Rezeptoren vorhanden. Des Weiteren sind einige Aminosäuren aufgefallen, die in bis zu 70 % der verglichenen Sequenzen übereinstimmend waren. Zusätzlich konnten bei den Sequenzen innerhalb eines TNF-Rezeptor Typus hohe Ähnlichkeiten verzeichnet werden, die sich jedoch im Vergleich zu den anderen TNF-Rezeptor Typen deutlich voneinander unterschieden haben. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls im phylogenetischen Baum nachgewiesen werden. Der phylogenetische Baum zeigt eine große Ähnlichkeit von EmTNFR zu diversen Tumornekrosefaktor-Rezeptoren Typ 16, auch bekannt als NGFR (Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor) oder p75^{NTR}. Sowohl zu den TNF-Rezeptoren Typ 16 der Vertebraten als auch zu TNFR16 der Invertebraten hat EmTNFR eine hohe Ähnlichkeit, jedoch besitzt EmTNFR einen späteren gemeinsamen Vorfahren mit den TNF-Rezeptoren der Bandwürmer *Hymenolepis microstoma* und *E. granulosus* und den Saugwürmern *Schistosoma mansoni*, *japonicum* und *haematobium* als mit den TNF-Rezeptoren Typ 16 der Vertebraten. Die größte Ähnlichkeit von EmTNFR besteht zum TNF-Rezeptor aus *E. granulosus*. Dieser Verlauf spiegelt die Evolutionsgeschichte der Organismen und die evolutionsgeschichtliche Distanz von Plattwürmern zu Vertebraten wider. Der erstellte phylogenetische Baum zeigt, dass sowohl die TNF-Rezeptoren Typ 16 der Plattwürmer als auch die der Vertebraten von einem frühen gemeinsamen Vorfahren abstammten, der wiederum aus einem gemeinsamen Vorfahren mit den TNF-Rezeptoren Typ 16 der Trichinenarten *Trichinella spiralis* und *Trichinella nelsoni* entstanden ist. Zusätzlich lässt der erstellte phylogenetische Baum vermuten, dass alle TNF-Rezeptoren Typ 16 und ihre Vorfahren mit den TNF-Rezeptoren Typ 1, deren Gemeinsamkeit mit den TNF-Rezeptoren Typ 16 eine intrazelluläre Todesdomäne ist, einen gemeinsamen Vorfahren hatten. Die TNF-Rezeptoren Typ 2, die nicht wie die anderen beiden TNF-Rezeptortypen zu den Todesrezeptoren, sondern zu den TRAF-interagierenden Rezeptoren gehören, hatten sich bereits sehr früh von diesen distanziert und bilden einen unabhängigen Zweig im erstellten phylogenetischen Baum. Dies zeigt, dass die Ähnlichkeit der einzelnen TNF-Rezeptortypen zwischen 2 Spezies größer ist als die Ähnlichkeit zwei verschiedener TNF-Rezeptortypen einer Spezies.

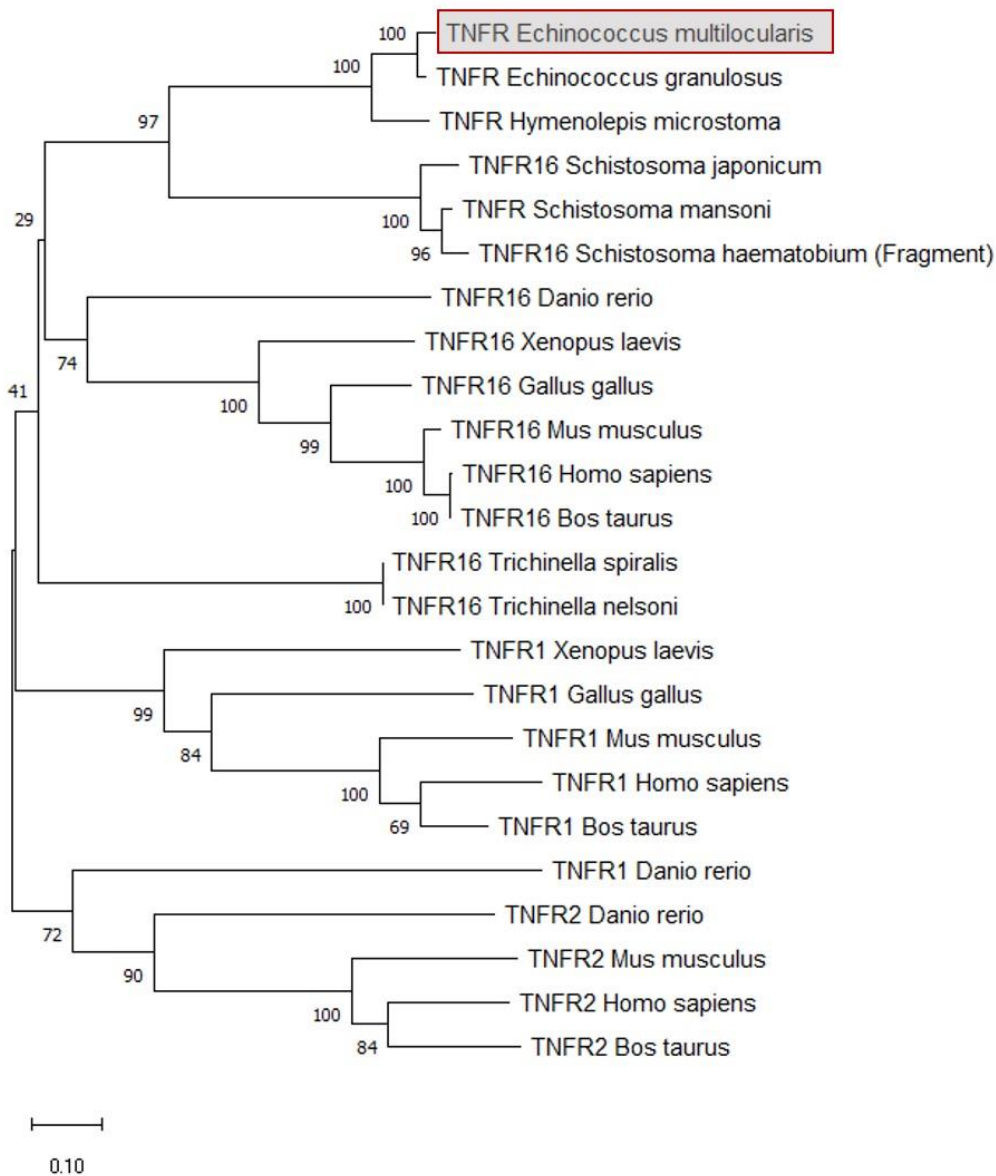


Abbildung 12: Phylogenetische Analyse von TNFR1, TNFR2 und TNFR16 Mitgliedern: Aminosäuresequenzen der konservierten Domäne der TNF-Rezeptoren-Superfamilie (cd00185) wurden in BioEdit (Hall 1999) miteinander verglichen. Die verglichenen Aminosäuresequenzen wurden zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes mit der neighbor-joining-methode (Saitou and Nei 1987) bei MEGA X (Kumar *et al.* 2018) verwendet. Die Zahlen stellen die Bootstrapwerte und die Länge der Äste die genetische Distanz dar. Die verwendeten Sequenzen sind in Anhang 11.5 angegeben.

6.4 Klonierung & Sequenzierung von *emtnfr*

Nach der bioinformatischen Analyse der Nukleotidsequenz und der Proteinstruktur des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* wurde eine RT-PCR zur Amplifikation der Nukleotidsequenz von *emtnfr* mit anschließender Klonierung und Transformation in *E. coli* durchgeführt. Ziel dieses Versuches war die Sequenzierung der erhaltenen Klone und damit der Nukleotidsequenz von *emtnfr*. Zu Beginn wurden passende Primer für *emtnfr* designed, welche in Kapitel 5.1.5 angegeben sind. Nach mehreren Versuchsansätzen der PCR mit unterschiedlichen Polymerasen, verschiedenen cDNA's als Template und neu designten Primern war schließlich die Amplifikation der Gesamtsequenz mit den Primern Dw1 und Rev-1 erfolgreich und in der Gelelektrophorese konnte ein PCR-Produkt mit der richtigen Bandengröße von ca. 1400 bp nachgewiesen werden. Nach der Aufreinigung der PCR-Bande wurde das Amplifikat in den Vektor pJET kloniert und in *E. coli* transformiert. In der Klontest-PCR konnten insgesamt 9 positive Klone (R1-3, R1-8, R1-9, R1-11, R1-16, R1-17, R1-18, R1.1-3 und R1.1-7) nachgewiesen werden. Die DNA der positiven Klone wurde aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt. Bei Durchsicht der Klonsequenzen wurden aufgrund von fehlerhaftem Klonieren die Sequenzen von Klon R1-16 und R1-18 in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. In den weiteren 7 Klonen konnten einige Punktmutationen mit teilweise auftretenden Veränderungen der Aminosäuren detektiert werden, die ausschließlich in Exon 4 zu finden waren. Exon 4 kodiert vor allem die vierte cysteinreiche Domäne des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes, die trotz der veränderten Aminosäuren erhalten bleibt. Auch die Disulfidbrücken, die sich in der cysteinreichen Domäne ausbilden, bleiben durch die Punktmutationen unverändert. Dies konnte mit Hilfe von SMART, InterPro und ExpasyProsite ermittelt werden. Bei genauerer Betrachtung der Nukleotidsequenz von Exon 4 in IGV, konnte festgestellt werden, dass in allen Proben der Stadien des Fuchsbandwurmes, die zur Erstellung der RNA-Seq Daten verwendet worden sind, die in dieser Arbeit nachgewiesenen Punktmutationen vorliegen. Nur die Nukleotidsequenz von Java, ein spezifisches Echinokokken-Isolat, das zur Genomentschlüsselung verwendet worden ist, besitzt diese Punktmutationen nicht. Daher kann vermutet werden, dass die Nukleotidsequenz, die durch die Sequenzierung ermittelt

wurde, in verschiedenen Echinokokken-Isolaten vorhanden ist, und das Echinokokken-Isolat Java isolatspezifische Mutationen besitzt.

Von den 7 Klonen konnte bei einem Klon die vollständige Nukleotidsequenz von *emtnfr* nachgewiesen werden (Klon R1.1-3). Bei insgesamt 3 von 7 Klonen kam es zu einem alternativen Splicing zwischen Exon 6 und Exon 7 (Klon R1.1-7, R1-3 und R1-11). Hierdurch entsteht die bereits im vorherigen Abschnitt der Arbeit beschriebene Isoform *emtnfr-v2*, die zusätzlich zu den Exons 1 bis 6 das Intron 6 enthält. Aufgrund eines Stopcodons in Intron 6 kommt es zu einem verfrühten Abbruch der Sequenz, das zum Fehlen der intrazellulären Todesdomäne in der Isoform *emtnfr-v2* führt. Bei einem dieser Klone wurde zusätzlich Exon 3 unvollständig transkribiert (Klon R1-3). Bei einem weiteren Klon, der *emtnfr* kodiert, kam es zur unvollständigen Transkription von Exon 3 (Klon R1-9). Bei beiden Klonen kam es hierdurch zum Wechsel des Leserasters und einer vollständigen Veränderung der Proteinsequenz. Diese beiden Klone sind am ehesten durch einen fehlerhaften Prozess im Klonierungsversuch entstanden und werden daher in Abbildung 13 nicht dargestellt. Des Weiteren konnte ein Klon identifiziert werden, der zusätzlich zu allen Exons noch einen Teilabschnitt von Intron 5 enthält (Klon R1-8). Aufgrund einer Verschiebung des Leserasters und des daraus resultierenden Stopcodons, bricht das ORF dieses Klons vorzeitig ab. Auf Proteinebene würde dies zu einer Veränderung der intrazellulären Struktur des TNF-Rezeptors und zum Fehlen einer intrazellulären Todesdomäne führen. Zusätzlich konnte ein Klon nachgewiesen werden, der zusätzlich zu den Exons das vollständige Intron 3 besitzt, das ebenfalls durch die Entstehung eines Stopcodons zu einer Verkürzung der codierenden Sequenz führt (Klon R1-17). Dies hat zur Folge, dass dieser Klon in seiner Proteinstruktur weder eine Transmembrandomäne noch eine intrazelluläre Domäne besitzt. In der extrazellulären Region dieses Klons konnten nur 3 cysteinreiche Domänen nachgewiesen werden. Sowohl bei diesem Klon als auch bei dem Klon mit Intron 5 ist aufgrund des nur einmaligen Vorkommens davon auszugehen, dass es sich hierbei um noch nicht vollständig gespleißte Klone handelt. Die Nukleotidsequenz dieser beiden Klone ist somit keine mRNA, die in ein Protein translatiert wird, sondern prä-mRNA, deren Splicing, Capping und Tailing noch nicht vollzogen wurde. Bei der Isoform von *emtnfr* (*emtnfr-v2*) ist aufgrund des häufigen Auftretens dieser Splicingvariante unter den sequenzierten Klonen und den Ergebnissen aus Kapitel 6.1 davon auszugehen, dass es sich hierbei um

reife mRNA handelt, die schon vollständig gespleißt wurde und in ein Protein translatiert wird. Durch Klonierung und Sequenzierung des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes konnte die Nukleotidsequenz von *emtnfr* und seiner Isoform *emtnfr-v2*, die durch die Analyse der Transkriptomdaten vermutet wurde, auf mRNA-Ebene bestätigt werden. *emtnfr-v3*, eine weitere Isoform von *emtnfr*, die durch einen alternativen Transkriptomstart entsteht, konnte in den Klonierungsversuchen nicht nachgewiesen werden.

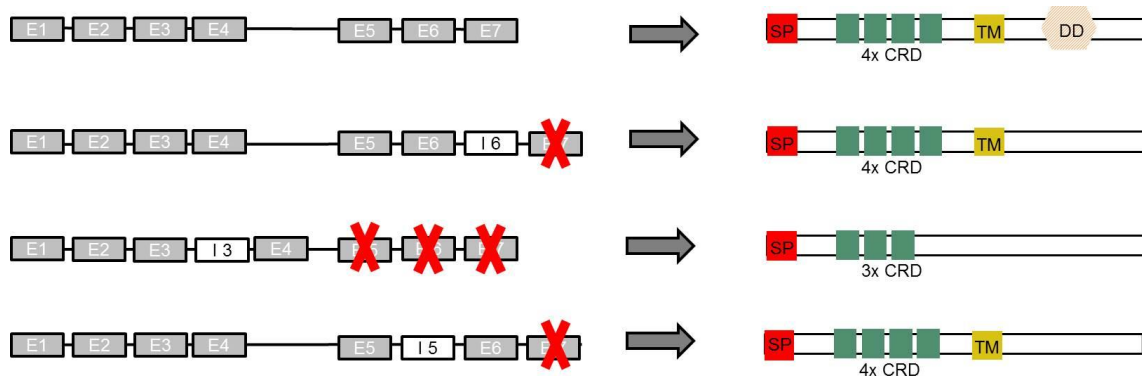


Abbildung 13: Verschiedene Klone von *emtnfr* und deren entsprechende Proteinstruktur: Auf der linken Seite des Schaubildes sind die Exons der einzelnen Klone (graue Balken E1 - 7) markiert. Zwischen den Exons liegen die jeweiligen Introns, die hier als Striche gekennzeichnet sind, solange sie nicht kodierend sind. Wenn ein Intron in der cDNA enthalten ist, wird es als weißes Rechteck dargestellt (I3 bzw. I5). Die aufgrund eines verfrühten Stopcodons nicht mehr vollständig kodierenden Exons werden durch rote Kreuze markiert. Auf der rechten Seite des Schaubildes ist eine schematische Darstellung der Proteinstruktur der einzelnen Klone dargestellt. Die Signalsequenz (SP) entspricht einem roten Rechteck. Die cysteinreichen Domänen (CRD) sind durch grüne Rechtecke und die Transmembrandomäne (TM) durch ein gelbes Rechteck dargestellt. Die intrazelluläre Todesdomäne (DD) existiert nur beim ersten Klon, dessen Nukleotidsequenz *emtnfr* kodiert. Die Nukleotidsequenz des zweiten Klons entspricht *emtnfr-v2*, der Isoform von *emtnfr*.

6.5 Expressionsunterschiede von *emtnfr* in unterschiedlichen *E. multilocularis* Stadien

Vor einigen Jahren konnte das vollständige Genom vom Fuchsbandwurm *E. multilocularis* entschlüsselt und das Gen für einen Rezeptor der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie identifiziert werden (Tsai *et al.* 2013; Olson *et al.* 2012). In den generierten RNA-Sequenzierungs-Daten des Fuchsbandwurmes konnte eine Expression des TNF-Rezeptors in allen Larvenstadien mit jedoch erheblichen Unterschieden in der Expressionshöhe nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden mit den aktuellsten Transkriptomdaten, die auf die Genomversion WBPS7 abgestimmt sind, durchgeführt. Die höchste Expression war in den jungen MZ, die noch keine Brutkapseln ausgebildet hatten, zu finden. Außerdem war eine sehr hohe Expression im ersten Primärzell-Stadium, das sehr jungen Primärzellen in der axenischen Zellkultur entspricht, mit einer fallenden Expression in den weiteren Primärzellstadien zu verzeichnen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass *emtnfr* ebenfalls in hoher Anzahl in MZ aus der aeroben *in vitro* Zellkultur exprimiert wird. Sowohl bei den aktivierten als auch bei den nicht aktivierten Protoskolices war nur eine sehr geringe Expression von *emtnfr* zu sehen. Aufgrund der hohen Expression von *emtnfr* in den Primärzellstadien und den MZ scheint

der TNF-Rezeptor hier von Bedeutung zu sein und möglicherweise in der Entwicklung von Primärzellen zu MZ eine wichtige Rolle zu spielen.

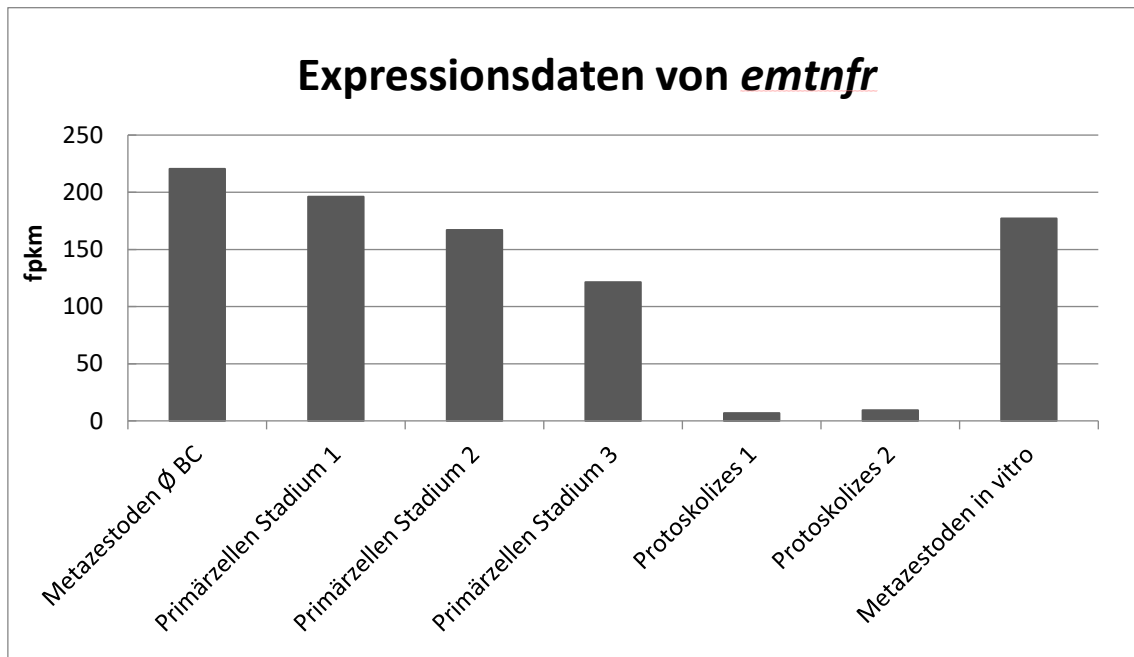


Abbildung 14: Expressionsdaten von *emtnfr* in den verschiedenen Stadien von *E. multilocularis*: Die RNA-Sequenzierungsdaten wurden dem *E. multilocularis* Genom zugeordnet und wurden gegen die Anzahl der Reads in einem Datensatz und gegen die Länge der Exons normalisiert (Tsai *et al.* 2013; Olson *et al.* 2012). Die Daten wurden für MZ ohne Brutkapseln (Metazestoden Ø BC), Primärzellen Stadium 1-3 (unterschiedlich alte Primärzellen in axenischer Kultur), Protoskolices 1 (nicht aktivierte Protoskolices), Protoskolices 2 (aktivierte Protoskolices) und MZ aus in vitro Kultur angegeben. Die Y-Achse gibt die Größe der Gene an, die sich auf ihre fpkm-Werte (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) beziehen. Diese Werte wurden auf die Länge ihrer Exons und Fragmente normalisiert und repräsentieren die Anzahl der gelesenen reads. Dadurch wurde der Vergleich der Gene untereinander und ihrer quantitativen Expression ermöglicht.

Zur Untersuchung der Expression eines Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie in unterschiedlichen Stadien des Fuchsbandwurmes auf Proteinebene wurde ein Western Blot mit Parasitenmaterial der unterschiedlichen Stadien durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Parasitenmaterial von Primärzellen unterschiedlichen Alters, von MZ mit und ohne Brutkapseln, von aktivierten und nicht aktivierten Protoskolices gesammelt und für die Weiterverwendung im Western Blot vorbereitet. Als Antikörper zur Detektion von EmTNFR in den einzelnen Parasitenstadien diente der selbsthergestellte polyklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Region des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* (α -EmTNFR). Der genaue Ablauf der

Antikörperherstellung gegen die extrazelluläre Region von EmTNFR wird in Kapitel 6.9 beschrieben und erläutert. Als 2. Antikörper wurde Anti-mouse Alkalische Phosphatase verwendet.

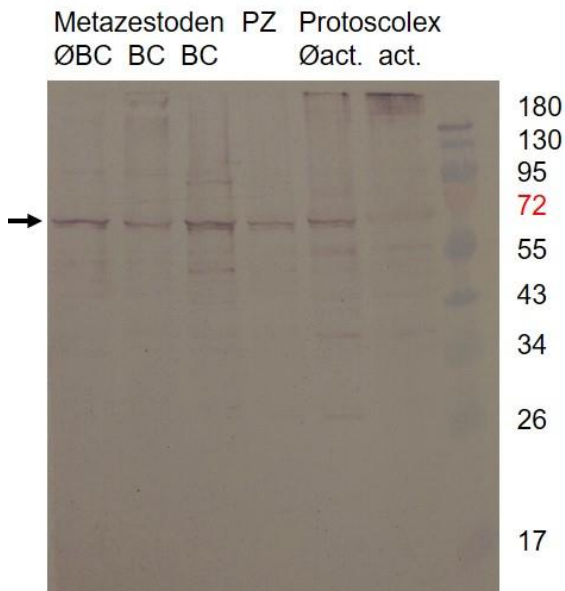


Abbildung 15: Western Blot mit Material unterschiedlicher Parasitenstadien von unterschiedlichen Isolaten mit α -EmTNFR als 1. Antikörper: Es wurde Parasitenmaterial von MZ ohne Brutkapseln (\emptyset BC) vom Isolat GH09 als auch Parasitenmaterial von MZ mit Brutkapseln (BC) von 2 unterschiedlichen Isolaten, nämlich von MS1010 und H95, verwendet. Zusätzlich wurde eine Probe von Primärzellen (PZ) sowie von aktivierten (act.) und nicht-aktivierten (\emptyset act.) Protoskolizes (vom Isolat DDD) gesammelt, aufgearbeitet und im Western Blot aufgetragen. Es wurden von jeder Probe 5 μ l aufgetragen. Als 1. Antikörper diente das selbsthergestellte α -EmTNFR Serum, das zuvor 1:2000 mit TBST verdünnt worden ist. Als 2. Antikörper wurde anti-mouse alkalische Phosphatase (1:5000 mit TBST verdünnt) verwendet. Bei ca. 60 kDa war eine dicke Bande für EmTNFR (Markierung durch Pfeil) in allen Proben zu sehen.

Im Western Blot konnte mit Hilfe von α -EmTNFR in allen getesteten Parasitenstadien das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes durch eine Bande bei ca. 60 kDa nachgewiesen werden. Bei der zuvor durchgeführten Berechnung der molekularen Masse von EmTNFR wurde diese mit 51,77 kDa bestimmt. Aufgrund von einer möglichen Glykosylierung des extrazellulären Bereiches von EmTNFR, die die molekulare Masse um ca. 10 kDa erhöhen kann, wurde für EmTNFR jedoch eine molekulare Masse von ca. 60 kDa angenommen. Eine genauere Erläuterung hierzu ist im Abschnitt 7.3 der Diskussion dieser Arbeit zu finden.

Bei den aktivierten Protoskolices war im Vergleich zu den anderen Proben die Bande für EmTNFR nur sehr schwach zu erkennen. Eine sehr kräftige Bande für EmTNFR trat hingegen in den Proben der MZ, sowohl bei den MZ mit als auch ohne Brutkapsel, auf. Die Ergebnisse des Western Blots bestätigten somit die Expression von *emtnfr* in den Transkriptomdaten, jedoch war eine genaue Quantifizierung der Expression auf Proteinebene durch diesen Versuch nicht möglich, sodass zur weiteren Bestätigung der Transkriptomdaten und Quantifizierung der EmTNFR-Expression auf Proteinebene ein quantitativer Western Blot durchgeführt wurde.

6.5.1 Quantitativer Western Blot

In den Transkriptomdaten konnte, wie bereits in Kapitel 6.5 erläutert, gezeigt werden, dass das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie in den einzelnen Stadien des Fuchsbandwurmes *E. multilocularis* unterschiedlich stark exprimiert wird. Die höchsten Werte wurden in MZ und in Primärzellen, hier vor allem in den jungen Primärzellen, verzeichnet. Auf Proteinebene wurde in einem Western Blot EmTNFR in den unterschiedlichen Stadien des Fuchsbandwurmes nachgewiesen. Zur genaueren Untersuchung der Expression von EmTNFR auf Proteinebene wurde in dieser Arbeit ein quantitativer Western Blot mit verschiedenen Parasitenproben durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedlich alte Primärzellen (1 und 3 Tage) und MZ des Isolates GH09 (1, 3 und 6 Monate) verwendet. Zur Untersuchung des Einflusses einer TNF- α Behandlung der Parasitenproben auf die Expression von EmTNFR wurden sowohl PZ als auch MZ mit 25 ng/ml (107 mM) TNF- α behandelt. Die TNF- α Behandlung der PZ erstreckte sich über einen beziehungsweise über drei Tage. Die MZ wurden einen Tag mit TNF- α in der Zellkultur behandelt, da in einigen Vorversuchen in der quantitativen Echtzeit-PCR ein sehr starker Effekt nach einer eintägigen TNF- α Behandlung auf die Expression von *emtnfr* nachgewiesen werden konnte. Somit wurden von jeder Parasitenprobe eine Negativkontrolle als auch eine TNF- α behandelte Probe im quantitativen Western Blot untersucht. Die Gel-Elektrophorese und der Western Blot wurden, wie in Kapitel 5.2.3.1 & Kapitel 5.2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Zur Standardisierung des quantitativen Western Blots wurde das Housekeeping Protein Elp eingesetzt. In einer vorherigen Arbeit wurden Antikörper gegen das Housekeeping Protein Elp (anti-II/3-10) hergestellt

(Felleisen and Gottstein 1993). Diese Antikörper wurden von Markus Spiliotis für die in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen Western Blots zur Verfügung gestellt. Im ersten quantitativen Western Blot konnte ein deutlicher Unterschied der Expression von EmTNFR in den einzelnen Parasitenstadien verzeichnet werden. Die höchste Expression von EmTNFR war in den mit TNF- α behandelten Proben der sehr jungen MZ (1 Monat) zu verzeichnen. Die niedrigste Expression von EmTNFR befand sich bei der TNF- α -behandelten Gruppe der mittelalten MZ (3 Monate). Auch bei der isolierten Betrachtung der Negativkontrollen hatten die jungen MZ das höchste und die 3 Monate alten MZ das niedrigste Expressionsniveau von EmTNFR. Die gleiche Beobachtung konnte man bei der isolierten Betrachtung der TNF- α behandelten Gruppen machen. Bei den PZ stieg sowohl in den TNF- α behandelten Gruppen als auch in den Negativkontrollen die Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie mit dem Alter an und eine TNF- α Behandlung der PZ führte zu einer Erhöhung der EmTNFR-Expression. Auch bei den jungen MZ kam es durch eine TNF- α Behandlung zu einem Anstieg der EmTNFR-Expression. Der stärkste positive Effekt der TNF- α Behandlung war bei den 1 Monate alten MZ nachzuweisen. Bei den mittelalten und alten MZ hingegen kam es zu einem Abfall der EmTNFR-Expression nach einer Behandlung mit TNF- α . Dieser Effekt war bei den ältesten MZ (8 Monate) am stärksten ausgeprägt. Zusammenfassend stieg die Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes von den jungen Primärzellen bis hin zu den jungen MZ an und fiel danach rasant ab. Die Behandlung mit TNF- α erhöhte die Expression von EmTNFR bei den PZ und den jungen MZ und verringerte die EmTNFR-Expression bei den fortgeschritteneren Parasitenstadien, wie zum Beispiel bei den älteren MZ.

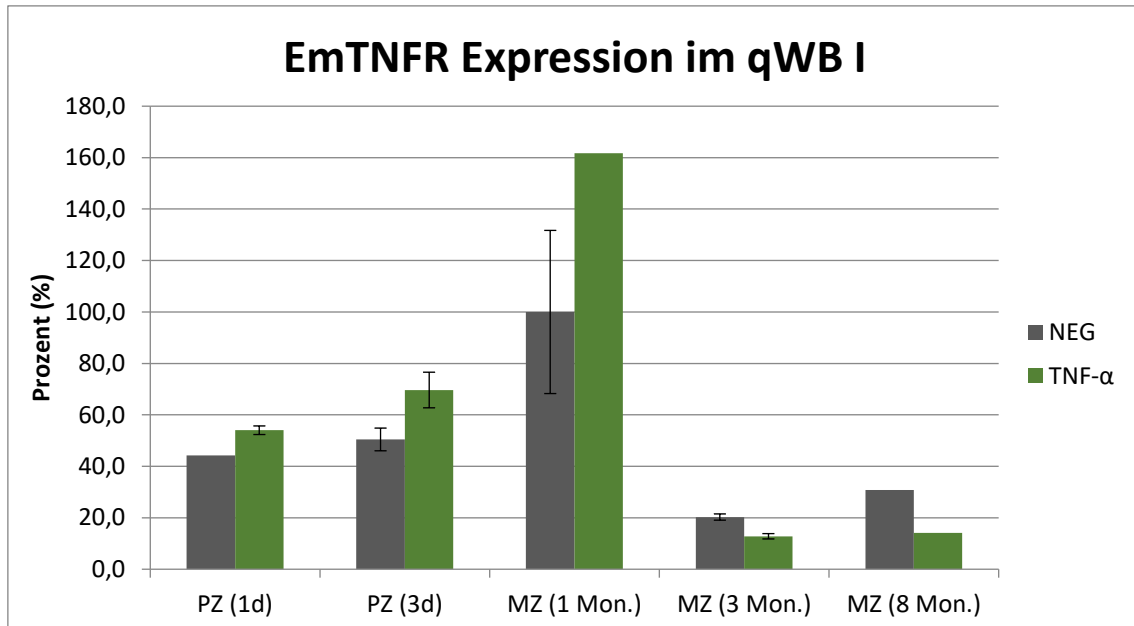


Abbildung 16: Prozentuale Darstellung der Expression von EmTNFR in unterschiedlichen Parasitenstadien im quantitativen Western Blot: Es wurden drei unterschiedliche MZ-Stadien des Isolates GH09 (MC 8 Monate, MC 3 Monate und MC 1 Monat) jeweils ohne TNF- α Behandlung (NEG) und mit TNF- α Behandlung (TNF- α) untersucht. Die TNF- α Behandlung der MZ war ein Tag lang. Auch bei den PZ wurden 2 unterschiedliche Stadien (1 Tag und 3 Tage alte Primärzellen) ebenfalls als Negativkontrolle (NEG) und TNF- α behandelte Gruppe (TNF- α) untersucht. Die TNF- α Behandlung der PZ war einen beziehungsweise drei Tage lang. Zur Standardisierung wurde das Housekeeping Protein Elp verwendet. Die Ergebnisse wurden auf die 1 Monate alten MZ der Negativkontrolle normalisiert. Die Genexpression wird in Prozent angegeben. Die Fehlerindikatoren geben die min. & max. Streuwerte wieder. Bei fehlenden Fehlerindikatoren konnten diese aufgrund von geringer Qualität einer Probe und damit fehlendem Duplikat nicht berechnet werden.

Da von den MZ-Proben biologische Replikate angelegt worden sind, wurde im Anschluss an den ersten quantitativen Western Blot ein zweiter quantitativer Western Blot angefertigt. Hier konnte das Ergebnis des ersten quantitativen Western Blots nur in einzelnen Abschnitten bestätigt werden. Die höchste Expression von EmTNFR war bei der Negativkontrolle der 8 Monate alten MZ zu verzeichnen. EmTNFR war in der TNF- α behandelten Gruppe der jungen MZ am niedrigsten exprimiert. Bei der isolierten Betrachtung der Negativkontrollen war ebenfalls die höchste Expression von EmTNFR bei den ältesten MZ und die niedrigste Expression bei den jüngsten MZ zu sehen. Diese Beobachtung war ebenfalls bei der isolierten Betrachtung der TNF- α behandelten Gruppen nachweisbar. Im vorherigen Versuch war ein entgegengesetzter Verlauf der Expression mit einem Maximum bei den jungen MZ und einem stetigen Abfall mit dem

Alter der MZ detektierbar. Beim zweiten quantitativen Western Blot wurde in allen drei Gruppen eine Verringerung der TNF-Rezeptor Expression nach einer Behandlung mit TNF- α verzeichnet. Der stärkste negative Effekt einer TNF- α Behandlung war bei den 3 Monate alten MZ zu sehen. Im vorherigen Versuch war dieser Effekt nur bei den 3 und 8 Monate alten MZ und eine Erhöhung der Expression von EmTNFR bei den jungen MZ zu sehen.

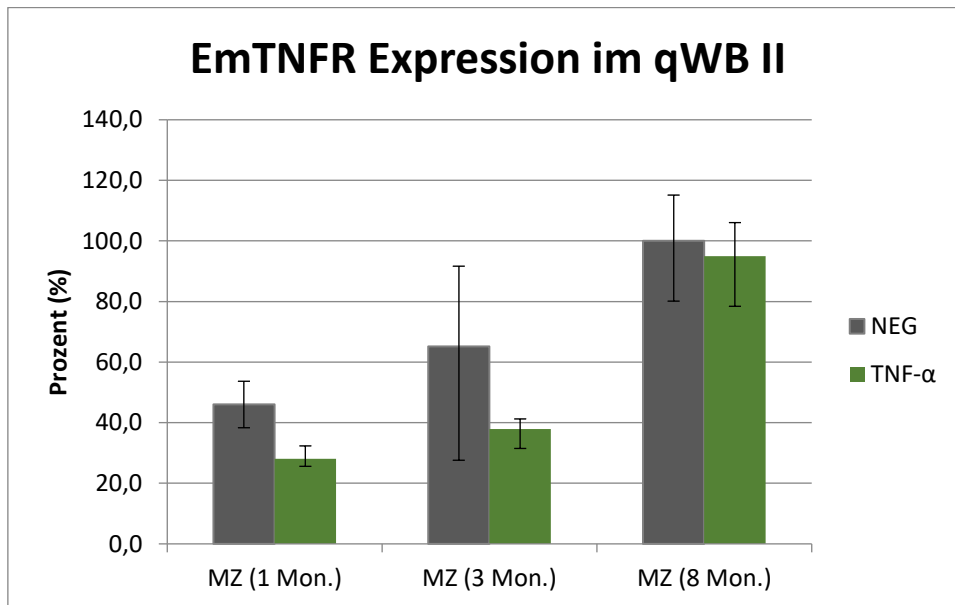


Abbildung 17: Auswertung des zweiten quantitativen Western Blots der Expression von EmTNFR in unterschiedlich alten MZ: Proben: Ein (1 Mon.), drei (3 Mon.) und acht Monate (8 Mon.) alte MZ des Isolates GH09. Von jeder Probe wurden sowohl eine Negativkontrolle (NEG) als auch eine mit 25ng/ml TNF- α behandelte Gruppe (TNF- α) verwendet. Zur Standardisierung des quantitativen Western Blots wurde das Housekeeping Protein Elp verwendet. Die Ergebnisse wurden auf die 8 Monate alten MZ der Negativkontrolle normalisiert. Die Genexpression wird in Prozent angegeben. Die Fehlerindikatoren geben die min. & max. Streuwerte wieder.

Die quantitativen Western Blots zeigen eine hohe Expression von EmTNFR in den PZ und den jungen MZ, die noch keine Brutkapseln besitzen, und bestätigen hiermit die Transkriptomdaten des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* auf Proteinebene.

6.6 In silico Analyse & Identifikation von möglichen Mitgliedern des TNF- α Signalweges bei *E. multilocularis*

Nach der Identifikation und Charakterisierung des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* stellte sich die Frage, ob auch ein vollständiger TNF- α Signalweg mit den verschiedenen Signalwegmitgliedern beim Fuchsbandwurm vertreten ist. Zur Identifikation der einzelnen Signalwegmitglieder bei *E. multilocularis* diente die Abbildung des TNF- α Signalweg als Vorlage, die zur Identifikation der TNF-Signalwegmitglieder bei *Schistosoma mansoni* verwendet wurde und im Jahr 2005 von Goeddel und Chen beschrieben wurde (Goeddel and Chen 2005; Oliveira *et al.* 2009). Zuerst wurde das *E. multilocularis* Genom auf der Internetseite WormBaseParasite (<https://parasite.wormbase.org/species.html>) sowie die Transkriptomdaten nach bereits vorhergesagten Signalwegmitgliedern durchsucht. Hier zeigte sich, dass mehrere Gene für Caspasen, Jun-protein, MAPKKK (engl.: mitogen-activated protein kinase kinase kinase), MAPKK (engl.: mitogen-activated protein kinase kinase) und MAPK (engl.: mitogen-activated protein kinase), TRAF (engl.: TNF-receptor associated factor), A20 (engl.: Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3) sowie cIAP (engl.: cellular inhibitor of apoptosis protein) im Fuchsbandwurmgenom bereits vorhergesagt worden sind. Bei cIAP war jedoch nur ein Inhibitor von Apoptose Proteinen beschrieben. Anschließend wurde untersucht, welche der Signalwegmitglieder schon experimentell nachgewiesen und in anderen Arbeiten bereits charakterisiert werden konnten (in Abbildung 18 mit dunkelgrünen Symbolen dargestellt). Sowohl die MAPK-Kinasen EmMKK1 und EmMKK2, als auch MAP-Kinasen EmMPK1, EmMPK2, EmMPK3 und JNK wurden in vorherigen Arbeiten untersucht. Auch bei den Caspasen wurde bereits Caspase 3 experimentell untersucht. In der folgenden Tabelle sind sowohl die vorhergesagten als auch die experimentell nachgewiesenen Signalwegmitglieder mit den dazugehörigen Publikationen aufgelistet. In Zusammenschau der vorherigen Arbeiten und Publikationen zeigte sich, dass die Mitglieder eines evolutionsgeschichtlich konservierten Signalweges über verschiedene MAP-Kinasen, MAP-Kinasen-Kinasen und MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen vollständig im Genom des Fuchsbandwurmes vorhanden sind. Dieser Signalweg kann unter anderem über TRAF aktiviert werden,

nachdem TNF- α an die extrazelluläre Region eines membrangebundenen TNF-Rezeptor Typ 2 gebunden hat.

Tabelle 11: Übersicht über Mitglieder des TNFR- oder NGFR-Signalweges bei *E. multilocularis*: Zunächst wurden die Transkriptomdaten nach Vorhersagen von Orthologen der Signalwegmitglieder untersucht sowie Publikationen zum experimentellen Nachweis der vorhergesagten Signalwegmitglieder gesucht.

Mitglieder des Signalweges	Synonym	Vorhersagte Gene in den Transkriptomdaten	Spezifische Proteine	Experimenteller Nachweis
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinases	EmuJ_000341400 EmuJ_000389600 EmuJ_000469200 EmuJ_000623200 EmuJ_000679500 EmuJ_000820500 EmuJ_000918100 EmuJ_001102400	EmRaf EmuJ_001079900	(Spiliotis <i>et al.</i> 2005)
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase, Dual specificity mitogen activated protein	EmuJ_000123600 EmuJ_001114500 EmuJ_000514400 EmuJ_000221400 EmuJ_001132600	EmMKK1 EmuJ_000121500 EmMKK2 EmuJ_000514400	(Gelmedin <i>et al.</i> 2010)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	EmuJ_000676200 EmuJ_000144900 EmuJ_000891000 EmuJ_000139200 EmuJ_000174000 EmuJ_000679000 EmuJ_000803700 EmuJ_001020300	EmMPK1 EmuJ_000803700 EmMPK2 EmuJ_000144900 EmMPK3 EmuJ_001020300 JNK EmuJ_000174000 MPK15 EmuJ_000676200	(Spiliotis <i>et al.</i> 2006) (Gelmedin <i>et al.</i> 2008) (Graf 2006) (Riedl 2009)

Caspase	Cysteine caspase	EmuJ_001067200	Caspase 2 EmuJ_000113100	(Zhou <i>et al.</i> 2013)
		EmuJ_001067500 EmuJ_000113100 EmuJ_000417900 EmuJ_000462900	Caspase 3 EmuJ_001067500 EmuJ_000462900	
		EmuJ_002117400	Caspase 8 EmuJ_000417900	
c-jun	Jun protein	EmuJ_000657600	Jun protein EmuJ_000657600	
Bax	Bcl-2-like protein 4	EmuJ_000854800	Apoptosis regulator BAX EmuJ_000854800	
p53	LFS1, TP53	EmuJ_000098700	p63 EmuJ_000098700	(Cheng, Zhu, <i>et al.</i> 2015)
Cytochrom C	CYC	EmuJ_000340200	Cytochrom C EmuJ_000340200	
TRAF	TNF receptor associated factor	EmuJ_000548900	TRAF3 EmuJ_000548900	
		EmuJ_000552700	TRAF4 EmuJ_000552700	
Sphingo-myelinase	SMase	EmuJ_000372200 EmuJ_001109500		
Proteinkinase C	PKC	EmuJ_001079900		
cIAP1/2	Cellular inhibitor of apoptosis protein	EmuJ_000698600	Inhibitor of apoptosis protein EmuJ_000698600	
A20	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	EmuJ_000608600 EmuJ_001004100	Tumor necrosis factor alpha induced protein EmuJ_000608600	

			Baculoviral IAP repeat containing protein EmuJ_001004100	
--	--	--	---	--

Zur Identifikation weiterer TNF- α Signalwegmitglieder wurde eine *in silico* Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Proteinsequenz eines Signalwegmitgliedes von einem Plathelminthen, wie zum Beispiel *Schistosoma mansoni*, mit dem Fuchsbandwurm-Genom bei WormBaseParasite verglichen (TBLASTN). Falls bisher noch kein Ortholog eines Signalwegmitgliedes in Plathelminthen nachgewiesen werden konnte, erfolgte der Vergleich mit einem humanen oder murinen Ortholog des Signalwegmitgliedes mit dem Fuchsbandwurmgenom. Als Cut-off Wert wurde ein E-Value von $< 10^{-5}$ festgesetzt. Anschließend wurde zur Verifizierung der gefundenen Sequenzen eine Rückwärtssuche bei NCBI mit den vollständigen Proteinsequenzen gegen die Datenbank von UniProt/SwissProt im Allgemeinen und gegen die Datenbank von UniProt/SwissProt des Organismus *Homo sapiens* (taxid:9606) durchgeführt (BLASTP). Als Cut-off Wert wurde ein E-value von $< 10^{-5}$ angenommen. Die *in silico* Analyse zeigte für weitere Mitglieder des TNF- α Signalweges Hinweise auf eine Existenz im Fuchsbandwurm. Sowohl die vorhergesagten als auch die Signalwegmitglieder mit einem positiven Hinweis in der *in silico* Analyse werden in Abbildung 18 als hellgrüne Symbole dargestellt. Bei drei Signalwegmitgliedern, Caspase 8, cIAP1/2 und MEKK3, konnten jeweils eine Caspase, ein zellulärer Inhibitor von Apoptose Proteinen und eine MAP3Kinase jedoch nicht exakt diese Signalwegmitglieder nachgewiesen werden. Bei Caspase 8 ergab BLASTP als erstes Ergebnis eine Caspase 3. Die Caspase 8 war nur an vierter Stelle zu finden. Da sich die Caspasen untereinander sehr ähneln, der E-Value der Caspase 8 auch an vierter Stelle noch sehr hoch war und es möglich ist, dass der Fuchsbandwurm eine andere Caspase für diesen Signalweg verwendet, wird Caspase 8 dennoch als nachgewiesen markiert. Im Fall der MEKK3 verhält es sich ähnlich, sodass auch hier MEKK3 als nachgewiesen gewertet worden ist. Bereits in den Transkriptomdaten wurde ein Inhibitor von Apoptose Proteinen (EmuJ_000698600) vorhergesagt. Bei der Rückwärtssuche mit BLASTP bei NCBI war cIAP1/2 nicht als

erstes Ergebnis zu finden. cIAP4 war das beste Ergebnis, aber auch in diesem Fall wurde cIAP1/2 als nachgewiesen gewertet, da es unter den ersten Ergebnissen bei der Rückwärtssuche vertreten war und dem ersten Ergebnis cIAP4 sehr ähnlich ist. Bei einigen Signalwegmitgliedern, wie zum Beispiel RIP, TRADD und FADD, zeigten sich in der *in silico* Analyse keine Hinweise auf eine Existenz im *Echinococcus*-Genom. Diese Signalwegmitglieder sind in Abbildung 18 als graue Symbole dargestellt.

In dieser Arbeit wurden nur bioinformatische Analysen der Mitglieder des TNF- α Signalweges beim Fuchsbandwurm durchgeführt. Weitere experimentelle Untersuchungen sind zur genaueren Untersuchung und Charakterisierung dieser Signalwegmitglieder und deren Interaktion untereinander notwendig. Die bioinformatischen Analysen haben jedoch gezeigt, dass beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* ein Großteil der Mitglieder der verschiedenen TNF- α Signalwege vorhanden sein könnte und sogar ein vollständiger Signalweg über den TNF-Rezeptor Typ 2 existieren könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse dieser Arbeit auf die Existenz der verschiedenen Mitglieder des TNF- α Signalweges hinweisen und aufgrund derer vermutet werden kann, dass die intrazelluläre Signalweiterleitung ab EmTNFR im Fuchsbandwurm eher der Signalweiterleitung des TNF-Rezeptor Typ2 entspricht.

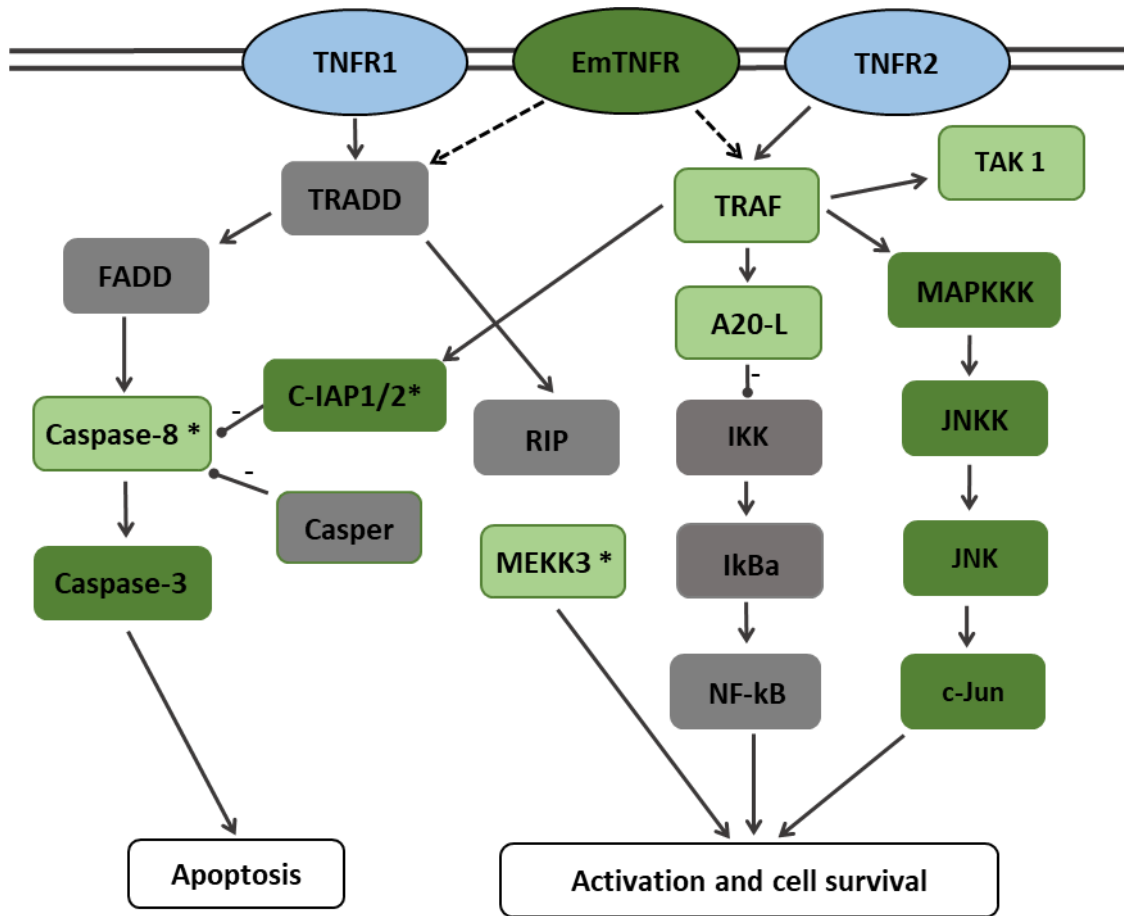


Abbildung 18: Darstellung eines möglichen TNF- α Signalweges bei *E. multilocularis*: dunkelgrüne Symbole: experimentell nachgewiesene Signalwegmitglieder; hellgrüne Symbole: vorhergesagte Signalwegmitglieder oder in *in silico* Analyse Hinweise auf Existenz gefunden; graue Symbole: keine Hinweise auf Existenz; *: MEKK3, cIAP1/2 und Caspase8 konnten nicht direkt, sondern nur andere Caspasen, cIAP1/2 und MAP3K als 1. Ergebnis in der *in silico* Analyse nachgewiesen werden.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit von EmTNFR zum humanen TNF-Rezeptor Typ 16, der auch low-affinity-nerve-growth-factor-receptor oder p75^{NTR} genannt wird, wurde auch der intrazelluläre Signalweg von p75^{NTR} untersucht und nach Orthologen seiner Signalwegmitglieder im Fuchsbandwurm gesucht. Auch hier konnten bereits in den Transkriptomdaten und im Fuchsbandwurmgenom auf WormBaseParasite Vorhersagen für einige Signalwegmitglieder gefunden werden. Einige dieser Signalwegmitglieder sind ebenfalls in vorherigen Arbeiten untersucht und experimentell nachgewiesen worden. Diese Signalwegmitglieder (JNK, MAP-Kinasen und Caspasen) sind ebenfalls im TNF- α Signalweg vorhanden und könnten eine zentrale Rolle im intrazellulären Signaling des Fuchsbandwurmes spielen. Die weiteren Mitglieder des p75^{NTR} Signalweges wurden, wie

bereits beim TNF- α Signalweg beschrieben, untersucht. Bei den Ceramiden, die ein Mitglied des p75^{NTR}-Signalweges sind, konnten verschiedene Kinasen, wie zum Beispiel Ceramid-Kinase (EmuJ_000868200), Neutrale Ceramidase (EmuJ_000506100), Ceramidglucosyltransferase (EmuJ_000876500) und non-lysosomale Glucosylceramidase (EmuJ_000876700) in den Transkriptomdaten nachgewiesen werden. Aufgrund der vorhandenen Proteine/Enzyme rund um die Ceramide, die im Fuchsbandwurm gefunden worden sind, ist davon auszugehen, dass dieser zur Bildung von Ceramiden fähig ist und daher wurden diese als nachgewiesen gewertet. Bei Bax war in den Transkriptomdaten eine Vorhersage zu finden, jedoch ergab die Rückwärtssuche bei NCBI mit dem entsprechenden Protein (EmuJ_000854800) keine signifikanten Ergebnisse. Bei der Suche mit dem humanen Bax gegen das Genom des Fuchsbandwurmes konnte ein weiteres Protein gefunden werden, das bei der Rückwärtssuche an 6. Stelle Bax ergab. Die ersten Ergebnisse der Rückwärtssuche waren Bcl-2-like Proteine, daher ist der Nachweis von Bax im Fuchsbandwurm nur sehr vage.

Von den verschiedenen intrazellulären Signalwegen von p75^{NTR} konnte in der bioinformatischen Analyse ein nahezu vollständiger Signalweg im Fuchsbandwurm nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse ergab für die Signalwege bis zur Aktivierung von JNK, die über Sphingomyelinasen und die Bildung von Ceramiden sowie über TRAF6 und MAP-Kinasen ablaufen können, positive Hinweise auf die Existenz in *E. multilocularis*. Der gemeinsame weitere Signalweg bis zur Auslösung von apoptotischen Prozessen ist ebenfalls in der bioinformatischen Analyse fast vollständig vorhanden, mit einer Ausnahme. Für Bad, ein pro-apoptisches Protein der Bcl-2-Familie, konnten in den Untersuchungen keine Hinweise auf eine Existenz im Fuchsbandwurm gefunden werden.

Neben dem intrazellulären Signalwegen von p75^{NTR} wurden auch die Ko-Rezeptoren, die mit p75^{NTR} eine Bindung eingehen können und somit verschiedene intrazelluläre Signalwege einleiten können, untersucht. p75^{NTR} kann mit Trk-Rezeptoren (Tropomyosin Rezeptor Kinase-Rezeptor), dem Nogo-Rezeptor (NgR) und LINGO1 (engl.: Leucine rich repeat and Immunglobulin-like domain containing protein 1) sowie mit Sortilin eine Interaktion eingehen. In den Transkriptomdaten des Fuchsbandwurmes sind zu Sortilin (EmuJ_000968800 Sortilin und EmuJ_001113400 Sortilin Rezeptor), dem Nogo-Rezeptor und LINGO1 Vorhersagen zu finden, jedoch nicht zu den weiteren Ko-

Rezeptoren von p75^{NTR}. Im Fall des Nogo-Rezeptors wurde beim Fuchsbandwurm der Nogo-B-Rezeptor (EmuJ_000485600 Nogo B receptor= Dehydrodolichyl diphosphate synthase complex subunit nus1) und nicht Nogo-66-Rezeptor, der mit p75^{NTR} interagieren kann, vorhergesagt. Bei den Vorhersagen zu einem Ortholog von LINGO1 im Fuchsbandwurm handelt es sich um unspezifische Vorhersagen, die Proteine mit leucinreichen Wiederholungen vorhersagen. In der *in silico* Analyse zur Existenz der Ko-Rezeptoren von p75^{NTR} im Fuchsbandwurm konnte ein Ortholog zu Sortilin und LINGO1 als möglicher Ko-Rezeptor bestätigt werden. Nach aktuellen Ergebnissen der bioinformatischen Analyse gibt es keine Hinweise auf Orthologe zu den Trk-Rezeptoren oder dem Nogo-66-Rezeptor, die als Ko-Rezeptoren für p75^{NTR} fungieren können, beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis*.

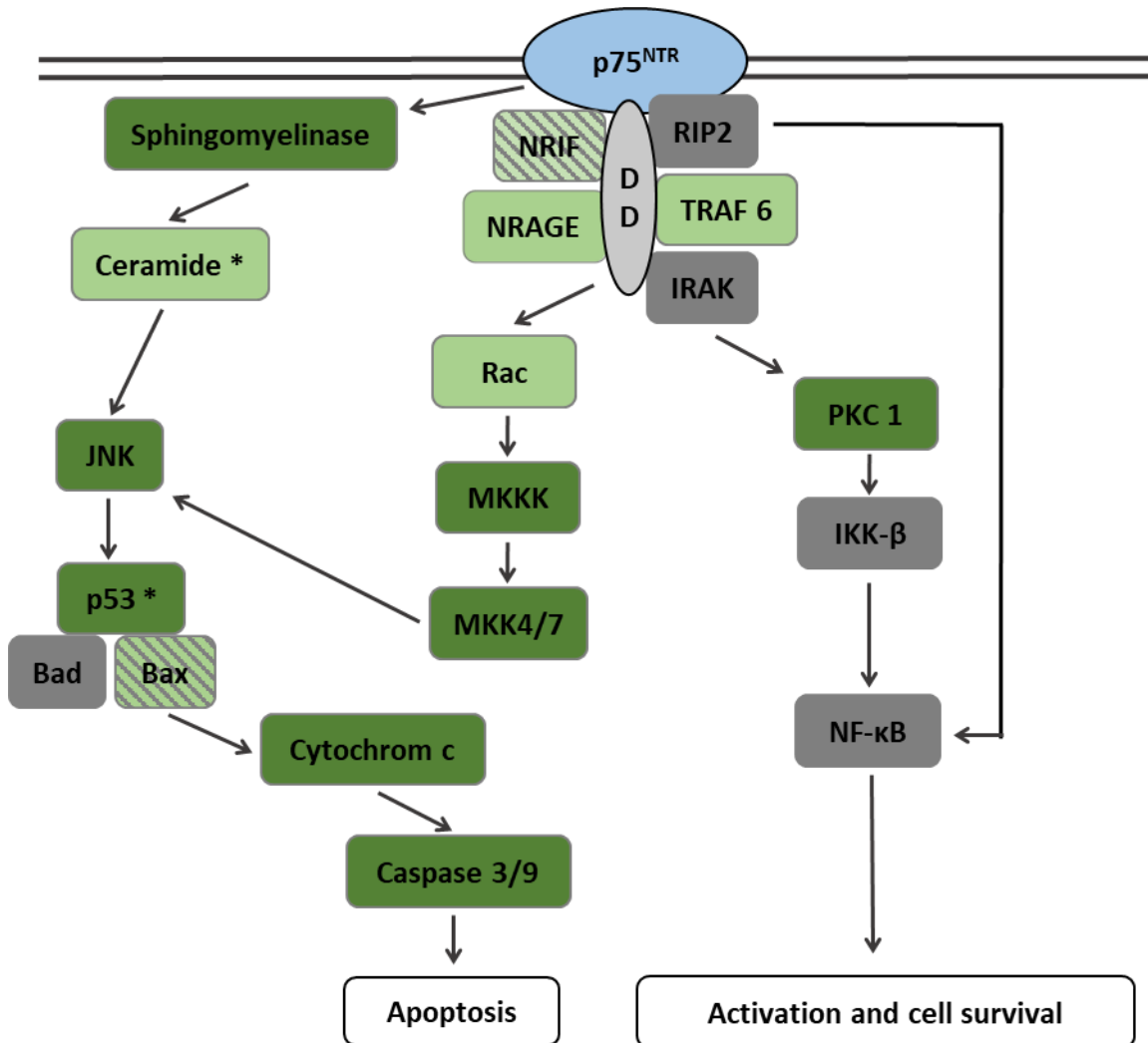


Abbildung 19: Darstellung eines möglichen durch $p75^{NTR}$ vermittelten intrazellulären Signalweges bei *E. multilocularis*: Nach der Aktivierung von $p75^{NTR}$ durch seine spezifischen Liganden können durch unterschiedliche Adaptermoleküle, die an die intrazelluläre Todesdomäne von $p75^{NTR}$ binden, verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Über die Bildung von Ceramiden, der Aktivierung von JNK und schließlich von Caspase 3 oder 9 kommt es zur Apoptose. JNK kann durch ein MAPK-Signalweg aktiviert werden und ebenfalls in der Apoptose enden. Das Zellüberleben und die Aktivierung der Zelle kann über den NF- κ B-Signalweg, der entweder über das Adaptermolekül RIP2 oder durch die Aktivierung von TRAF, IRAK und IKK- β ausgelöst werden kann, eingeleitet werden. DD= Todesdomäne, dunkelgrün= Signalwegmitglieder wurden bereits experimentell nachgewiesen; hellgrün= Signalwegmitglieder wurden vorhergesagt oder in *in silico* Analyse Hinweise zur Existenz gefunden; grau= keine Hinweise auf Existenz bei *Echinococcus multilocularis*; *= Ceramide konnten nicht nachgewiesen werden, aber viele Enzyme/Proteine zur Verarbeitung/Herstellung von Ceramiden, daher ist zu vermuten, dass *E. multilocularis* Ceramide herstellen kann, p53 wird bei *E. multilocularis* durch p63 ersetzt, dies war bereits in den Transkriptomdaten vorhergesagt

Tabelle 12: Ko-Rezeptoren von p75^{NTR} im Genom des Fuchsbandwurmes:

Rezeptor	Gennummer bei <i>E. multilocularis</i>	Bezeichnung	UniProt-Nummer	Nachweis in <i>in silico</i> Analyse
Trk A/B/C	Keine	Keine	Keine	Negativ
Nogo-Rezeptor	EmuJ_000485600.1	Nogo B Rezeptor	A0A068Y5Z8	Negativ
Sortilin	EmuJ_000968800.1	Sortilin	A0A068YFB4	Positiv EmuJ_000968800
Sortilin Rezeptor	EmuJ_001112200.1 EmuJ_001113400.1	Sortilin Rezeptor	A0A068YMH0 A0A068YMI0	Negativ
Lingo1	EmuJ_000963300.1	Leucine rich repeat neuronal protein	A0A068YBN0	Positiv EmuJ_000500600

6.7 In vitro Zellkulturversuche an Primärzellen

6.7.1 TNF- α stimuliert die Bildung von MZ aus Primärzellen

Während einer Infektion mit dem Fuchsbandwurm kommt es im Zwischenwirt zu einer Metamorphose des Fuchsbandwurmes. Hierbei entwickeln sich aus den Onkosphären, dem ersten Larvenstadium, MZ, die in der Leber des Zwischenwirtes wachsen und sich infiltrativ ausbreiten (Brehm and Koziol 2017). Während dieser Phase der Infektion produziert das Immunsystem des Zwischenwirtes zur Abwehr des Parasiten vermehrt Zytokine (Liu et al. 2020; Wang, Lin, et al. 2014). Eines der ersten Zytokine während einer Immunabwehrreaktion ist TNF- α (Cannon et al. 1990). Zur Untersuchung der Metamorphose des Fuchsbandwurmes von Onkosphäre bzw. Germinalzellen zum zweiten Larvenstadium, der Metazestode, wurde in den letzten Jahren die Primärzellkultur entwickelt (Spiliotis *et al.* 2008; Spiliotis *et al.* 2010).

Zur Untersuchung des Effektes von TNF- α auf PZ des Fuchsbandwurmes *E. multilocularis* und deren Metamorphose zu Metazestodenvesikeln wurden zunächst PZ isoliert und in einer axenischen Zellkultur mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α behandelt. Jeden dritten Tag erfolgte der Wechsel des Zellkulturmediums und die erneute Gabe von TNF- α . In einem ersten Versuchsansatz sind je 100 Units PZ mit 25 ng/ml (1,44 nM) oder 100ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelt worden und über circa 1 Monat beobachtet worden. Sowohl die TNF- α behandelten Gruppen als auch die Negativkontrolle haben in den ersten Tagen Aggregate mit zentralen Kavitäten ausgebildet. Hier waren noch keine Veränderungen in Morphologie oder Wachstum durch eine TNF- α Behandlung der PZ zu beobachten. An Tag 11 konnte man bereits leichte Unterschiede in der Entwicklung der Kavitäten zwischen den TNF- α behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe feststellen. Die mit 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelten Primärzellen zeigten gegenüber den mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Zellen und der Kontrollgruppe deutlich hellere und schon orange verfärbte Kavitäten auf (siehe Abbildung 20). Bei der Entwicklung von Kavitäten kommt es in der Primärzellkultur zunächst zur Ausbildung sogenannter red dots. Diese erscheinen unter dem Lichtmikroskop als intensiv rot gefärbte und in den Aggregaten zentral gelegene Bläschen. Als Ursache für die rote Färbung der red dots wird eine Anreicherung von

Phenolrot, das im Zellkulturmedium enthalten ist, vermutet (Pérez et al. 2019). Im weiteren Verlauf reduziert sich die Intensität der Rotfärbung und es kommt nach einer Orange- bis Gelbfärbung letztendlich zur vollständigen Entfärbung der Kavitäten. Eine mögliche Erklärung für die Entfärbung der red dots im Verlauf der Zellkultur könnte die Bildung eines Teguments sein, das das Phenolrot aus den Kavitäten heraus transportiert (Pérez et al. 2019). Die bereits weiter fortgeschrittene Entfärbung der Kavitäten in der mit 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelten Gruppe lässt eine schnellere Entwicklung der PZ zum zweiten Larvenstadium, den MZ, vermuten. Auch an den folgenden Tagen wies die mit 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelte Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen hellere und auch größere Kavitäten auf (siehe Abbildung 20). Außerdem war in der 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelten Gruppe eine größere Anzahl an bisher gebildeter Vesikel zu zählen. Ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Gruppe war durch das Mikroskop kaum feststellbar, wobei auch hier die Kavitäten der TNF- α behandelten Gruppe heller erschienen. In der Größe der Kavitäten war kein Unterschied zu sehen. Dieser Effekt der TNF- α Behandlung mit 25 ng/ml (1,44 nM) auf die Entwicklung der Kavitäten setzte sich in den folgenden Tagen weiter fort, sodass an Tag 22 und an Tag 28 in den TNF- α behandelten Gruppen die Kavitäten deutlich heller erschienen als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 20). Außerdem zeigte sich, dass die TNF- α behandelten PZ deutlich mehr Vesikel ausgebildet hatten als die Kontrollgruppe (siehe Abbildung 21).

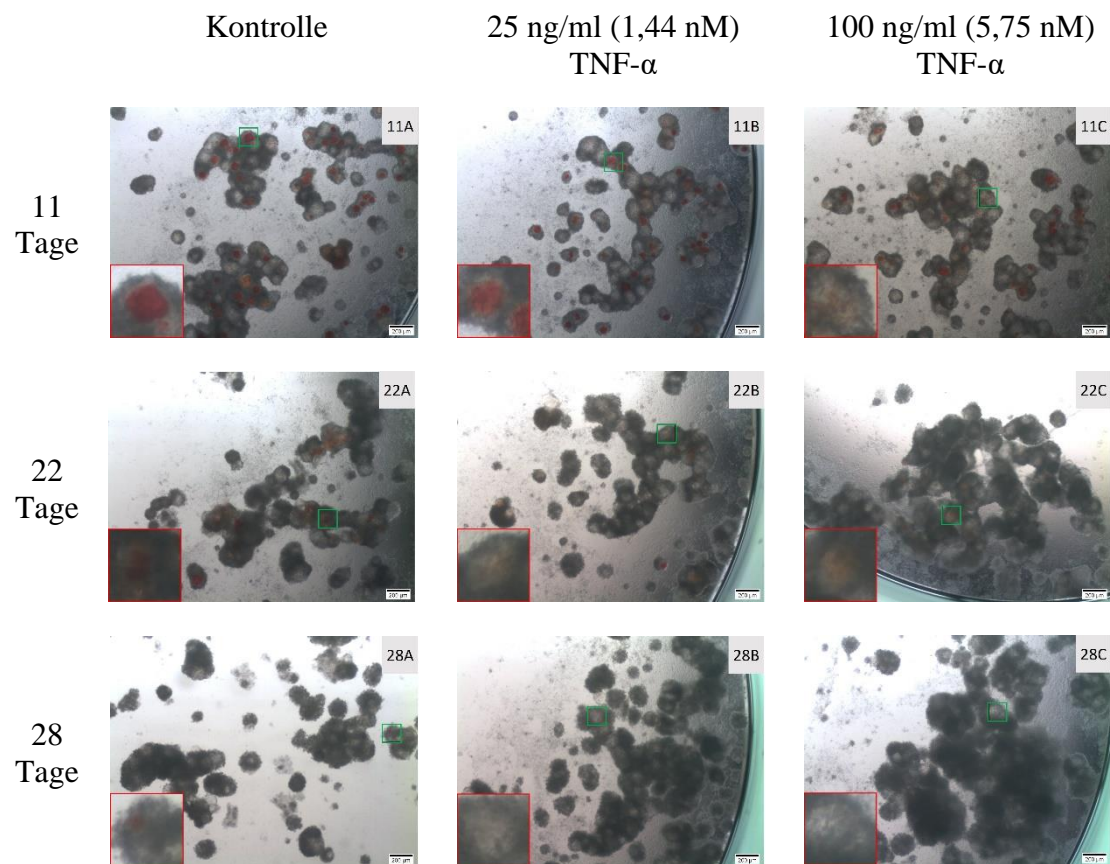


Abbildung 20: Kavitäten in Primärzellversuchen nach einer Behandlung mit TNF- α über 11, 22 und 28 Tage: PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert und mit TNF- α in angegebenen Konzentrationen behandelt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer 2,5-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die markierten Stellen im Bild (grüner Kasten) wurden mit dem Faktor 4 vergrößert und sind im roten Kasten dargestellt.

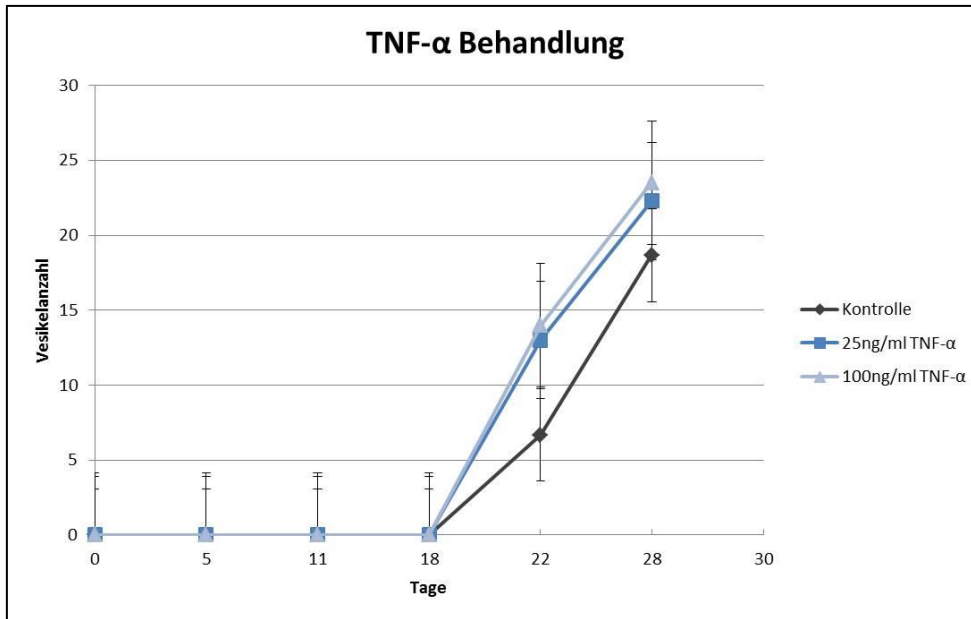


Abbildung 21: Verlauf der Vesikelbildung in der Primärzellkultur unter einer TNF- α Behandlung: PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert und mit TNF- α in angegebenen Konzentrationen behandelt. 25 ng/ml TNF- α entsprechen 1,44 nM, 100 ng/ml TNF- α entsprechen 5,75 nM. Gebildete Vesikel wurden unter dem Lichtmikroskop bei einer 2,5-fachen Vergrößerung gezählt. Sowohl Kontroll- als auch TNF- α behandelte Gruppen wurden in Triplikaten angelegt. Mittelwert \pm Standardfehler.

An Tag 28 hatte die Kontrollgruppe den Entwicklungsfortschritt der TNF- α behandelten Gruppen aufgeholt und zeigte ebenso nur noch weiße Kavitäten wie die TNF- α behandelten Gruppen. In der Anzahl der bisher gebildeten Vesikel war weiterhin ein Unterschied zu den TNF- α behandelten Gruppen zu sehen (siehe Abbildung 21). Diese hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe in der gleichen Zeit mehr Vesikel ausgebildet. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in diesem Versuch eine Behandlung der PZ mit TNF- α positiv auf die Entwicklung der Kavitäten und auch auf die Entwicklung und Bildung des zweiten Larvenstadiums, der MZ, auswirkt. Eine hohe Konzentration an TNF- α hat die Entwicklung der Kavitäten stärker beschleunigt als eine niedrige Konzentration an TNF- α . In der Ausbildung von MZ war kaum ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen einer TNF- α Behandlung zu verzeichnen. Jedoch verbesserte eine TNF- α Behandlung die MZ-Bildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Da der positive Effekt einer TNF- α Behandlung auf die Entwicklung der PZ und die Bildung von Vesikeln erst sehr spät zu sehen war, führten wir einen erneuten

Primärzellversuch mit veränderten Konditionen durch, um möglicherweise einen früheren und deutlicheren Effekt zu sehen (siehe Kapitel 6.7.3).

6.7.2 *emtnfr*-Expression während einer TNF- α Behandlung von PZ

Zur genaueren Untersuchung der Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei PZ des Fuchsbandwurmes und des Effektes einer TNF- α Behandlung auf die Expression von *emtnfr* in PZ wurden an Tag 5 und Tag 13 Proben für eine quantitative Echtzeit-PCR (kurz qPCR) entnommen. Aus den Proben wurde, wie in Kapitel 5.2.1.4 beschrieben, cDNA hergestellt. Die cDNA wurde 1:5 verdünnt und jeweils in Triplikaten, beziehungsweise die Negativkontrolle in Duplikaten, aufgetragen und gemessen. Nach 40 Amplifikationszyklen der HOT FIRE Polymerase bei 72 °C wurden die Amplifikationsprodukte mit dem Cyanin-Farbstoff SYBR-Green detektiert.

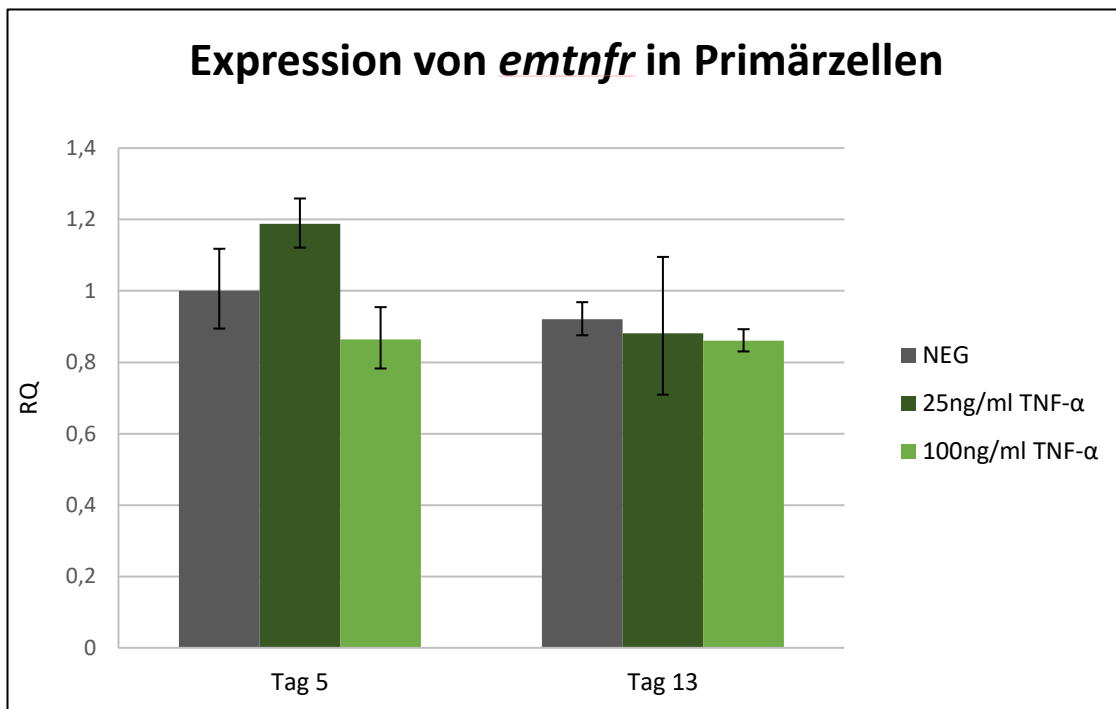


Abbildung 22: Quantitative Echtzeit-PCR der *emtnfr*-Expression in Primärzellen nach einer TNF- α Behandlung: Proben: Negativkontrolle (NEG), mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelte PZ (25 ng/ml TNF- α), mit 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelte PZ (100 ng/ml TNF- α), es wurden jeweils an Tag 5 und an Tag 13 Proben entnommen und in der quantitativen RT-PCR ausgewertet. Das Housekeeping-Gen *elp* wurde zur Standardisierung verwendet. Es erfolgte die Normalisierung auf die Negativkontrolle an Tag 5. Die Fehlerindikatoren geben die minimalen und maximalen Streuwerte an.

In der qPCR zeigte sich in den für 5 Tage mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Primärzellen ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der *emtnfr* Expression gegenüber der Negativkontrolle und ein Abfall in den für 5 Tage mit 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelten Primärzellen. Bei den 13 Tage alten Primärzellen zeigte sich jedoch keine wesentliche Differenz der *emtnfr*-Expression in den einzelnen Proben. Es konnte jedoch ein Rückgang der *emtnfr*-Expression im Laufe des Versuches verzeichnet werden. Sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Gruppe war die *emtnfr* Expression an Tag 13 geringer als an Tag 5. Die Expression von *emtnfr* bei den 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelten Primärzellen war an Tag 13 sogar unter die *emtnfr*-Expression der Negativkontrolle abgesunken. Bei der mit 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α behandelten Gruppe war hingegen die *emtnfr*-Expression an beiden Messpunkten gleich stark ausgeprägt (siehe Abbildung 22).

6.7.3 Primärzellversuch II

Im ersten Primärzellversuch hatte sich erst sehr spät ein Effekt einer TNF- α Behandlung auf die Entwicklung der PZ und die Bildung von MZ gezeigt. In einem zweiten PZ-Versuch wurde die Anzahl der PZ pro Well verändert, um möglicherweise schon früher einen positiven Effekt einer TNF- α Behandlung erkennen zu können. Es wurden 25, 50, 75, 100 und 150 Units an PZ pro Well verwendet, welche jeden dritten Tag mit TNF- α behandelt wurden. Aufgrund der geringeren Anzahl an PZ pro Well und einer verminderten Expression von *emtnfr* nach einer TNF- α Behandlung mit 100 ng/ml (5,75 nM), die im vorherigen Versuch nachgewiesen werden konnte, wurde die Konzentration der TNF- α Behandlung ebenfalls angepasst. Es wurde in diesem Versuch weiterhin eine TNF- α Behandlung mit 25 ng/ml (1,44 nM) verwendet. Anstelle der 100 ng/ml (5,75 nM) TNF- α Behandlung wurde eine deutlich niedrigere Konzentration von 10 ng/ml (0,575 nM) TNF- α eingesetzt. In dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass bei 100 Units PZ der Effekt der TNF- α Behandlung auf die Zellen am frühesten auftritt und diese den stärksten Unterschied gegenüber der Negativkontrolle zeigten, sodass im Folgenden nur auf die Ergebnisse der 100 Units-Versuchsreihe eingegangen wird. Bereits nach 5 Tagen waren in der Entwicklung der Kavitäten große Unterschiede zwischen den TNF- α behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe zu sehen. Sowohl die Behandlung

der Primärzellen mit 10 ng/ml (0,575 nM) als auch mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α haben sich positiv auf die Formierung von Aggregaten und das Wachstum der Kavitäten ausgewirkt. In beiden Gruppen waren die formierten Aggregate und die gebildeten Kavitäten deutlich größer als bei der Kontrollgruppe, wobei der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Gruppe noch deutlicher erschien als zwischen der Kontrollgruppe und der mit 10 ng/ml (0,575 nM) TNF- α behandelten Gruppe (siehe Abbildung 23). An Tag 7 konnte der positive Effekt einer TNF- α Behandlung auf das Wachstum der Kavitäten und der Aggregate weiterhin beobachtet werden. Jedoch hatte sich der Unterschied zwischen der beiden TNF- α behandelten Gruppen reduziert und die Aggregate beider Gruppen sahen nahezu gleich groß aus. Nach circa dreiwöchiger Beobachtung der PZ-Kulturen (Tag 23) waren weiterhin Unterschiede zwischen einer TNF- α Behandlung der PZ und ohne Behandlung der PZ zu sehen. Die Kontrollgruppe wies kleine Aggregate, die zu den vorherigen beiden Messpunkten an Größe zugenommen hatten, mit noch vereinzelt intensiv orangefarbenen Kavitäten auf. In den TNF- α behandelten Gruppen waren die Aggregate weiterhin größer als in der Kontrollgruppe und die Kavitäten waren deutlich blasser und bereits entfärbt (siehe Abbildung 23). Dies spricht für ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium der Kavitäten in den TNF- α behandelten Gruppen als in der Kontrollgruppe. Bei den PZ mit einer TNF- α Behandlung von 25 ng/ml (1,44 nM) waren an Tag 23 die Aggregate bereits etwas aufgelockert und die Begrenzungen unscharf. Diese Zeichen sprechen für einen beginnenden Zerfall und ein weit fortgeschrittenes Stadium der PZ-Kultur.

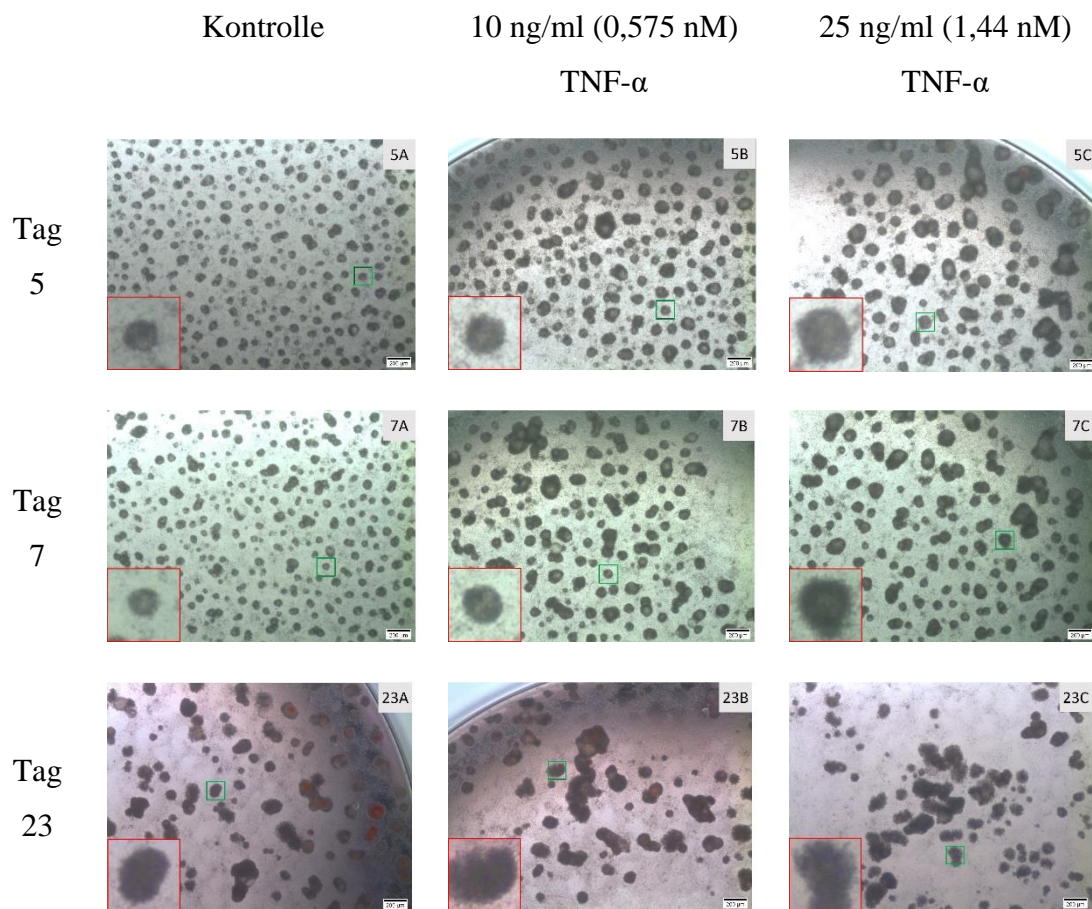


Abbildung 23: Kavitäten im Primärzellversuch nach einer Behandlung mit TNF- α über 5, 7 und 23 Tage: PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert und mit TNF- α in angegebenen Konzentrationen behandelt. Die abgebildeten PZ entsprechen den 100 Units/Well. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer 2,5-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die markierten Stellen im Bild (grüner Kasten) wurden mit dem Faktor 4 vergrößert und sind im roten Kasten dargestellt.

Während dieses Versuches wurden die Primärzellkulturen nicht nur mikroskopisch auf ihr Aussehen und die Entwicklung von Aggregaten und Kavitäten untersucht, sondern auch die Bildung von MZ regelmäßig kontrolliert und diese gezählt. Hier ließen sich ähnliche Ergebnisse wie im vorherigen Versuch (siehe Kapitel 6.7.2) feststellen. Die Behandlung der PZ mit TNF- α hatte einen positiven Effekt auf die Ausbildung von MZ und beschleunigte diese. Bereits an Tag 7 waren in allen drei Gruppen die ersten Vesikel zu sehen, wobei die TNF- α behandelten Gruppen eine signifikant höhere Anzahl an Vesikeln gebildet hatten als die Kontrollgruppe ($p=0,0086$ bei 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α und $p=0,0055$ bei 10 ng/ml (0,575 nM) TNF- α). An Tag 7 war zwischen den beiden TNF- α behandelten Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Vesikelanzahl zu

verzeichnen. In den nächsten sieben Tagen (bis Tag 14) bildeten sich in allen drei Gruppen weitere Vesikel aus. An Tag 14 hatten die mit 10 ng/ml (0,575 nM) TNF- α behandelten PZ weiterhin signifikant mehr Vesikel gebildet als die Kontrollgruppe ($p=0,0434$). Bei den mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten PZ war die Anzahl der Vesikel gegenüber der Kontrollgruppe weiterhin höher. Der Unterschied war jedoch nicht mehr signifikant. Des Weiteren hatte sich eine deutliche Differenz der ausgebildeten MZ zwischen den TNF- α behandelten Gruppen ausgebildet. An Tag 7 war die Anzahl der gebildeten MZ in den TNF- α behandelten Gruppen nahezu gleich. Eine Woche später waren in der mit 10 ng/ml (0,575 nM) TNF- α behandelten Gruppe deutlich mehr Vesikel zu verzeichnen als in der mit 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Gruppe. An Tag 20 des PZ-Versuches war in allen drei Versuchsgruppen eine ähnliche Anzahl an ausgebildeten MZ zu verzeichnen. Im Vergleich zum vorherigen Messpunkt (Tag 14) war die Anzahl der ausgebildeten Vesikel in der 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α behandelten Gruppe gering gestiegen, in der 100 ng/ml (0,575 nM) TNF- α behandelten Gruppe etwas gefallen und in der Kontrollgruppe deutlich angestiegen. Ein signifikanter Unterschied der Vesikelanzahl zwischen den Gruppen, der zu Beginn des Versuches vorhanden war, war nicht mehr zu verzeichnen.

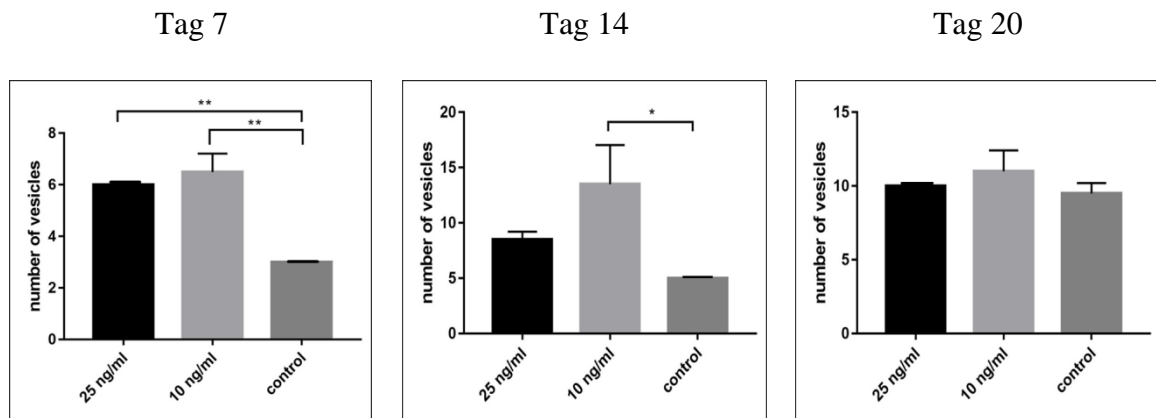


Abbildung 24: Anzahl an Vesikeln in der Primärzellkultur unter der Behandlung mit TNF- α .: PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert und mit TNF- α in angegebenen Konzentrationen behandelt. Eine TNF- α Konzentration von 25 ng/ml entspricht 1,44 nM und eine Konzentration von 10 ng/ml entspricht 0,575 nM. Die Vesikel wurden unter dem Lichtmikroskop mit einer 2,5-fachen Vergrößerung gezählt. Die Gruppen wurden in Duplikaten angelegt. Die statistische Analyse wurde mit GraphPadPrism7 für Windows mit einem Ordinary one-way ANOVA-Test mit einem multiplen Vergleichstest Dunnett-Test für alle Zeitpunkte zum Vergleich der Behandlungsgruppen (Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α) mit der Kontrollgruppe durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Signifikante Unterschiede von $p \leq 0,05$ werden mit * und von $p \leq 0,01$ werden mit ** markiert.

Zusammenfassend konnte in den PZ-Versuchen ein positiver Effekt einer TNF- α Behandlung auf die Ausbildung von großen Aggregaten und Kavitäten sowie auf die Entwicklung von MZ aus der PZ-Kultur verzeichnet werden. Dieser Effekt war vor allem in den ersten Tagen/Wochen der PZ-Kultur zu sehen und nahm im Verlauf des Versuches ab. Im ersten PZ-Versuch konnte durch eine TNF- α Behandlung in hoher Konzentration (100 ng/ml bzw. 5,75 nM) zu Beginn des Versuchs ein Vorteil in der Entwicklung der PZ jedoch auch ein schneller einsetzender Verfall der PZ-Kultur am Ende des Beobachtungszeitraumes verzeichnet werden. Dieser Effekt wurde aufgrund von morphologischen Veränderungen der PZ festgestellt. Sowohl die 10 ng/ml (0,575 nM) als auch die 25 ng/ml (1,44 nM) TNF- α Behandlung verbessern in den ersten Tagen die Ausbildung von MZ und die Entwicklung der PZ, wobei dieser positive Effekt bei einer niedrigeren TNF- α Behandlung (10 ng/ml bzw. 0,575 nM) länger anzuhalten scheint.

6.8 In vitro RNA-Interferenzversuche an Primärzellen

Nachdem in den PZ-Versuchen ein positiver Effekt einer TNF- α Behandlung auf die Entwicklung der Kavitäten und die Bildung von MZ festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage welche Bedeutung das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes in dieser Beobachtung hat und welche Auswirkungen durch einen Knockout bzw. ein Knockdown von *emtnfr* zu beobachten sind. Hierfür wurde, wie in Kapitel 5.2.5.10 beschrieben, ein Versuch mit RNA-Interferenz gegen das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie an PZ durchgeführt. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden sowohl die Negativgruppe als auch die Knockdown-Gruppe elektroporiert. Ab dem dritten Tag wurden einige Proben aus der Negativ- und der Knockdown-Gruppe mit 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α behandelt und über einen Zeitraum von circa 3 Wochen unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

6.8.1 Expression von *emtnfr* nach RNA-Interferenz

Zur Kontrolle des durchgeführten Knockdowns des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes mittels RNA-Interferenz wurden am dritten Tag des Versuches sowohl aus der Knockdown-Gruppe als auch aus der Negativgruppe Proben für eine quantitative Echtzeit-PCR entnommen. An Tag 20 des Versuches wurden ebenfalls von jeder Versuchsgruppe Proben für eine quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Langzeitwirkung der RNA-Interferenz und zur Untersuchung des Effektes von TNF- α auf die Proben entnommen. Somit wurden in der quantitativen Echtzeit-PCR sechs unterschiedliche Proben untersucht. Die Knockdown-Gruppe an Tag 3 (siRNA *emtnfr* I & II), die Kontrollgruppe an Tag 3 (NEG I & II), die Knockdown-Gruppe mit einer Behandlung von TNF- α (siRNA *emtnfr* mit TNF- α), die Knockdown-Gruppe ohne eine Behandlung mit TNF- α (siRNA *emtnfr*), die Kontrollgruppe mit einer TNF- α -Behandlung (NEG mit TNF- α) und die Kontrollgruppe ohne eine TNF- α -Behandlung (NEG). Alle Proben wurden zur Herstellung von cDNA, wie in Kapitel 5.2.1.4 beschrieben, behandelt. Die cDNA-Proben wurden 1:5 verdünnt und nach 40 Amplifikationszyklen der HOT FIRE Polymerase bei 72 °C wurden die Amplifikationsprodukte mit dem Cyanin-Farbstoff SYBR-Green detektiert, gemessen und anschließend analysiert. Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR zeigten, dass an Tag 3 nach dem Einbringen der Knockdown-Sonde die Expression von *emtnfr* in beiden Proben (siRNA *emtnfr* I & II) durch die RNA-Interferenz deutlich reduziert werden konnte (siehe Abbildung 25). Zwischen den Duplikaten der einzelnen Gruppen (NEG & siRNA *emtnfr* I & II) waren nur leichte Schwankungen in der Expression von *emtnfr* zu sehen.

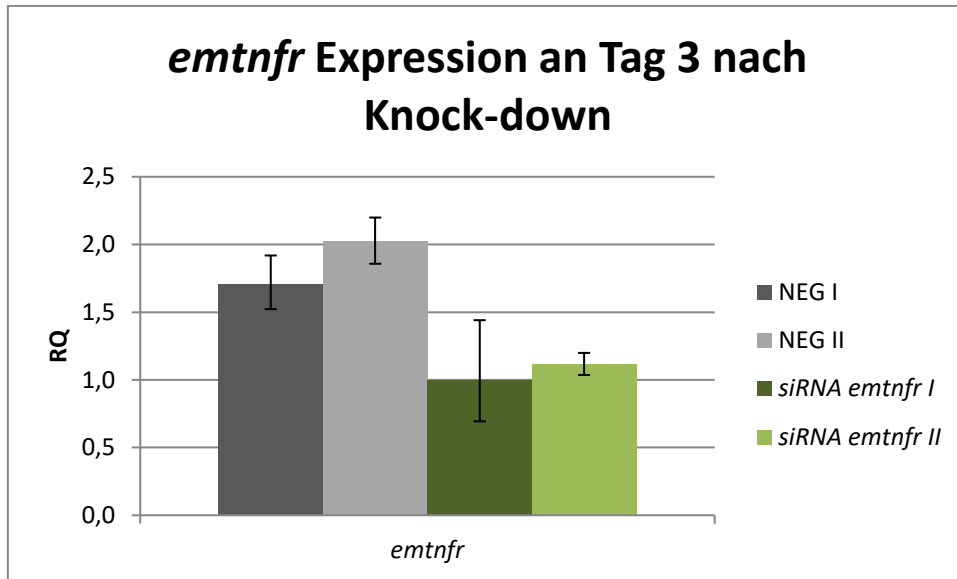


Abbildung 25: Quantitative Echtzeit-PCR der Genexpression von *emtnfr* an Tag 3: Proben: NEG I: Kontrollgruppe 1 (ohne Einbringen einer RNAi-Sonde); NEG II: Kontrollgruppe 2 (ohne Einbringen einer RNAi-Sonde); siRNA *emtnfr* I & II: Versuchsgruppe 1 & 2 (mit Einbringen einer RNAi-Sonde gegen *emtnfr*). Die Proben wurden jeweils in Triplikaten aufgetragen und gemessen. Als Kontrollgen diente das Housekeeping Gen *elp* (EmuJ_000485800). Die Proben wurden auf die Probe siRNA *emtnfr* I normalisiert. Die Fehlerindikatoren zeigen die min. & max. Streuwerte an.

Dieser Effekt konnte auch 20 Tage nach Einbringen der RNAi-Sonden beobachtet werden. In beiden Knockdown-Gruppen, also in der TNF- α behandelten (siRNA *emtnfr* mit TNF- α) und in der unbehandelten Knockdown-Gruppe (siRNA *emtnfr*), war die Expression von *emtnfr* auch an Tag 20 deutlich reduziert und im Vergleich zur Expression an Tag 3 weiter gesunken (siehe Abbildung 25 & Abbildung 26). Gegenüber der Kontrollgruppe ohne TNF- α Behandlung (NEG) konnte die Expression von *emtnfr* in den Knockdown-Gruppen um fast 80 % gesenkt werden. Gegenüber der Kontrollgruppe mit TNF- α Behandlung (NEG mit TNF- α) hatte sich die Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie um circa 50 % verringert (siehe Abbildung 26). Eine TNF- α Behandlung hatte in den Knockdown-Gruppen jedoch keine Auswirkung auf die Expression von *emtnfr*. Die Expression von *emtnfr* blieb trotz TNF- α Behandlung auf einem niedrigen Niveau. In den Kontrollgruppen, sprich in den Gruppen ohne Knockdown des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie (NEG & NEG mit TNF- α), war jedoch durch eine TNF- α Behandlung ein Unterschied in der Expression von *emtnfr* zu sehen. Die *emtnfr*-Expression war in der TNF- α behandelten Gruppe (NEG mit

TNF- α) gegenüber der unbehandelten Gruppe deutlich reduziert (um circa 50 %), jedoch weiterhin höher als in den beiden Knockdown-Gruppen. Eine mögliche Erklärung dieses Effektes wäre der Mechanismus der negativen Rückkopplung. Hierbei wirkt sich das Endprodukt eines Regelkreises negativ auf das Ausgangsprodukt aus. Auf das TNF-/TNF-Rezeptor-Systems beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* übertragen, würde dies bedeuten, dass die Expression des parasitären Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie aufgrund einer TNF- α Behandlung beziehungsweise aufgrund eines Überangebotes an TNF- α im Parasiten gehemmt wird.

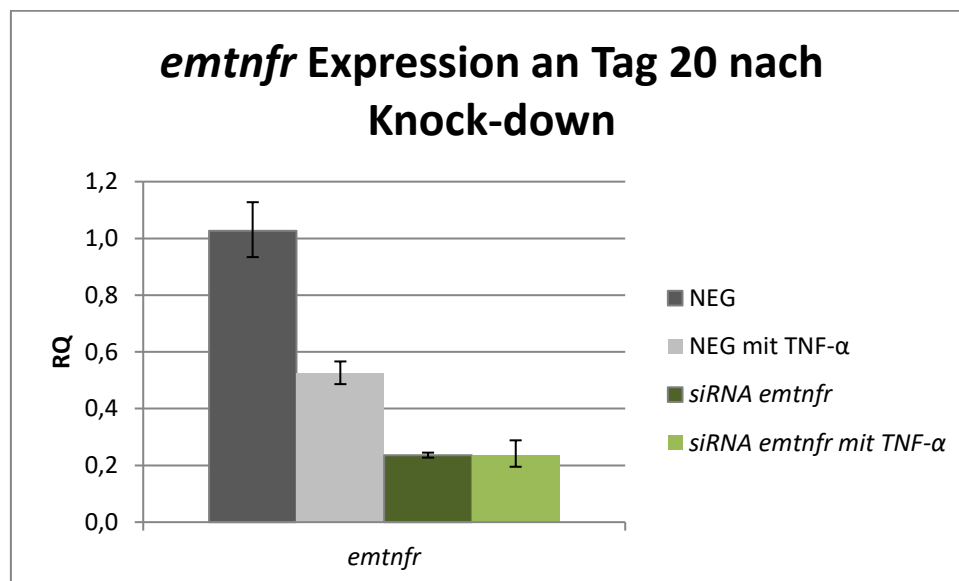


Abbildung 26: Quantitative Echtzeit-PCR der Genexpression von *emtnfr* an Tag 20 nach Knockdown: An Tag 1 des Experimentes wurde in die Knockdown-Gruppen (siRNA) eine RNAi-Sonde gegen *emtnfr* eingebracht. Ab dem dritten Tag wurde sowohl ein Teil der Kontrollgruppe als auch der Knockdowngruppe regelmäßig mit 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α behandelt. Proben: NEG ohne TNF: Kontrollgruppe ohne TNF- α Behandlung; NEG mit TNF: Kontrollgruppe mit TNF- α Behandlung; siRNA ohne TNF: Knockdown-Gruppe ohne TNF- α Behandlung; siRNA mit TNF: Knockdown-Gruppe mit TNF- α Behandlung. Als Kontrollgen wurde das Housekeeping Gen *elp* (emuj_000485800) verwendet. Es wurden von jeder Probe technische Triplikate durchgeführt. Die Fehlerindikatoren geben die min. & max. Streuwerte an.

6.8.2 *emtnfr* Knockdown beeinflusst die Kavitäten-Entwicklung in der PZ-Kultur

Neben der Entnahme von Proben zur Untersuchung der *emtnfr*-Expression nach RNA-Interferenz wurden die PZ-Proben im Verlauf lichtmikroskopisch beurteilt und die ausgebildeten MZ gezählt. Nach dem Einbringen der RNAi-Sonde an Tag 1 des PZ-Versuches wurde ab dem dritten Tag ein Teil der Gruppen regelmäßig mit 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α behandelt. Es ergaben sich vier Gruppen: Die Kontrollgruppe, die TNF- α behandelte Kontrollgruppe (Kontrollgruppe mit TNF- α), die Knockdown-Gruppe (siRNA *emtnfr*) und die TNF- α behandelte Knockdown-Gruppe (siRNA *emtnfr* mit TNF- α). Die Entwicklung der Kavitäten und die Bildung von MZ wurden in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop beobachtet und photographisch festgehalten. Hierbei konnte an Tag 12 des Versuches eine Differenz in der Größe der Kavitäten beobachtet werden. Die beiden Kontrollgruppen, sowohl die TNF- α behandelte als auch die unbehandelte Gruppe, hatten im Vergleich zu den Knockdown-Gruppen deutlich größere Kavitäten ausgebildet (siehe Abbildung 27). Ein Unterschied in der Größe der Kavitäten zwischen der Kontrollgruppe und der TNF- α behandelten Kontrollgruppe war hingegen nicht zu sehen. Die Kavitäten beider Knockdown-Gruppen waren deutlich kleiner, wiesen jedoch untereinander kaum eine Größendifferenz der Kavitäten auf. Hier scheint eine TNF- α Behandlung keinen positiven Effekt auf das Wachstum der Kavitäten zu haben.

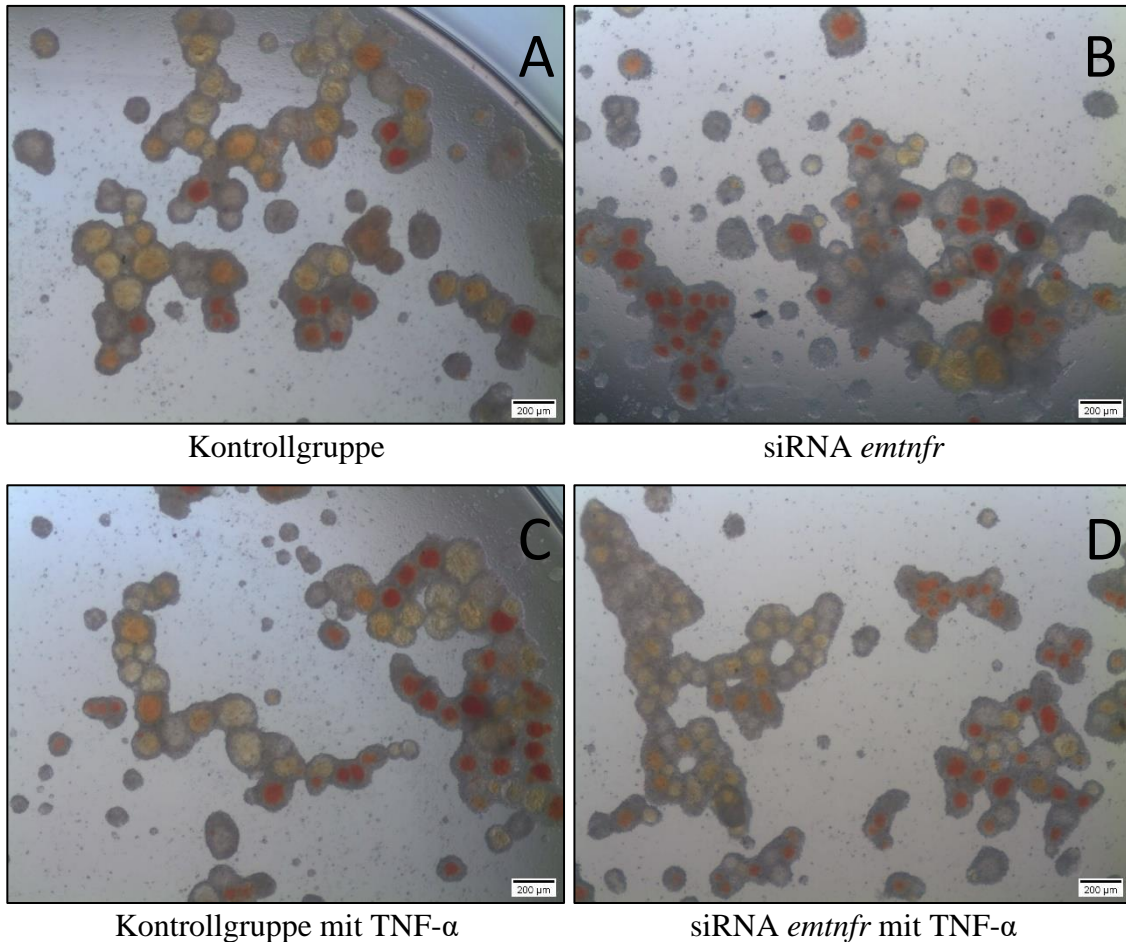


Abbildung 27: PZ-Kultur an Tag 12 nach Knockdown von *emtnfr*: Die PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert. Ein Teil der Gruppen wurde in regelmäßigen Abständen mit 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α behandelt. Die Aufnahmen wurden mit dem Lichtmikroskop bei einer 2,5-fachen Vergrößerung aufgenommen. Proben: A= Kontrollgruppe (keine RNA-Interferenz von *emtnfr*); B= siRNA *emtnfr* (RNA-Interferenz von *emtnfr*); C= Kontrollgruppe mit TNF- α (keine RNA-Interferenz von *emtnfr* aber mit TNF- α Behandlung); D= siRNA *emtnfr* mit TNF- α (RNA-Interferenz von *emtnfr* mit TNF- α Behandlung).

Zur Quantifizierung des schon optisch erkennbaren Größenunterschiedes der Kavitäten wurden die Bilder von Tag 12 der Primärzellkultur mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji analysiert (Schindelin *et al.* 2012; Schroeder *et al.* 2021). Da der Großteil der Kavitäten eine nahezu runde Form aufwies, wurde zur Größenbestimmung der einzelnen Kavität der maximale Innendurchmesser eines in die Kavitäten gelegten Kreises verwendet. Dieser Kreis sollte an keiner Stelle die Kavitätenränder überschreiten. Aus den gemessenen Durchmessern aller Kavitäten eines Bildes wurde der Mittelwert ermittelt. Dieser wurde anschließend mit den anderen Gruppen verglichen. Es wurde ein

zweiseitiger ungepaarter T-Test mit Hilfe des Programmes GraphPadPrism7 durchgeführt. Der bereits optisch nachweisbare negative Effekt einer RNA-Interferenz von *emtnfr* auf den Kavitätendurchmesser konnte in der quantitativen Messung bestätigt werden. Sowohl in der TNF- α behandelten als auch in der unbehandelten Gruppe hatte sich durch den Knockdown von *emtnfr* der Durchmesser der Kavitäten deutlich reduziert, beziehungsweise das Wachstum der Kavitäten verringert (siehe Abbildung 28). In den TNF- α behandelten Gruppen (siRNA with TNF- α & control with TNF- α) zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p= 0,0268$) des Durchmessers nach *emtnfr*-Knockdown. In den unbehandelten Gruppen (siRNA & control) zeigte sich ebenfalls eine Reduktion des Kavitätendurchmessers nach *emtnfr*-Knockdown. Dieser war jedoch statistisch nicht signifikant ($p= 0,0996$). Bei einem Vergleich der Kontrollgruppen, sprich der Kontrollgruppe und der Kontrollgruppe mit TNF- α Behandlung, konnte ein ähnlich großer Kavitätendurchmesser verzeichnet werden. Auch beim Vergleich der Knockdown-Gruppen untereinander (siRNA *emtnfr* und siRNA *emtnfr* mit TNF- α) war nur ein geringer Unterschied im Durchmesser der Kavitäten zu sehen. Somit konnte die nach der Betrachtung der PZ unter dem Lichtmikroskop festgestellte Vermutung, dass eine TNF- α Behandlung sowohl nach RNA-Interferenz von *emtnfr* als auch in der Kontrollgruppe keine Auswirkungen auf den Durchmesser der Kavitäten besitzt, in der quantitativen Messung bestätigt werden.

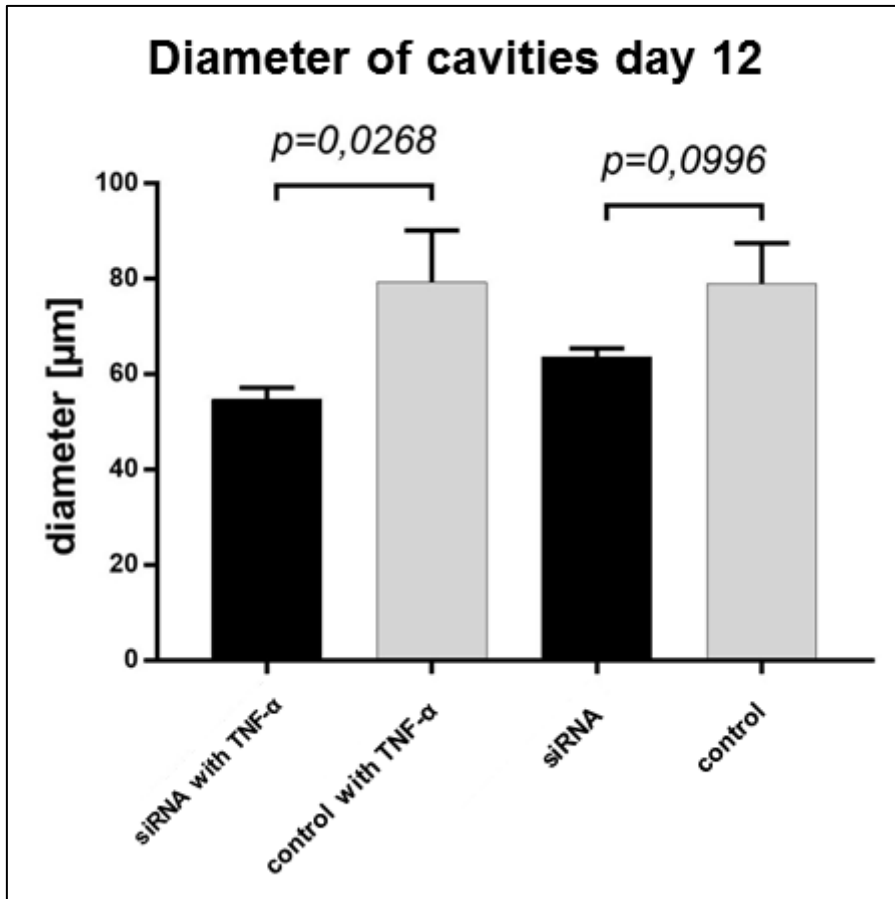


Abbildung 28: Durchmesser der Kavitäten an Tag 12 des *emtnfr*-Knockdown-Versuches: Die PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert und regelmäßig mit 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α behandelt. Die Proben lagen als Duplikate/Triplikate vor. Der Durchmesser der Kavitäten wurde mithilfe des Bildverarbeitungsprogrammes Fiji (Schindelin et al. 2012) ermittelt. Anschließend wurde für jede Probe der Mittelwert des Durchmessers der Kavitäten errechnet und dieser zur statistischen Analyse herangezogen. Es wurde mit GraphPadPrism7 ein zweiseitiger ungepaarter T-Test sowohl zwischen der Gruppe siRNA with TNF- α und der Gruppe control with TNF- α als auch zwischen der Gruppe siRNA und control durchgeführt.

Zusammenfassend konnte in beiden Versuchen gezeigt werden, dass durch eine verminderte Expression von *emtnfr* in der PZ-Kultur das Kavitätenwachstum deutlich reduziert wird. Eine zusätzliche Behandlung mit TNF- α hatte in diesem Versuch sowohl in der Knockdown- als auch in der Kontrollgruppe keinen Effekt auf den Durchmesser der Kavitäten. Somit ist *emtnfr* möglicherweise ein entscheidender Faktor in der frühen Wachstums- und Entwicklungsphase der PZ und in der Metamorphose des Fuchsbandwurmes von Primärzelle zu MZ.

6.8.3 TNF- α Behandlung fördert Vesikelbildung trotz *emtnfr*-Knockdown

Während des *emtnfr*-Knockdown-Versuches wurde nicht nur die Entwicklung und das Wachstum der Kavitäten unter dem Lichtmikroskop regelmäßig beobachtet, sondern auch die Bildung von MZ aus den Kavitäten erfasst. In den vorherigen PZ-Versuchen (siehe Kapitel 6.7) konnte bereits gezeigt werden, dass TNF- α einen positiven Effekt auf die Bildung von MZ besitzt und sich schon in den ersten Tagen der Versuche die Anzahl der gebildeten Vesikel zwischen den TNF- α behandelten Gruppen und der Negativgruppe signifikant unterscheidet. Im Verlauf hatte sich der Effekt durch eine TNF- α Behandlung immer weiter abgeschwächt bis nach einigen Tagen keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe zu erkennen waren. Ob und wie genau sich dieser Effekt durch ein Knockdown des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beeinflussen lässt, sollte in diesem Versuch geklärt werden. In den ersten Tagen (Tag 0 bis Tag 7) des Versuches zeigte sich in keiner der Gruppen eine Vesikelbildung. Erst ab dem 7. Tag begann die Bildung von MZ, welche sich in den nächsten Tagen kontinuierlich steigerte und am letzten Messpunkt (Tag 20) in allen vier Gruppen den maximalen Wert erreichte. An Tag 14 waren bereits Unterschiede in der Anzahl der gebildeten Vesikel zwischen den Gruppen zu sehen. Die TNF- α behandelte Kontrollgruppe hatte am meisten MZ ausgebildet. Die Knockdown-Gruppe hatte am wenigsten Vesikel und die Kontrollgruppe sowie die Knockdown-Gruppe mit TNF- α Behandlung hatten die gleiche Anzahl an MZ ausgebildet. Sowohl bei dem Vergleich der TNF- α behandelten Gruppen als auch der nicht behandelten Gruppen fiel auf, dass die Anzahl der MZ in den Knockdown-Gruppen geringer war als in den Kontrollgruppen. Dies konnte auch an Tag 20 weiter beobachtet werden, jedoch hatte die Differenz der ausgebildeten Vesikel zwischen den TNF- α behandelten und den nicht-behandelten Gruppen deutlich zugenommen. Sowohl die Kontrollgruppe mit TNF- α Behandlung als auch die Knockdown-Gruppe mit TNF- α Behandlung hatten gegenüber ihren Gruppen ohne TNF- α Behandlung die Anzahl an Vesikeln mehr als verdoppelt. An Tag 20 war die Anzahl an Vesikeln in der Kontrollgruppe mit TNF- α Behandlung weiterhin am höchsten. Die geringste Anzahl an Vesikeln war in der unbehandelten Knockdown-Gruppe zu sehen. Die MZ-Anzahl der Kontrollgruppe und der Knockdown-Gruppe mit TNF- α Behandlung, die an Tag 14 noch gleich hoch war, hatte sich an Tag 20 deutlich verändert.

In der Knockdown-Gruppe mit TNF- α Behandlung war die Anzahl der Vesikel rapide angestiegen, ähnlich stark wie in der Kontrollgruppe mit TNF- α Behandlung. In der Kontrollgruppe kam es zwischen Tag 14 und Tag 20 zwar auch zu einem Anstieg der Vesikelanzahl, aber dieser war deutlich schwächer ausgeprägt und zeigte einen ähnlichen Verlauf wie in der Knockdown-Gruppe ohne TNF- α Behandlung. Im Vergleich zu den vorherigen PZ-Versuchen war bei diesem Versuch ein sehr später Beginn der Vesikelbildung zu verzeichnen. Diese Verzögerung könnte dadurch erklärt werden, dass eine Elektroporation, eine Schädigung der Zellmembran, zum Einbringen der RNAi-Sonde notwendig gewesen ist und die PZ einige Zeit zur Regeneration benötigt haben. Um eine Verfälschung zu vermeiden, wurden auch die PZ der Kontrollgruppe elektroporiert, obwohl hier keine RNAi-Sonde in die Zellen eingebracht wurde.

Zusammenfassend konnte dieser Versuch zeigen, dass TNF- α trotz Knockdown von *emtnfr* einen Einfluss auf die Vesikelbildung hat und diese deutlich verbessert. Dennoch zeigte sich, dass ein Knockdown von *emtnfr* die Bildung von Vesikeln negativ beeinflusst, wenn auch nur in sehr geringem Ausmaß.

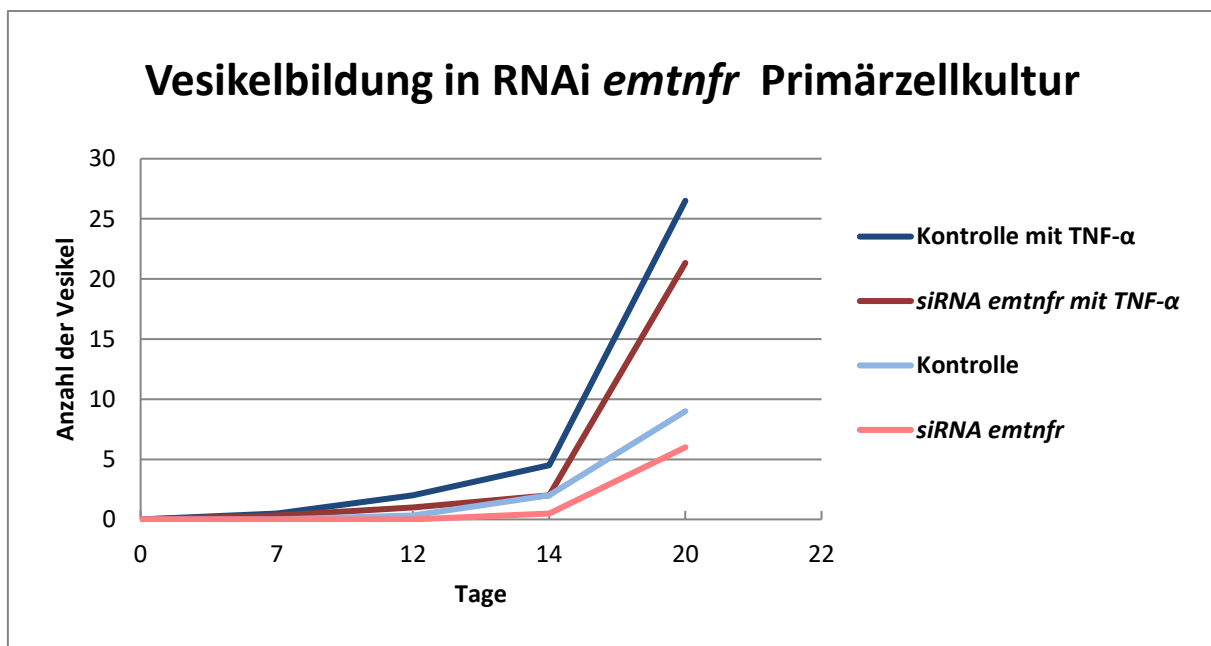


Abbildung 29: Vesikelbildung in der Primärzellkultur im Verlauf über 20 Tage nach dem Knockdown von *emtnfr*: Die PZ wurden unter axenischen Bedingungen kultiviert und ab dem dritten Tag mit 50 ng/ml (2,87 nM) TNF- α behandelt. Die Vesikel wurden an den angegebenen Tagen unter dem Lichtmikroskop bei 2,5-facher Vergrößerung gezählt. Die Proben lagen als Duplikat/Triplikate vor.

6.9 Herstellung von Antikörpern gegen EmTNFR

Ein großer Bestandteil der Doktorarbeit und den Arbeiten im Labor war der Herstellung von murinen polyklonalen Antikörpern gegen den extrazellulären Bereich des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* gewidmet. Mit Hilfe der Antikörper gegen EmTNFR ergaben sich vielfältige Möglichkeiten die Expression des Rezeptors in verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes auf Proteinebene zu untersuchen. Zum einen bestand die Möglichkeit mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen den extrazellulären Teil von EmTNFR eine mögliche lösliche Rezeptorform, die in den Transkriptomdaten vorhergesagt wurde, im Medium aus der Zellkultur untersuchen zu können. Ein weiteres Ziel der Antikörperherstellung war die Detektion von EmTNFR auf der Oberfläche der verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes, aber vor allem im Stadium der MZ, die das pathogene Stadium der AE darstellen. Von großem Interesse war hierbei die Verteilung des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie auf der Vesikeloberfläche und eine mögliche Koexistenz mit weiteren wichtigen Rezeptoren des Fuchsbandwurmes. Die hieraus möglich zu erhebenden Ergebnisse könnten eine wichtige Funktion in der Detektion von Angriffspunkten möglicher Medikamente gegen den Fuchsbandwurm ergeben und somit neue Therapieoptionen der AE eröffnen. Ebenso wurden die spezifisch hergestellten Antikörper in einem quantitativen Western Blot, der bereits in Kapitel 6.5.1 beschrieben wurde, zur Untersuchung der Expression von EmTNFR auf Proteinebene verwendet. Hierbei wurde das Proteom der verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes in einem quantitativen Western Blot aufgetragen und der Anteil von EmTNFR am gesamten Proteom bemessen. Somit konnten auf Proteinebene die vorhergesagten Transkriptomdaten experimentell untersucht werden.

6.9.1 Amplifikation des extrazellulären Bereiches von EmTNFR & Transformation in *Escherichia coli*

Zur Herstellung der spezifischen Antikörper gegen das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm wurden die natürlichen Mechanismen eines Immunsystems zur Abwehr von einem fremden Agens verwendet. Sobald ein unbekanntes Agens, in diesem Fall der extrazelluläre Teil von EmTNFR mit einem Immunsystem eines Organismus in Berührung kommt, wird eine Immunreaktion zur Abwehr des Agens eingeleitet (Akira et al. 2006). Hierbei werden Immunzellen aktiviert, die zum einen das Antigen unverzüglich aufspüren und zerstören und zum anderen sich in sogenannte Plasmazellen entwickeln (Kenneth Murphy 2001a). Plasmazellen besitzen die Fähigkeit spezifische Antikörper gegen das Agens zu bilden. Die Antikörper ermöglichen eine Markierung des Antigens und somit eine schnellere Erkennung und Zerstörung des fremden Agens durch die Immunzellen. Bei einem erneuten Befall des Organismus mit dem gleichen Antigen verhelfen die zuvor spezifisch gebildeten Antikörper eine schnellere Registration des Antigens und somit eine beschleunigte Immunantwort (Kenneth Murphy 2001b). Die gebildeten Antikörper befinden sich im Blut und können mit Hilfe von einer Blutentnahme aus dem Organismus entnommen, aufgereinigt und weiterverarbeitet werden. Um diesen Mechanismus des Immunsystems nutzen zu können, musste zunächst ein rekombinantes Protein hergestellt werden, das nur aus dem extrazellulären Abschnitt des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie vom Fuchsbandwurm besteht, vom Immunsystem eines Organismus als Antigen erkannt werden kann und eine Antikörperbildung im Organismus aktiviert. Zur Herstellung des rekombinanten TNF-Rezeptors wurde zunächst durch bioinformatische Analysen der extrazelluläre Abschnitt von *emtnfr* identifiziert und anschließend spezifische Primer designet (EmuJ_000990500 Dw-2: 5' GAAAACCTGTATTTTCAGGGACATGCCCTTCAAC AATCT 3'; Rev-3: 5' GAAATCAGTTTCTGTTCTAGTTAGTGGAAATTCAGCCT CTG 3'). Mittels PCR konnte aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Stadien des Fuchsbandwurmes der Abschnitt von *emtnfr* extrahiert werden, der den extrazellulären Bereich von EmTNFR codiert. Das gewonnene Fragment wurde, wie in der Einleitung der Arbeit beschrieben, in ein Plasmid kloniert, in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert, sequenziert und anschließend analysiert. Nach einer erfolgreichen Klonierung und Transformation in

E. coli wurde mit den positiven Klonen eine Übernachtskultur zur Induktion der Expression des rekombinanten EmTNFR angesetzt. Es wurden verschiedene *E. coli* Stämme, wie TOP10, BL21, T7, T7 rare, T7 shuffle und Rosetta verwendet. Mit dem *E. coli* Stamm Rosetta konnte schließlich das weiter verwendete rekombinante Protein hergestellt werden. Zur Kontrolle der Expression des rekombinanten TNF-Rezeptors wurde ein Western Blot durchgeführt. In folgendem Coomassie-Gel wurden jeweils Duplikate eines *E. coli* Klons mit integriertem Plasmid nach der Induktionskultur aufgetragen. Für das rekombinante Protein des extrazellulären Abschnitts von EmTNFR wurde eine Bande bei einer Größe von ca. 28 kDa berechnet. Diese molare Masse setzte sich aus der molaren Masse des extrazellulären Abschnittes von EmTNFR, ca. 23 kDa und der molaren Masse des V5-Epitopes und des His-Tags zusammen. Im abgebildeten Coomassie-Gel zum Nachweis des rekombinanten TNF-Rezeptors aus der Induktionskultur ist in keiner der Säulen eine Bande bei ca. 28 kDa zu sehen.

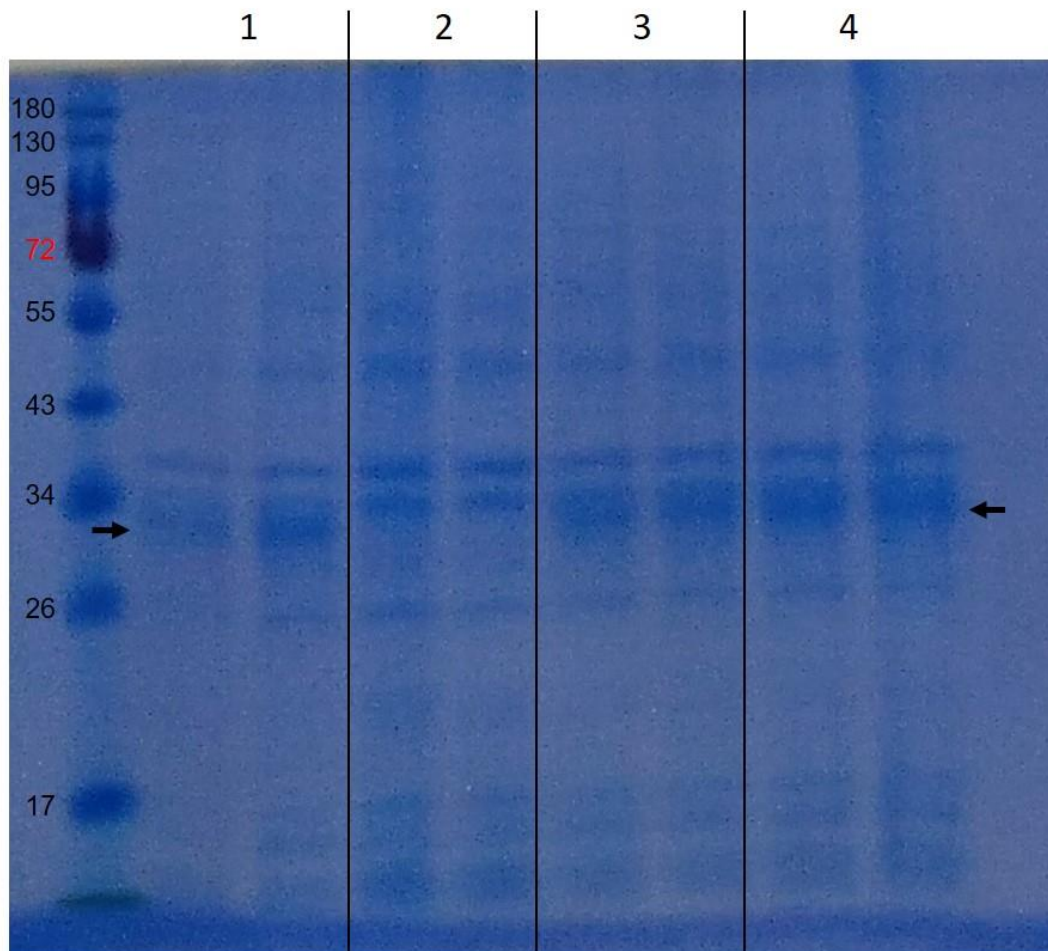


Abbildung 30: Coomassie-Gel zum Nachweis des rekombinanten EmTNFR aus Induktionskultur: Verschiedene Rossetta-Klone (1 bis 4), die cDNA des rekombinanten EmTNFR enthalten, wurden aus Induktionskultur als Duplikate aufgetragen und das SDS-Gel mit Coomassie eingefärbt; die Bande des rekombinanten EmTNFR lag bei ca. 32 kDa und ist mit Pfeilen markiert. Klon 1 exprimiert rekombinanten EmTNFR nur schwach, Klon 2 gar nicht und Klon 3 & 4 sehr stark.

Die ersten beiden Säulen, die zu Klon 1 gehören, haben nur eine schwache Bande bei 32 kDa gezeigt. Bei Klon 2 war hingegen bei 32 kDa keine Bande zu sehen. Bei Klon 3 und 4 konnte eine breite Bande bei ca. 32 kDa verzeichnet werden. Aufgrund der fehlenden Bande auf der Höhe der berechneten molaren Masse und den starken Banden bei ca. 32 kDa wurden aus den Kulturen von Klon 1, 3 und 4 das Protein, wie in Kapitel 5.2.3.5 beschrieben, aufgereinigt. Der folgende Western Blot (siehe Abbildung 31) zeigte das Ergebnis nach der Protein-Aufreinigung und der Elution des rekombinanten TNF-Rezeptors. Als erster Antikörper zum Nachweis des rekombinanten TNF-Rezeptors wurde ein Antikörper gegen das V5-Epitop, das zuvor bei der Klonierung zusammen mit

einem His-Tag eingebaut worden war, verwendet. In der ersten Säule wurde der Marker aufgetragen. In der zweiten Säule wurde die *E. coli* Übernachtskultur vor der Aufreinigung als Kontrollbande aufgetragen. Die dritte Säule enthielt den Überstand der *E. coli* Kultur, der nach einer Ultraschallbehandlung entstanden war. Der Überstand enthielt den rekombinanten TNF-Rezeptor und wurde weiter zur Protein-Aufreinigung verwendet. Im Western Blot waren im Überstand (Säule 3) schon deutlich weniger unspezifische Banden als Zeichen einer Verunreinigung und eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe für das gewünschte Protein zu sehen. Die vierte Säule enthielt den Durchlauf der Protein-Aufreinigung, der nach dem Binden der Proteine an die Aufreinigungssäule entstanden war. Hier konnte keine Bande auf der entsprechenden Höhe nachgewiesen werden, sodass der Großteil des rekombinanten TNF-Rezeptors erfolgreich an die Aufreinigungssäule gebunden hatte. Säule fünf und sechs zeigten die Elutionen nach der Protein-Aufreinigung. Hier waren nur noch geringe Mengen an unspezifischen Banden und klare Banden bei 32 kDa zu verzeichnen. Auch in diesem Western Blot war die Höhe der Bande nicht exakt mit der berechneten molaren Masse des rekombinanten EmTNFR übereinstimmend. Da jedoch der Western Blot mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop durchgeführt wurde, wurde angenommen, dass die Bande bei 32 kDa der Bande des rekombinanten TNF-Rezeptors entspricht und dieser etwas höher läuft als berechnet.

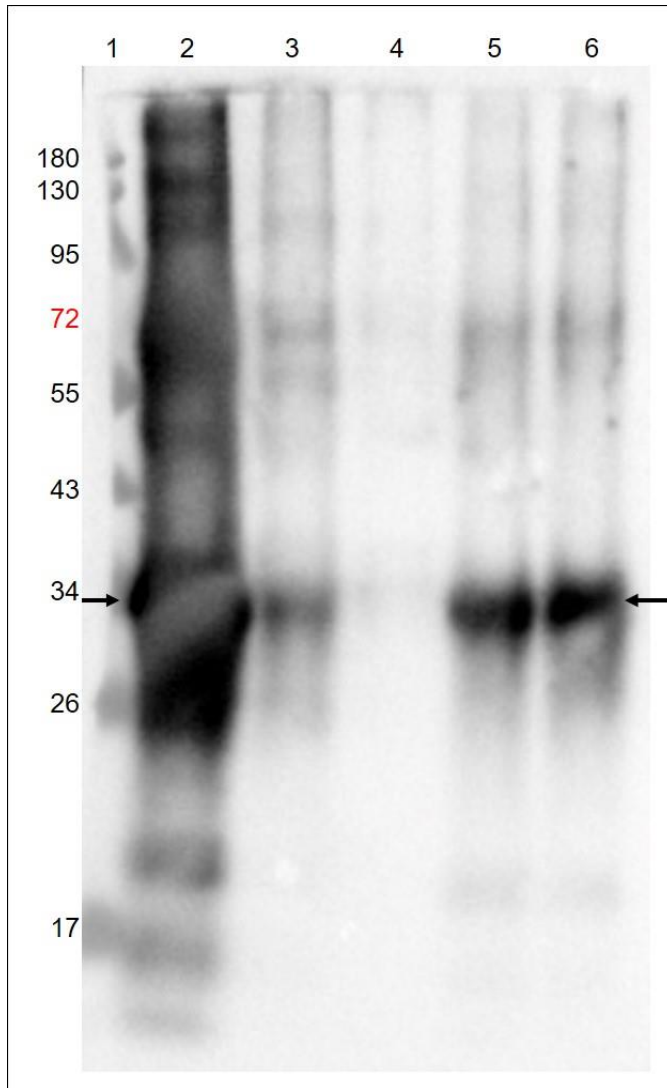


Abbildung 31: Western Blot nach Protein-Aufreinigung des rekombinanten Proteins des extrazellulären Abschnittes von EmTNFR: Säule 1: Marker; Säule 2: Übernachtskultur von *Escherichia coli* mit kloniertem Protein; Säule 3: Überstand der Übernachtskultur nach Ultraschallbehandlung; Säule 4: Durchlauf der Protein-Aufreinigung; Säule 5: erste Elution nach Protein-Aufreinigung; Säule 6: zweite Elution nach Protein-Aufreinigung, das rekombinante Protein des extrazellulären Abschnittes von EmTNFR ist circa 32 kDa groß.

Das aufgereinigte Protein konnte nun zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet werden. Hierfür wurde eine geringe Menge des Proteins zwei Mäusen injiziert. Vor der ersten Injektion des Proteins wurde den Mäusen Blut als Negativkontrolle entnommen. Die Injektionen wurden in einem Abstand von je zwei Wochen dreimal durchgeführt. Aus früheren Arbeiten aus dem Gebiet der Immunologie geht hervor, dass Saponin ein guter Verstärker der Immunantwort auf das injizierte Agens darstellt und die Antikörperbildung verbessern kann (White et al. 1991; Campbell and Peerbaye 1992).

Zur Nutzung des positiven Effektes von Saponin auf die Antikörperbildung in Mäusen wurde dieses zur Injektionslösung in geringer Menge hinzugefügt. Die nun gebildeten Antikörper gegen den rekombinanten TNF-Rezeptor wurden, wie in Kapitel 5.2.3.6 beschrieben, gewonnen, aus dem Blut separiert und aufgereinigt. Ein initialer Test zur Kontrolle der Antikörperherstellung wurde mittels Dot Blot durchgeführt (siehe Abbildung 32). Hierbei wurde der rekombinante TNF-Rezeptor auf eine Western Blot Membran geträufelt. Anschließend wurde die Membran mit dem Serum der Mäuse, das die Antikörper enthalten sollte, inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde alkalische Phosphatase verwendet. Probe 1 und 2 wurden in diesem Versuch als Negativkontrollen verwendet. Bei Probe 1 wurde nur TBST als 1. Antikörper verwendet und bei Probe 2 wurde als 1. Antikörper das Serum verwendet, das vor der ersten Injektion des rekombinanten TNF-Rezeptors den Mäusen entnommen worden ist. Sowohl bei Probe 1 als auch bei Probe 2 war keine Reaktion zu sehen. Der rekombinante TNF-Rezeptor konnte auf der Membran nicht nachgewiesen werden. Bei Probe 3 bis 6 wurden als 1. Antikörper Seren nach Immunisierung der Mäuse verwendet. Probe 3 und 4 sowie Probe 5 und 6 stammen jeweils von einer Maus. Probe 3 und 5 sind Seren, die nach der ersten Injektion des rekombinanten TNF-Rezeptors entnommen worden sind und Nummer 4 und 6 sind Seren, die nach der letzten Injektion des rekombinanten TNF-Rezeptors entnommen worden sind. In allen vier Proben konnte der rekombinante TNF-Rezeptor als deutlicher Punkt auf der Western Blot Membran nachgewiesen werden. Bei Probe 6 war im Vergleich zu Probe 5 eine deutliche Zunahme der Reaktion zu erkennen, sodass von einem deutlichen Anstieg der Antikörperkonzentration im Serum nach einer wiederholten Injektion des rekombinanten TNF-Rezeptors auszugehen ist.

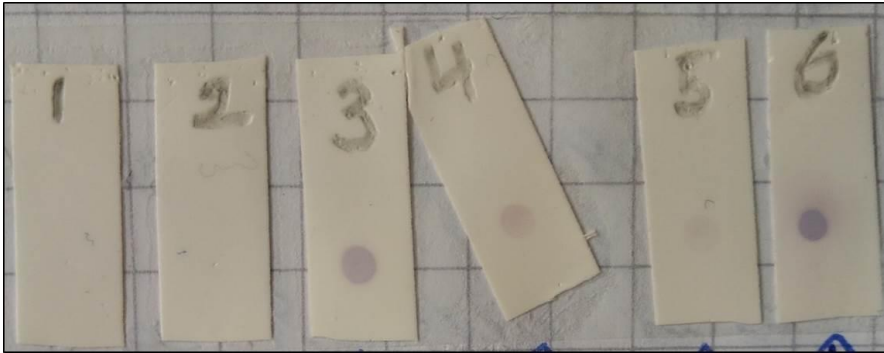


Abbildung 32: Dot Blot des rekombinanten TNF-Rezeptors: Auf die Western Blot Membran wurde jeweils der rekombinante TNF-Rezeptor aufgetragen. Als erster Antikörper (AK) wurden jeweils verschiedene Proben verwendet wie im Folgenden angegeben und die Western Blot Membran mit diesen inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten wurde als zweiter Antikörper eine anti-mouse alkalische Phosphatase verwendet. In Probe 1 wurde TBST als 1. AK verwendet; Probe 2: Serum vor der ersten Injektion des rekombinanten TNF-Rezeptors; 3: Serum der Maus 74 nach der ersten Injektion; 4: Serum der Maus 74 nach der zweiten Injektion; 5: Serum der Maus 75 nach der ersten Injektion; 6: Serum der Maus 75 nach der zweiten Injektion.

Um sicher zu stellen, dass die polyklonalen Antikörper nicht nur an das rekombinante Protein der extrazellulären Region von EmTNFR sondern auch gegen den extrazellulären Abschnitt von EmTNFR in Fuchsbandwurmproben binden können, wurde ein Western Blot durchgeführt. Hier wurden verschiedene Proben von Fuchsbandwurmstadien auf eine Western Blot Membran geblottet und anschließend mit den hergestellten Antikörpern inkubiert. Als Zweitantikörper wurde anti-Maus alkalische Phosphatase verwendet. In Abbildung 33 konnte gezeigt werden, dass bei ca. 60 kDa eine klare Bande in allen Proben zu erkennen war. Wie bereits in Kapitel 6.5 beschrieben, ergab die Berechnung der molaren Masse von EmTNFR 51,77 kDa. Aufgrund einer möglichen Glykosylierung von EmTNFR im extrazellulären Bereich und einer damit möglicherweise einhergehenden Erhöhung der molaren Masse um circa 10 kDa, wurde die Bande bei 60 kDa für EmTNFR als die richtige Bande angenommen. Eine genauere Erläuterung hierzu ist im Abschnitt 7.3 der Diskussion dieser Arbeit zu finden. Dennoch zeigten sich im Western Blot viele unspezifische Banden, sodass von einer Verunreinigung der Antikörperlösung mit vielen unspezifischen Antikörpern auszugehen war. Daher wurde, wie in Kapitel 5.2.3.7 beschrieben, eine Aufreinigung der Antikörperlösung durchgeführt.

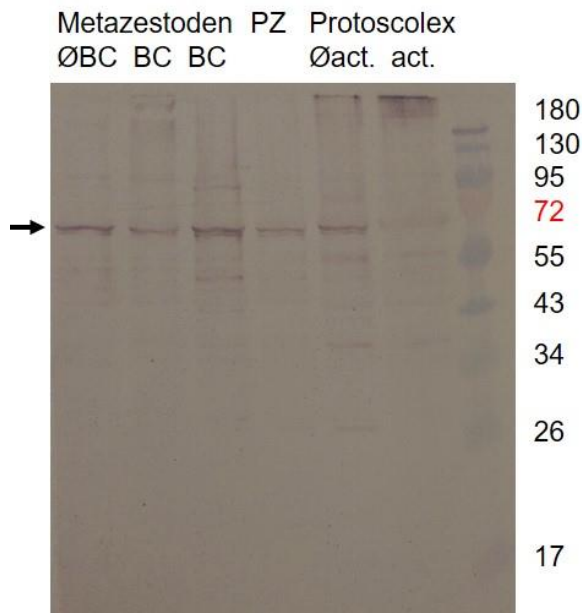


Abbildung 33: Western Blot zum Nachweis von EmTNFR in verschiedenen Proben des Fuchsbandwurmes: verschiedene Fuchsbandwurmstadien wurden aufgearbeitet und im Western Blot aufgetragen, als 1. Antikörper wurde der eigens hergestellte polyklonale Antikörper gegen den extrazellulären Bereich von EmTNFR verwendet, 2. Antikörper: anti-mouse alkalische Phosphatase, die Bande für EmTNFR ist bei ca. 60 kDa zu erwarten (durch Pfeil markiert), Proben: Säule 1-3: MZ (MZ), Säule 1: MZ ohne Brutkapseln vom Isolat GH09, Säule 2 & 3: MZ mit Brutkapseln von dem Isolat MS1010 und H95, Säule 4: Primärzellen, Säule 5: nicht aktivierte Protoskolics aus dem Isolat DDD, Säule 6: aktivierte Protoskolics aus dem Isolat DDD, Säule 7: Marker

In Abbildung 34 ist ein Western Blot mit MZ mit Brutkapseln als Proben zu sehen, bei dem als 1. Antikörper sowohl der aufgereinigte polyklonale α -EmTNFR in unterschiedlichen Konzentrationen (1:25 und 1:100 verdünnt) als auch das Originalserum verwendet worden ist. Beim Western Blot mit dem Originalserum als 1. Antikörper ist eine starke Verunreinigung durch unspezifische Banden zu erkennen, die in den Western Blots mit dem aufgereinigten polyklonalen α -EmTNFR nicht mehr zu sehen sind, so dass die Aufreinigung der Antikörper wohl erfolgreich war. Die spezifischen Banden für EmTNFR erscheinen bei den Western Blots mit den aufgereinigten polyklonalen α -EmTNFR nur sehr schwach, was einen Verlust von α -EmTNFR durch die Aufreinigung vermuten lässt. In den folgenden Western Blots sollte eine geringe Verdünnung zur besseren Darstellung der spezifischen Bande für EmTNFR eingesetzt werden.

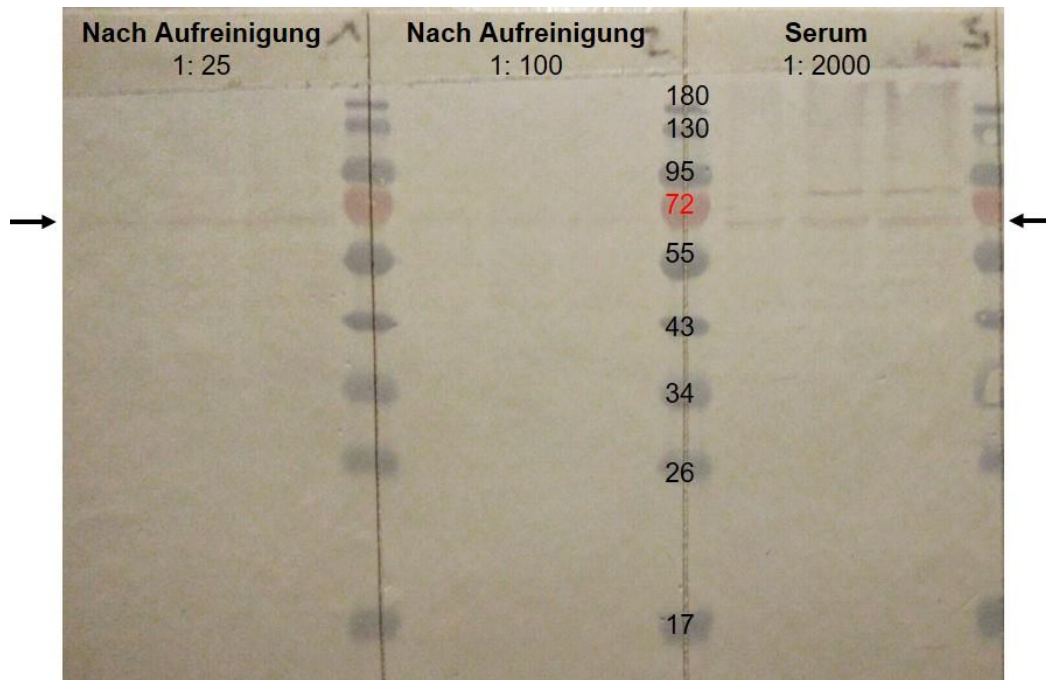


Abbildung 34: Western Blot zum Nachweis von EmTNFR in verschiedenen Fuchsbandwurmpollen mit aufgereinigtem polyklonalem α -EmTNFR: Auf den Western Blot wurden MZ mit Brutkapseln aufgetragen, 1. Antikörper: aufgereinigter polyklonaler α -EmTNFR in verschiedenen Konzentrationen (1. & 2. Western Blot) bzw. Originalserum im 3. Western Blot; deutliche Verunreinigungen im 3. Western Blot zu sehen, die in WB 1 & 2 nach der Aufreinigung von α -EmTNFR nicht mehr zu sehen sind. EmTNFR-Bande bei 1:100 Verdünnung nur noch sehr schwach zu sehen.

6.10 Untersuchung eines löslichen TNF-Rezeptors bei *E. multilocularis*

Laut den Transkriptomdaten, die bei der Entschlüsselung des Genoms von *E. multilocularis* erstellt worden sind (Tsai *et al.* 2013), exprimiert der Fuchsbandwurm eine lösliche Form eines Rezeptors der TNF-Rezeptor-Superfamilie. In dieser Doktorarbeit konnte durch bioinformatische Analysen gezeigt werden, dass die Transkriptomdaten nur den extrazellulären Bereich des TNF-Rezeptors beim Fuchsbandwurm darstellen und sowohl der transmembranöse als auch der intrazelluläre Abschnitt des Rezeptors nicht erfasst worden sind. Daher hat sich die Frage gestellt, ob die Transkriptomdaten fehlerhaft waren beziehungsweise nur ein Teil des TNF-Rezeptors entschlüsselt wurde oder ob möglicherweise sowohl eine lösliche als auch eine membrangebundene Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* existieren. Die Existenz sowohl einer membrangebundenen als auch einer löslichen Form von EmTNFR wären für den Parasiten im Kampf gegen die Immunantwort des Wirtes von entscheidender Rolle. Durch die Existenz einer löslichen Form von EmTNFR hätte der Parasit die Möglichkeit TNF- α , das vom Wirt zur Abwehr eines Pathogens sezerniert wird, zu binden und zu neutralisieren und hätte dadurch einen weiteren Mechanismus zur Abwehr der Immunreaktion des Wirtes.

Aufgrund des erhöhten Expressionsmusters des 5'-Endes von *emtnfr*, der den extrazellulären Bereich und damit die lösliche Form des TNF-Rezeptors kodiert, gegenüber der membrangebundenen Form, war zu vermuten, dass sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm existieren. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde das Kulturmedium mit Hilfe des eigens hergestellten polyklonalen Antikörpers auf die lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie untersucht. Falls beim Fuchsbandwurm zwei Formen eines Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie existieren sollten, stellte sich zusätzlich die Frage, ob diese durch ein oder zwei Transkripte entstehen. Diese Frage wurde durch Polymerasekettenreaktionen (PCR) und quantitative Echtzeit-PCRs analysiert.

6.10.1 Quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Anzahl der Transkripte des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis*

Zur Untersuchung der Transkriptanzahl für die membrangebundene und mögliche lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (kurz qPCR) durchgeführt. Hierfür wurde für beide möglichen Transkripte des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie ein Primerpaar geplant und bestellt. Ein Primerpaar für das kurze Transkript (F_000990500-kurz & R_000990500-kurz), das in den Transkriptomdaten vorhergesagt wurde und eine lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie codiert, und ein Primerpaar für das lange Transkript (F_000990500 & R_000990500), das zusätzlich zum extrazellulären Bereich noch den transmembranösen und den intrazellulären Bereich codiert. Als Proben wurden verschiedene MZ aus Zellkulturversuchen verwendet, cDNA nach dem Protokoll aus Kapitel 5.2.1.4 aus den MZ extrahiert und eine -PCR, wie in Kapitel 5.2.2.2 durchgeführt. Falls beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* zwei Transkripte für ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, sprich für einen membrangebundenen und einen löslichen Rezeptor, vorliegen, müsste die Expression des kurzen Transkripts höher sein als die Expression des langen Transkripts. Bei jeder Amplifikation des langen Transkripts, das eine membrangebundene Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie codiert, wird das kurze Transkript, das eine lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie codiert, den N-Terminus von *emtnfr* enthält und damit ein Bestandteil des langen Transkripts darstellt, automatisch mitabgelesen. Bei der Amplifikation des möglichen kurzen Transkripts wird jedoch das lange Transkript nicht mit amplifiziert. Somit würde eine gleiche Höhe der Amplifikationsprodukte in der qPCR für nur ein Transkript des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis* sprechen. Wenn beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* zwei Transkripte des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie vorliegen, müssten sich die Amplifikationsprodukte in der qPCR in ihrer Höhe unterscheiden und das kurze Transkript deutlich höher amplifiziert werden. In der Auswertung der qPCR zeigte sich, dass die Expression beider Transkripte nahezu übereinstimmt. Bei den unbehandelten MZ (NEG und MZ) konnte eine nahezu identische Expressionshöhe beider Transkripte

nachgewiesen werden. Bei den MZ, die zuvor mit TNF- α behandelt wurden, war die Expression des kurzen Transkripts, das einen möglichen löslichen TNF-Rezeptor codiert, minimal erhöht (siehe Abbildung 35). Aufgrund der nahezu identischen Expressionshöhe beider Transkripte des TNF-Rezeptors, ist davon auszugehen, dass nur ein Transkript im Fuchsbandwurm *E. multilocularis* existiert.

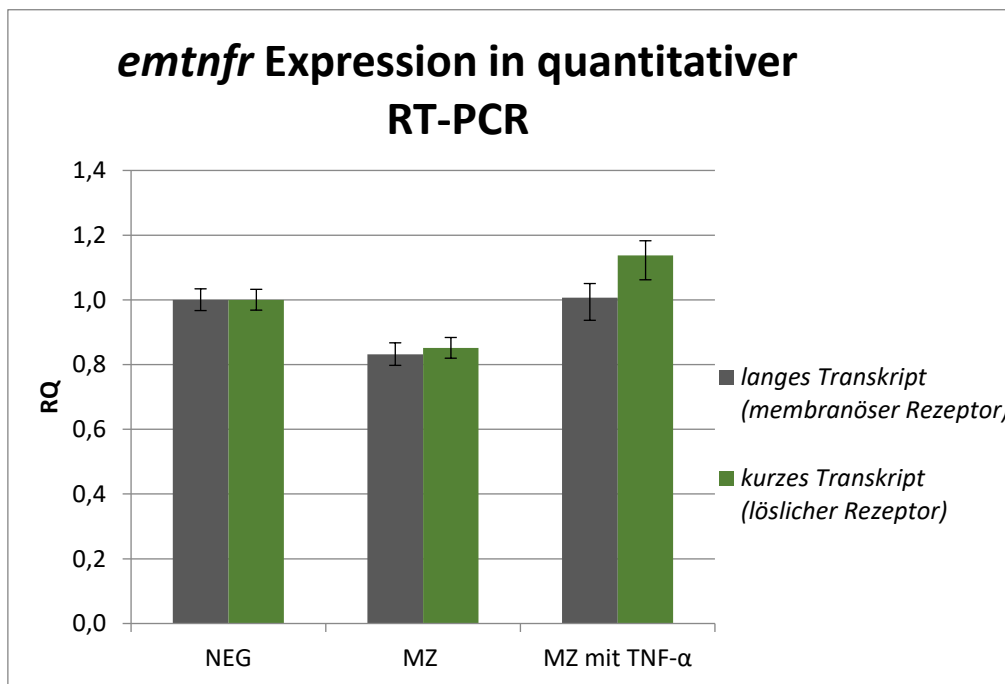


Abbildung 35: Quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Anzahl der Transkripte von *emtnfr*: Proben: unbehandelte MZ (NEG), unbehandelte MZ (MZ), mit TNF- α behandelte MZ (MZ mit TNF- α), aus den Proben wurde cDNA hergestellt, die in der qPCR verwendet wurde. Zuvor wurden sowohl für das kurze als auch das lange Transkript des TNF-Rezeptors Primer designed und in der qPCR verwendet. Von jeder Probe wurden technische Triplikate durchgeführt und zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen ELP verwendet.

Zur cDNA-Herstellung aus den verschiedenen MZ wurden neben oligo(dT)Primern ebenfalls random Primer verwendet. Diese besitzen eine zufällige Sequenz und können nicht nur am Poly-A-Schwanz, sondern überall an die meisten RNA-Arten binden. Hierdurch wird die Chance auf ein Amplifikationsprodukt in der qPCR erhöht. Die mit den random Primern hergestellte cDNA wurde ebenfalls in der qPCR verwendet. In der Auswertung dieses Versuches konnte das Ergebnis der vorherigen qPCR bestätigt werden. Auch in diesem Versuch war die Expression beider möglichen Transkripte nahezu identisch (siehe Abbildung 36). Bei den unbehandelten MZ (Neg random & MZ

random) war die Expression des kurzen Transkripts minimal geringer als die Expression des langen Transkripts. Bei den MZ, die in der Zellkultur mit TNF- α behandelt wurden (MZ mit TNF- α), war das kurze Transkript etwas höher exprimiert als das Lange. Diese geringen Unterschiede der Expression waren jedoch für den Nachweis von zwei Transkripten des TNF-Rezeptors zu gering und sind wohl durch technische Fehler und Ungenauigkeiten bei der qPCR entstanden. Aufgrund der geringen Anzahl der Versuchsansätze war eine Signifikanztestung nicht möglich, dennoch konnte in beiden qPCR-Versuchen nur ein Transkript des TNF-Rezeptors beim Fuchsbandwurm nachgewiesen werden. Es ist jedoch weiterhin möglich, dass sowohl eine membrangebundene als auch eine lösliche Form von *emtnfr* beim Fuchsbandwurm existieren, die durch unterschiedliche Prozessierung der RNA entstehen können.

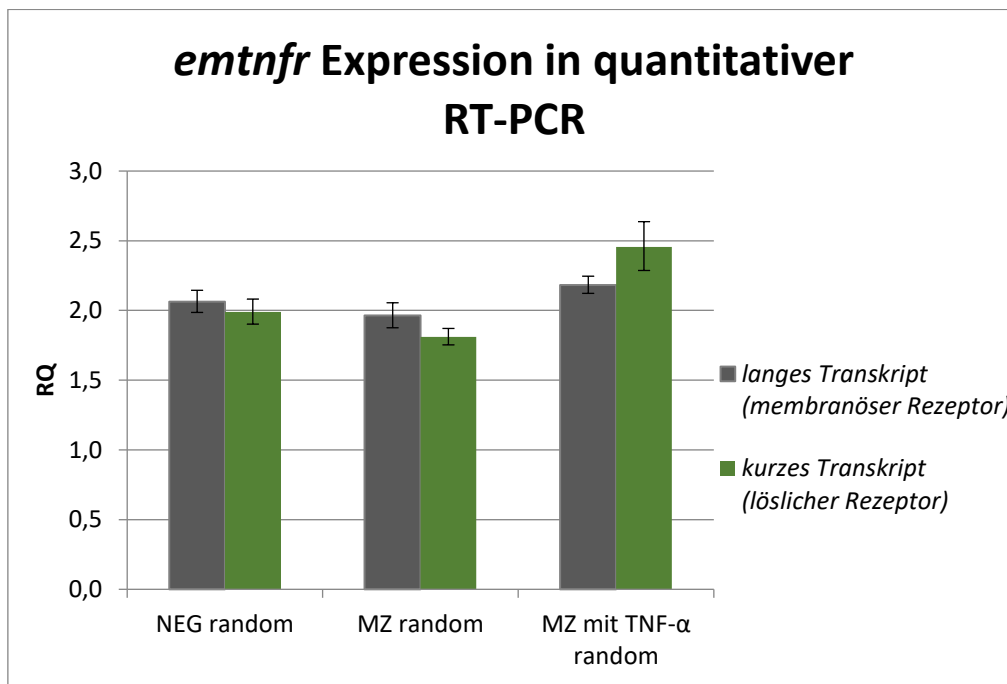


Abbildung 36: Expression von *emtnfr* (kurzes & langes Transkript) in qPCR mit Verwendung von random Primer: Proben: unbehandelte MZ (NEG random); unbehandelte MS1010-MZ (MZ random) und mit TNF- α behandelte MZ (MZ mit TNF- α random). Aus den Proben wurde cDNA mit der Verwendung von random Primer hergestellt. Diese wurden in der qPCR mit den zuvor hergestellten Primern für das lange und kurze Transkript des TNF-Rezeptors bei *E. multilocularis* verwendet. Jede Probe wurde in einem technischen Triplikate aufgetragen. Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen ELP verwendet.

6.10.2 Untersuchung eines löslichen TNF-Rezeptors im Zellkulturmedium

In den bereits durchgeführten PCR- und qPCR-Versuchen konnte bisher eine lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis* nicht nachgewiesen werden. Zur weiteren Untersuchung dieser Thematik wurde das Zellkulturmedium aus der in vitro-Zellkultur des Fuchsbandwurmes auf die lösliche Form von EmTNFR getestet. Wenn eine lösliche Form des TNF-Rezeptors beim Fuchsbandwurm exprimiert und in genügender Menge sekretiert wird, müsste dieser im Zellkulturmedium, das mit MZ und auch PZ inkubiert war, nachzuweisen sein. Zum Nachweis des löslichen TNF-Rezeptors wurden die spezifisch hergestellten polyklonalen Antikörper gegen den extrazellulären Bereich von EmTNFR (α -EmTNFR) verwendet. Es wurde sowohl Zellkulturmedium aus der PZ- als auch aus der MZ-Kultur gesammelt und steril filtriert bevor es weiterverwendet wurde. Die möglichen löslichen Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie wurden mit Hilfe der polyklonalen Antikörper durch eine Immunpräzipitation, wie in Kapitel 5.2.3.7 beschrieben, aus dem Medium extrahiert. Das Eluat der Immunpräzipitation wurde mittels Western Blot untersucht. Im Western Blot wurden das Eluat der Immunpräzipitation (Säule 2 & 3), das rekombinante Protein von EmTNFR als Kontrolle (Säule 6), zwei Proben von verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes (2 Tage alte Primärzellen (Säule 8) und MZ mit Brutkapseln (Säule 9)), Medium, das noch nicht in der Zellkultur verwendet wurde (Säule 4), Zellkulturmedium aus der Futterzellkultur (Säule 5) und Futterzellen (Säule 7) aufgetragen. Durch das Auftragen des unverwendeten Mediums, des Mediums aus der Futterzellkultur und der Futterzellen sollte ausgeschlossen werden, dass TNF-Rezeptoren von anderen Zellen gebildet, in das Medium sezerniert und von den polyklonalen Antikörpern (α -EmTNFR) erkannt werden. Die lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie sollte nach bioinformatischer Berechnung eine Bandengröße von 24,7 kDa aufweisen. In den Eluaten der Immunpräzipitation (Säule 2 & 3), die den möglichen löslichen TNF-Rezeptoren enthalten sollten, konnte eine Bande bei circa 25 kDa, die gut mit der Bande für den löslichen TNF-Rezeptor vereinbar wäre, nachgewiesen werden. Zusätzlich zu der Bande bei 25 kDa war in den beiden Eluaten der Immunpräzipitation (Säule 2 & 3) ebenfalls eine Bande bei ca. 60 kDa zu sehen, die der membrangebundenen Form von EmTNFR entsprechen könnte. In Säule 4, die das

unverwendete Zellkulturmedium enthielten, war ebenfalls eine kleine Bande bei 60 kDa zu verzeichnen, die jedoch beim Auftragen der Proben durch ein Übertreten der benachbarten Probe (Säule 3) entstanden sein könnte. Da diese Bande sich nicht über die gesamte Säulenbreite, sondern nur über den linken Säulenrand erstreckt, ist eine Kontamination durch Probe 3 sehr wahrscheinlich. Im Zellkulturmedium aus der Futterzellkultur (Säule 5) und den Futterzellen (Säule 7) waren keine Banden im Western Blot nachweisbar. Der rekombinante TNF-Rezeptor (Säule 6) konnte in diesem Western Blot durch eine deutliche Bande bei ca. 32 kDa nachgewiesen werden. In diesem Western Blot konnte in den Proben von verschiedenen Fuchsbandwurmstadien (Säule 8 & 9) keine Bande, die einem TNF-Rezeptor des Fuchsbandwurmes, weder der lösliche noch der membrangebundene, nachgewiesen werden. Zum Nachweis der membrangebundenen Form von EmTNFR war in den vorherigen Versuchen eine hohe Konzentration von α -EmTNFR Antikörpern notwendig gewesen, sodass die Konzentration in diesem Western Blot wahrscheinlich zu gering war. Aufgrund dieser Tatsache könnte es sich bei den Banden in den Eluatn der Immunpräzipitation (Säule 2 & 3) auch um ein anderes Protein, wie zum Beispiel um leichte und schwere Ketten von zerfallenen Antikörpern handeln.

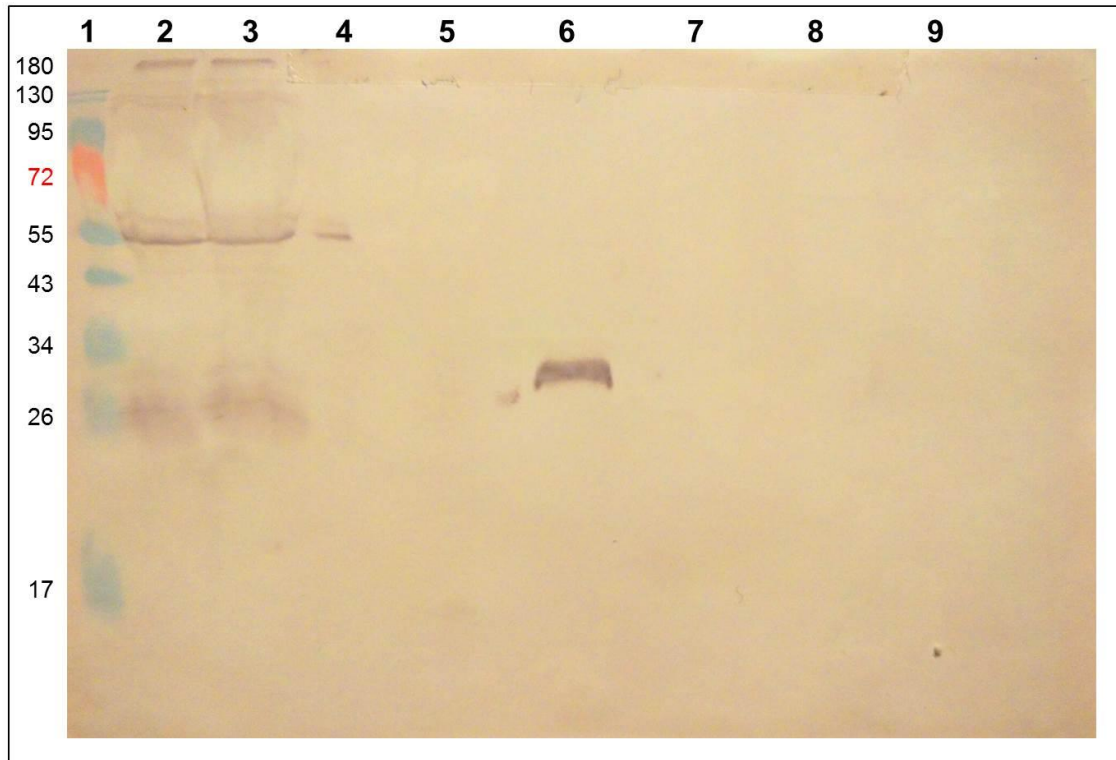


Abbildung 37: Western Blot zum Nachweis einer löslichen Form von EmTNFR aus dem Zellkulturmedium: Proben: 1) Marker, 2 & 3) Eluat nach Immunpräzipitation je 5 & 15 μ l, 4) unbenutztes Zellkulturmedium, 5) Medium aus der Futterzellkultur, 6) rekombinanter EmTNFR, 7) Futterzellen, 8) 2 Tage alte Primärzellen, 9) MZ mit Brutkapseln. Von jeder Probe wurden 5 μ l aufgetragen. Bei Säule 3 wurden 15 μ l aufgetragen. Als 1. Antikörper wurden polyklonale Antikörper gegen EmTNFR verwendet, als 2. Antikörper wurde α -alkalische Phosphatase verwendet. Entwickelt wurde mit alkalischer Phosphatase bis die Banden gut sichtbar waren.

Diese können vom polyklonalen Antikörper α -EmTNFR (Primärantikörper) nicht gebunden werden. Jedoch kann der Sekundärantikörper, der regulär an den Primärantikörper bindet und über ein signalbildendes Molekül die spezifische Bande sichtbar macht, an die Ketten der zerfallenen Antikörper binden.

Jeder Antikörper setzt sich aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten zusammen. Die schwere Kette hat eine ungefähre Größe von 50 kDa und die leichte Kette von ca. 25 kDa. Durch den Zerfall von Antikörpern lösen sich die einzelnen Antikörperketten voneinander und können im Medium nachgewiesen werden (Kenneth Murphy 2001b).

Zur weiteren Untersuchung der nachgewiesenen Banden wurde ein neuer Western Blot mit dem Eluat der Immunpräzipitation, das die lösliche Form von EmTNFR enthalten

sollte, und der rekombinanten Form von EmTNFR als Kontrolle durchgeführt. Zusätzlich wurden die polyklonalen Antikörper gegen EmTNFR (α -EmTNFR), wie in Kapitel 5.2.3.12 beschrieben, mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Durch die Fluoreszenzmarkierung von α -EmTNFR konnte die spezifische Bande für EmTNFR bereits mit dem Primärantikörper ohne die Verwendung des unspezifischen Sekundärantikörpers sichtbar gemacht werden. Die Bande für die rekombinante Form von EmTNFR (Säule 3) konnte durch die Fluoreszenzmarkierung gut nachgewiesen werden (siehe Abbildung 38A). Im Eluat der Immunpräzipitation hingegen erschien bei ca. 25 kDa und damit in der ungefähren Größe des löslichen TNF-Rezeptors keine Bande, sodass davon auszugehen war, dass die Bande bei ca. 25 kDa im vorherigen Western Blot der leichten Kette von zerfallenen Antikörpern entsprochen hat (siehe oben). Des Weiteren konnte in diesem Western Blot eine klare Bande auf der Höhe von ca. 60 kDa, die der Größe des membrangebundenen TNF-Rezeptors entspricht, nachgewiesen werden. Diese Form des TNF-Rezeptors sollte in der Regel nicht im Zellkulturmedium zu finden sein, da er an die Membran der Fuchsbandwurmzellen gebunden ist. Jedoch konnte bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass der Fuchsbandwurm und einige weitere parasitäre Helminthen extrazelluläre Vesikel an ihre Umgebung absondern und somit zusätzlich ihren Wirt beeinflussen bzw. mit diesem in Interaktion treten können. Diese extrazellulären Vesikel können aufgrund ihrer Größe und ihrer Entstehung in Mikrovesikel (50 - 1000 nm) und Exosomen (50 - 150 nm) unterschieden werden (Cucher et al. 2021). Solch kleine Partikel können durch das sterile Filtern des Kulturmediums (Porengröße der Filter: 0,22 μ m) nicht aus diesem entfernt werden und könnten somit in dem Eluat der Immunpräzipitation weiterhin enthalten sein. Die Bandengröße würde ebenfalls zu bovinem Serumalbumin (BSA) passen, das im Zellkulturmedium enthalten ist und als Kontamination weiterhin im Eluat der Immunpräzipitation nachweisbar ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Western Blot mit Antikörpern gegen BSA inkubiert und anschließend entwickelt (siehe Abbildung 38B). Hier konnte die Bande bei ca. 60 kDa weiterhin nachgewiesen werden, wohingegen die Bande für die rekombinante Form von EmTNFR nicht mehr zu sehen war. Die nachgewiesene Bande könnte somit BSA entsprechen. Aufgrund der sehr ähnlichen Konfiguration der Bande bei ca. 60 kDa in Bild A und B, bestand die Frage, ob diese Bande möglicherweise sowohl dem membrangebundenen Rezeptor als auch

bovinem Serumalbumin entsprechen könnte. Durch das Erhitzen der Proben auf 95°C vor dem Auftragen auf das SDS-Gel werden vermutlich auch Mikrovesikel und Exosomen zerstört und der membrangebundene TNF-Rezeptor könnte dadurch in Lösung vorliegen. Wenn man die beiden Bilder (Bild A & B) genau übereinanderlegt, dann kann man erkennen, dass der untere Abschnitt der Bande bei 60 kDa in Bild B genau der Bande in Bild A in der 2. Säule entspricht. Aufgrund dieser Ergebnisse vermute ich, dass die Bande bei ca. 60 kDa sowohl dem membrangebundenen TNF-Rezeptor von *E. multilocularis* als auch BSA entspricht. Aufgrund der sehr großen und intensiven Bande in Bild B ist davon auszugehen, dass eine große Menge an BSA in der Probe vorhanden ist. Dadurch wird die Bande für den membrangebundenen TNF-Rezeptor zusammengeschoben und erscheint als dünne aber breite Bande in Bild A.

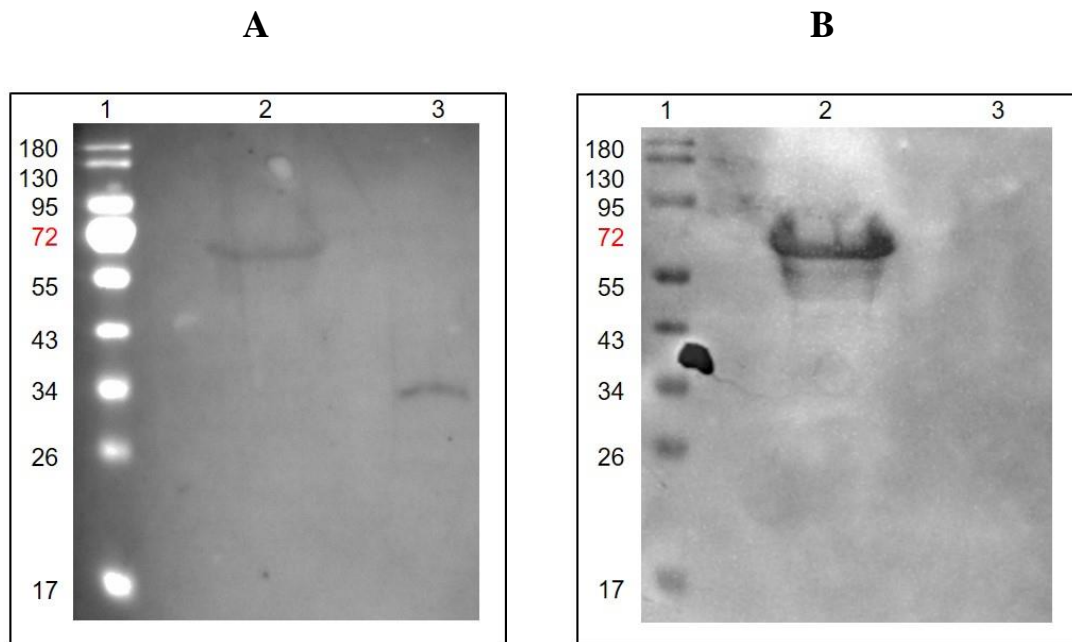


Abbildung 38: Western Blots zur Untersuchung unklarer Banden: A) Western Blot mit FITC markierten α -EmTNFR, B) identischer Western Blot zu A) jedoch mit α -BSA als Antikörper, Proben: Marker (Säule 1), Eluat der Immunpräzipitation des Zellkulturmediums (Säule 2), rekombinante Form von EmTNFR (Säule 3)

In Zusammenschau aller Versuchsergebnisse sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene konnte kein sicherer Nachweis für eine lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis* erbracht werden, sodass von einer unvollständigen Vorhersage von *emtnfr* in den Transkriptomdaten auszugehen ist. Der membrangebundene EmTNFR konnte sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

6.11 Whole-mount in situ Hybridisierung (WMISH)

Die Untersuchungen der Lokalisation von EmTNFR in MZ mit Hilfe der hergestellten polyklonalen Antikörper gegen den extrazellulären Bereich des Rezeptors ließen eine globale Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie auf MZ vermuten. Diese wurde, wie in Kapitel 5.2.5.7 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der nur geringen Menge des hergestellten Antikörpers, der zum Teil noch verunreinigt war und vereinzelt unspezifische Signale anzeigte, wurden bei diesen Versuchen keine Bilder gemacht. Dennoch konnte gezeigt werden, dass *emtnfr* ubiquitär in den MZ exprimiert wird und keine lokale Häufung zu erkennen war. Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation von *emtnfr* (grün) in MZ wurde eine Whole-mount in situ Hybridisierung durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Markierung von proliferierenden Zellen ein EdU-Labeling (rot), wie in Kapitel 5.2.5.12 beschrieben, und zur Markierung von DNA eine Färbung mit DAPI (blau) durchgeführt. Die Whole-mount in situ Hybridisierung und deren Vorbereitungen wurden von Monika Bergmann durchgeführt und mir für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die drei folgenden Bilder (Abbildung 39) zeigen Aufnahmen von MZ unter dem Konfokalmikroskop. Hierauf ist zu sehen, dass die MZ bereits die Ausbildung von Protoskolices in den Brutkapseln begonnen haben, das für ein fortgeschrittenes Stadium der Vesikel spricht. Einige Protoskolices (mit „▶“ markiert) zwar vollständig entwickelt, jedoch noch invaginiert. Bei diesem Larvenstadium des Fuchsbandwurmes war keine Expression von *emtnfr* zu verzeichnen (grüner Kanal). Des Weiteren wiesen diese Protoskolices keine proliferierenden Zellen auf (roter Kanal). Bei den noch invaginierten Protoskolices (mit „◆“ markiert) konnte ebenfalls keine Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* verzeichnet werden (grüner Kanal). Diese unterschieden sich jedoch von den bereits vollständig ausgebildeten Protoskolices im Nachweis von proliferierenden Zellen, die durch eine Markierung mit EdU detektiert werden konnten. *emtnfr* konnte durch ein starkes Signal (grün) ubiquitär auf den MZ nachgewiesen werden. Ein lokal stark erhöhtes Expressionsmuster von *emtnfr* auf den MZ war hierbei nicht zu erkennen. Ebenfalls war

keine Ko-Lokalisation der Expression von *emtnfr* und der EdU-Färbung von proliferierenden Zellen nachweisbar.

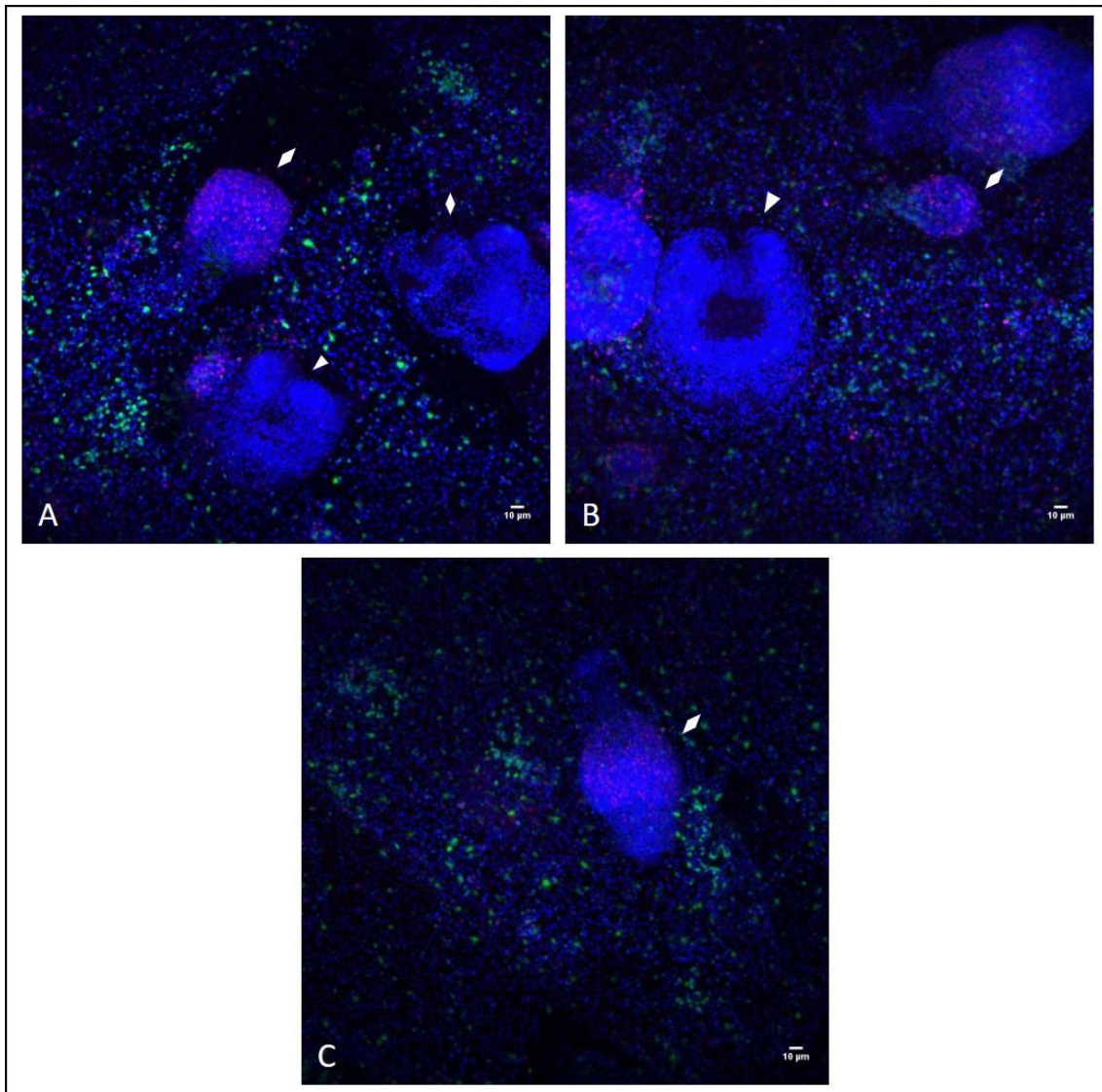


Abbildung 39: Whole-mount *in situ* Hybridisierung von *emtnfr* in MZ: Die drei Bilder zeigen Aufnahmen aus dem Konfokalmikroskop von MZ. Die Emissionskanäle von DAPI (blau), EdU (rot) und *emtnfr* (grün) wurden kombiniert. DAPI markiert DNA, EdU markiert proliferierende Zellen, *emtnfr* markiert Zellen, die ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie exprimieren. ►: invaginierter Protoskolex, ◆: evaginierter Protoskolex, Protoskolices bilden sich bei älteren MZ in den Brutkapseln aus, junge MZ besitzen noch keine Brutkapseln.

Dies lässt vermuten, dass das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* nicht spezifisch für germinative Zellen, eine Population von undifferenzierten Stammzellen, ist, sondern in differenzierten und nicht proliferierenden Zellen exprimiert wird. Die fehlende Expression von *emtnfr* in Protoskolices jeglichen Alters zeigt, dass *emtnfr* vor allem für MZ spezifisch und essenziell ist und bestätigt die geringe Expression von *emtnfr* bei Protoskolices in den Transkriptomdaten. Die MZ, das für die Infektion des Zwischenwirtes ursächliche Larvenstadium des Fuchsbandwurmes, wird vor allem in der frühen Phase der Infektion mit den Abwehrmechanismen des Wirtes, die unter anderem eine erhöhte Produktion und Sekretion von TNF- α beinhalten, konfrontiert. Genau diese MZ, die sehr jung sind und keine Brutkapseln zur Produktion von Protoskolices besitzen, exprimieren ubiquitär *emtnfr*, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes.

7 Diskussion

7.1 *E. multilocularis* besitzt 3 EmTNFR-Varianten

Schon seit vielen Jahrzehnten beschäftigt sich die Forschung mit der Entdeckung und Charakterisierung von Tumornekrose-Faktor-Rezeptoren und deren Funktionen in diversen Organismen. Bereits 1975 wurde durch die Entdeckung von TNF-alpha der Grundstein der TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie gelegt (Carswell *et al.* 1975). Bis heute sind beim Menschen 29 verschiedene TNF-Rezeptoren und ihre spezifischen Liganden bekannt (Aggarwal *et al.* 2012). Die TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie ist eine sehr große, heterogene und vielseitige Familie mit sehr unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Rezeptoren und ihren Liganden. Eine zentrale Rolle besitzt die TNF-/TNFR-Superfamilie im Immunsystem. Hier wirken sie in der Entwicklung sekundär lymphatischer Organe, der Ausbildung einer adaptiven Immunabwehr und dem Erhalt des Gleichgewichtes zwischen Immunabwehr und -toleranz mit (Locksley *et al.* 2001). Aber auch zum Auf- und Abbau von Knochen, der Ausbildung von Schweißdrüsen und Haarfollikeln, der Bildung von sensorischen Neuronen und der Einleitung bzw. Beendigung einer akuten Immunreaktion trägt die TNF-/TNFR-Superfamilie bei (Locksley *et al.* 2001; Croft *et al.* 2013). Nicht nur bei physiologischen Reaktionen, sondern auch bei pathologischen Entwicklungen, wie zum Beispiel bei der Entstehung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Erkrankungen oder bei Krebserkrankungen spielt die TNF-/TNFR-Superfamilie eine entscheidende Rolle (Croft *et al.* 2013).

In dieser Arbeit konnte ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie beim Fuchsbandwurm *E. multilocularis* (im Folgenden EmTNFR) charakterisiert werden. *emtnfr* codiert einen membrangebundenen Rezeptor mit vier cysteinreichen Domänen in der extrazellulären Region, die ein Charakteristikum der TNF-Rezeptor-Superfamilie und essenziell für die Ligandenbindung sind. In der intrazellulären Region besitzt EmTNFR eine Todesdomäne, wodurch dieser zu der Gruppe der Todesrezeptoren unter den TNF-Rezeptoren gezählt werden kann. Sowohl die Untersuchung der Transkriptomdaten als auch die Sequenzierung von *emtnfr* konnten eine Isoform, welche durch Alternatives Splicing entsteht, identifizieren. Die Isoform von EmTNFR (EmTNFRv2) unterscheidet sich ausschließlich im intrazellulären Bereich von EmTNFR, besitzt nach dem Stand

unserer Untersuchungen, keine intrazelluläre Todesdomäne und kann daher nicht zu den Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie gezählt werden.

Bereits 2020 wurden Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei verschiedenen Plathelminthen untersucht. Hier konnten ebenfalls 2 Varianten des Rezeptors der TNFR-Superfamilie bei *E. multilocularis* durch *in silico* Analysen nachgewiesen werden (Bertevello et al. 2020). Jedoch unterscheiden sich die Ergebnisse in der Existenz einer intrazellulären Todesdomäne von unseren Ergebnissen. Bertevello *et. al* haben bei beiden Isoformen von EmTNFR eine intrazelluläre Todesdomäne beschrieben, wobei die Evidenz hierfür unterschiedlich hoch war. Diese Ergebnisse wurden durch eine Analyse der sekundären Struktur (α -Helices) der TNFR-Homologe mit Hilfe von JPred 4 erhoben (Bertevello et al. 2020). Da in unserer Arbeit keine Analyse der sekundären Struktur von EmTNFR und EmTNFRv2 durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass die Analyse des intrazellulären Bereiches von Bertevello *et. al* genauer ist und in beiden Isoformen von EmTNFR eine intrazelluläre Todesdomäne existiert. Somit könnten beide Varianten, EmTNFR und EmTNFRv2, zu den Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie gezählt werden. Sicherlich wäre eine eigenständige Überprüfung der Ergebnisse und eine genauere Betrachtung des intrazellulären Bereiches von EmTNFRv2 sinnvoll, denn die Existenz einer intrazellulären Todesdomäne entscheidet über die intrazellulären Signalwege, die nach der Aktivierung des Rezeptors eingeleitet werden. Diese intrazelluläre Todesdomäne entscheidet damit letztendlich auch über die endgültige Funktion des Rezeptors. TNF-Rezeptoren mit Todesdomäne können die Apoptose auslösen (Hehlgans and Pfeffer 2005). TNF-Rezeptoren ohne Todesdomäne können hingegen Zellüberleben, Zellaktivierung und Entzündungsreaktionen auslösen (Hehlgans and Pfeffer 2005; Dempsey et al. 2003). Daher sollte vor der Untersuchung möglicher Interaktionspartner und Signalwege des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *E. multilocularis* zunächst die Existenz einer Todesdomäne geklärt werden.

Zusätzlich zu *emtnfr* und *emtnfrv2* konnte bei genauerer Untersuchung der Transkriptomdaten ein alternativer Transkriptomstart in Intron 4 nachgewiesen werden. Diese weitere Isoform von *emtnfr* (*emtnfrv3*) codiert ein Protein (EmTNFRv3), das keinen extrazellulären Bereich, sondern nur eine Transmembrandomäne und eine Todesdomäne im intrazellulären Bereich besitzt. Diese Variante des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis* wurde in den Untersuchungen von

Bertevello *et. al* nicht nachgewiesen. Aufgrund der fehlenden cysteinreichen Domänen im extrazellulären Bereich kann EmTNFRv3 keine Liganden binden. Welche Funktion solch ein Rezeptor für den Parasiten besitzt, ist noch unklar und sollte Bestandteil weiterer Untersuchungen sein. Des Weiteren ist noch kein experimenteller Nachweis von *emtnfrv3* durch PCR und Klonierungsversuche erfolgt. Neben diesen Versuchen könnten, z.B. mittels quantitative Echtzeit-PCR, Untersuchungen der Expressionsprofile aller 3 *emtnfr*-Varianten in den unterschiedlichen Larvenstadien sowie deren prozentuale Gewichtung in den einzelnen Larvenstadien von Interesse sein. Es wäre möglich, dass eine Korrelation zwischen dem Stadium des Fuchsbandwurmes und der Expressionshöhe einer *emtnfr*-Variante besteht.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit 3 Varianten eines Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis* nachgewiesen werden, die noch durch viele weitere Untersuchungen in ihrer Expression und Funktion weiter charakterisiert werden können.

7.2 Ist EmTNFR ein p75^{NTR}-Homolog?

Im Vergleich von EmTNFR und EmTNFRv2 mit verschiedenen Mitgliedern der humanen TNF-Rezeptor-Superfamilie konnte die höchste Ähnlichkeit zwischen dem parasitären Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie und Typ 16 der TNFR-Superfamilie, auch low affinity nerve growth factor receptor oder p75^{NTR} genannt, nachgewiesen werden. Zur Vergleichsanalyse der verschiedenen Mitglieder der TNFR-Superfamilie wurden nur die Sequenzabschnitte verwendet, die die extrazellulär gelegene konservierte Domäne der TNFR-Superfamilie (cd00185) enthalten. p75^{NTR} gehört aufgrund seiner intrazellulären Todesdomäne wie TNFR1 und einige andere TNF-Rezeptoren zu den Todesrezeptoren (Vilar 2017). Bei den Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie kann nochmals zwischen den „klassischen“ Todesrezeptoren (Fas, DR4, DR5 und TNFR1) und den „alternativen“ Todesrezeptoren unterschieden werden. Die „klassischen“ Todesrezeptoren können über Adaptermoleküle mit eigener Todesdomäne intrazelluläre Caspasen und schließlich die Apoptose aktivieren. Die „alternativen“ Todesrezeptoren, zu denen p75^{NTR} und EDAR gehören, leiten über alternative Signalwege apoptotische Funktionen ein (Barker 2004; Casaccia-Bonofil et al. 1999; Robertson et al. 2006; Bhardwaj and Aggarwal 2003). p75^{NTR} besitzt vielfältige Funktionen und wird vor allem im sich entwickelnden zentralen Nervensystem, aber auch im ausgereiften ZNS (zentrales Nervensystem) exprimiert (Becker *et al.* 2018). Die verschiedenen Funktionen von p75^{NTR} können durch eine spezifische Rezeptor-/Ligandenbindung ausgelöst werden. Zu den spezifischen Liganden von p75^{NTR} gehören, Neutrophin 3 und 4, BDNF (engl.: brain-derived neurotrophic factor) und NGF (engl.: nerve growth factor), jedoch nicht TNF- α .

Wie kann also EmTNFR mit der höchsten Ähnlichkeit zu p75^{NTR} eine positive Auswirkung einer TNF- α Behandlung vermitteln, obwohl p75^{NTR} kein TNF- α binden kann? Oder ist das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes kein p75^{NTR} Homolog?

Die Betrachtung der Evolution der TNF-Rezeptoren-Superfamilie könnte dies erklären.

Bei der Entstehung der Deuterostomier haben die TNFR-Superfamilie und ihre Signalwege eine starke Expansion durch mehrere Genomduplikationen, sowie eine Reduktion in der Entwicklung der Nematoden und Arthropoden erfahren (Robertson et

al. 2006). Infolgedessen könnte es zur Evolution des adaptiven Immunsystems gekommen sein (Collette et al. 2003; Glenney and Wiens 2007). Die Urmünder, aus denen sich die Plathelminthen entwickelt haben, hatten zusammen mit den Deuterostomiern einen gemeinsamen Vorfahren. Die Expansion der TNFR-Superfamilie fand also erst nach der Abspaltung der Urmünder und somit auch der Plathelminthen statt. Daher ist davon auszugehen, dass das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes *E. multilocularis* in seiner Funktion, seinen Liganden, seinen Interaktionspartnern und seinen intrazellulären Signalwegen nicht den TNF-Rezeptoren der Deuterostomie gleicht, sondern eher einem TNF-Rezeptor der Invertebraten, welche am ehesten die Urform darstellt.

Bei Untersuchungen der nahen Verwandten des Fuchsbandwurmes konnten bei 30 verschiedenen Plathelminthen 31 verschiedene Mitglieder der TNF-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bertevello et al. 2020). Diese Rezeptoren besitzen alle die höchste Ähnlichkeit zu p75^{NTR}, ähneln sich in ihrer Struktur und besitzen mit einer unterschiedlich hohen Wahrscheinlichkeit eine intrazelluläre Todesdomäne (Bertevello et al. 2020).

Nicht nur bei den Plathelminthen, sondern auch bei ferneren Verwandten von *E. multilocularis* konnten bereits p75^{NTR} Homologe nachgewiesen werden. Im Überstamm der Lophotrochozoa konnten ebenfalls TNF-Rezeptor Homologe identifiziert werden. Bei zwei Anneliden, *Platynereis dumerilii* und *Capitella Sp. I*, sowie bei zwei Mollusken, *Lottia gigantea* und *Chlamys farreri*, konnte jeweils ein p75^{NTR} Homolog nachgewiesen werden (Lauri et al. 2016; Wilson 2009; Li et al. 2009). Auch im Überstamm der Ecdysozoa, die zusammen mit den Lophotrochozoa die Stammgruppe der Protostomie bilden, konnten TNF-Rezeptor Homologe identifiziert werden. Unter anderem besitzen zwei Vertreter der Arthropoden *Daphnia pulex*, der gemeine Wasserfloh, sowie *Drosophila melanogaster*, ein Modellorganismus in der Biologie, ein TNF-Rezeptor Homolog. Beim gemeinen Wasserfloh konnte ein p75^{NTR} Homolog nachgewiesen werden (Wilson 2009). *Drosophila melanogaster* besitzt einen TNF Liganden, Eiger, und zwei TNF-Rezeptoren, Wengen und Grindelwald (Andersen et al. 2015; Kanda et al. 2002; Igaki et al. 2002). Bei *Caenorhabditis elegans*, einem Vertreter der Nematoden und einem weiteren Modellorganismus in der Biologie, konnte weder ein p75^{NTR}-Homolog (Oliveira et al. 2009) noch ein Homolog für einen TNF-Liganden

(Ruvkun and Hobert 1998) nachgewiesen werden, sodass ein Verlust der TNF-Rezeptoren mit Todesdomäne in der Evolution der Nematoden vermutet wird (Wiens and Glenney 2011). Dies stimmt mit der beschriebenen Reduktion der TNFR-Superfamilie und deren Signalwege in der Entwicklung der Nematoden und Arthropoden überein (Robertson et al. 2006).

Nicht nur bei den bisher erwähnten Vertretern der Protostomier, sondern auch bei verschiedenen Deuterostomiern konnten in den letzten Jahren zahlreiche TNF-Rezeptor Homologe identifiziert werden. Sowohl Seegurke und Seeigel (Vertreter der Echinodermata) als auch *Saccoglossus kowalevski* (Vertreter der Eichelwürmer und der Hemichordata) besitzen Homologe der TNF-Rezeptoren. *Strongylocentrotus purpuratus* (Vertreter der Seeigel) besitzt ein EDAR-Homolog sowie zwei p75^{NTR}-Homologe (Robertson et al. 2006). Sowohl bei der Seegurke (*Holothuria leucospilota*) als auch bei *Saccoglossus kowalevski* konnte ebenfalls ein p75^{NTR} Homolog identifiziert werden (Li et al. 2019; Bothwell 2006). Zusätzlich konnten zwei p75^{NTR} Homologe bei *Ciona intestinalis* der Schlauchseescheide, ein Vertreter der Urchordata, nachgewiesen werden (Robertson et al. 2006). Auch bei evolutionsgeschichtlich viel älteren Organismen wurden bereits TNF-Rezeptoren nachgewiesen. Süßwasserpolyphen (*Hydra*) besitzen ebenfalls einen TNF-Rezeptor, der dem humanen EDA-Rezeptor (TNF-Rezeptor Typ 27) gleicht und bei der Epitheldifferenzierung beteiligt ist (Steichele and Böttger 2019). *Nematostella vectensis*, ein Vertreter der Seeanemonen, die wie die Süßwasserpolyphen zum Stamm der Nesseltiere (Cnidaria) gehört, besitzt 2 p75^{NTR}-Homologe (Robertson et al. 2006). Sowohl die TNFR-Homologe von Seeigel und Seescheide als auch die TNFR-Homologe der Seeanemone weisen Homologien zu den nicht klassischen oder „alternativen“ Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie, wie EDAR und p75^{NTR}, auf. In allen drei Organismen konnten keine Orthologe zu den „klassischen“ Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass die „klassischen“ Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie evolutionsgeschichtlich erst später bei den Wirbeltieren entstanden sind (Robertson et al. 2006). Aufgrund dieser Erkenntnisse geht man davon aus, dass TNF-Rezeptoren mit Todesdomäne bereits sehr früh in der Evolution und vor der Aufteilung von Cnidaria und Bilateria vorhanden waren (Peterson and Butterfield 2005). Quistad et al. vermuten, dass TNF-Rezeptoren, die eine intrazelluläre Todesdomäne besitzen und an apoptotischen Zellfunktionen beteiligt sind,

durch eine Fusion einer cysteinreichen Domäne und einer intrazellulären Todesdomäne im letzten gemeinsamen Vorfahren der Metazoa entstanden sind (Quistad and Traylor-Knowles 2016). Die Existenz von p75^{NTR}-Homologen in Seeanemonen (Cnidaria) sowie Vertretern der Echinodermata und Urochordata deuten darauf hin, dass p75^{NTR} die ursprünglichste Form der TNF-Rezeptoren ist (Robertson et al. 2006). Ein EDA-Rezeptor Homolog ist hingegen nur bei der Seescheide und den Wasserpolyphen zu finden (Steichele and Böttger 2019; Robertson et al. 2006).

All die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Evolution der TNF-Rezeptor-Superfamilie bestätigen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zum Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie des Fuchsbandwurmes und lassen vermuten, dass EmTNFR ein p75^{NTR} Homolog ist, eher der ursprünglichen Form der TNF-Rezeptoren ähnelt und zu den „alternativen“ Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie gehört.

Wenn EmTNFR am ehesten ein p75^{NTR} Homolog ist, stellt sich jedoch die Frage wie der beobachtete Effekt einer TNF- α Behandlung im Fuchsbandwurm vermittelt wurde. In der Literatur wird TNF- α nicht als spezifischer Ligand für p75^{NTR} beschrieben und in dieser Arbeit wurden keine Versuche zur Liganden-Rezeptorbindung durchgeführt. Somit konnte bisher keine sichere Interaktion von TNF- α und dem Mitglied der TNFR-Superfamilie des Fuchsbandwurmes nachgewiesen werden. Dennoch könnte EmTNFR ein sehr wahrscheinlicher Kandidat zur Übermittlung des Effektes von TNF- α sein.

In vorherigen Arbeiten konnte bei *Schistosoma mansoni* ein positiver Effekt einer TNF- α Behandlung auf einen Parasiten beobachtet werden (Oliveira et al. 2009). Sowohl beim Fuchsbandwurm als auch bei *Schistosoma mansoni* und weiteren parasitär lebenden Plathelminthen, wie zum Beispiel dem Schweine- und Rinderbandwurm (*Taenia solium* & *T. saginata*) oder dem Zwergbandwurm (*Hymenolepis nana*), konnten TNF-Rezeptor Homologe, aber keine TNF- α Homologe, die als Ligand für einen TNF-Rezeptor dienen, nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2009; Bertevello et al. 2020). In freilebenden Plathelminthen, wie zum Beispiel bei den Plattwurm-gattungen *Macrostomum* und

Microdalyellia, hingegen existieren neben TNF-Rezeptoren auch kanonische TNF- α Liganden (Bertevello *et al.* 2020). Bei einem Vergleich der konservierten Domäne von TNF-Rezeptoren von freilebenden und parasitär lebenden Plathelminthen konnte gezeigt werden, dass sie sich alle in ihrer Struktur sehr ähneln und die höchste Ähnlichkeit zum humanen p75^{NTR} besitzen. Zusätzlich ergab der Vergleich der TNF-Liganden, die in den freilebenden Plathelminthen nachgewiesen werden konnten, mit vorhandenen Datenbanken in sieben Fällen die besten Ergebnisse zu TNF-Liganden von Fischen und in den anderen Fällen keine signifikanten Ergebnisse außerhalb der Plathelminthen (Bertevello *et al.* 2020). Dies lässt vermuten, dass sowohl die parasitären als auch die freilebenden Plathelminthen zur Bindung von kanonischen TNF- α fähig waren und einen endogenen TNF- α Liganden besaßen. Die parasitäre Lebensart einiger Plathelminthen sowie die dadurch resultierende Möglichkeit zur Interaktion mit Wirts-TNF- α könnten zum Verlust ihres endogenen TNF- α Liganden geführt haben (Bertevello *et al.* 2020). Auch der Fuchsbandwurm ist ein parasitär lebender Plathelminth, der vermutlich seinen endogenen TNF- α Liganden durch das Vorhandensein von Wirts-TNF- α verloren hat.

Diese Vermutung wird außerdem durch die Expressionsunterschiede von *emtnfr* in den unterschiedlichen Fuchsbandwurmstadien unterstützt. Das Fuchsbandwurmstadium, das für die AE verantwortlich ist und damit im ständigen Kontakt mit dem Wirt steht, nämlich der Metazestode, besitzt die höchste Expression von *emtnfr*. Wohingegen die Fuchsbandwurmstadien, die nur einen sehr geringen oder gar keinen Kontakt zum Wirt haben, nämlich der adulte Wurm und die Protoskolices, exprimieren *emtnfr* nur auf einem sehr geringen Niveau.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein TNF-Rezeptor und seine zwei Varianten bei *E. multilocularis* in seiner Struktur und Phylogenie als ein Mitglied der p75^{NTR} Rezeptor-Unterfamilie charakterisiert werden. Zusätzlich konnte ein positiver Effekt auf die Entwicklung des Parasiten durch eine TNF- α Behandlung nachgewiesen werden. Ein experimenteller Nachweis zur Interaktion zwischen TNF- α und EmTNFR konnte bisher weder beim Fuchsbandwurm noch bei anderen Plathelminthen erbracht werden. Der experimentelle Nachweis einer TNF- α /EmTNFR-Interaktion ist als zukünftiges Projekt sicherlich sinnvoll und wichtig. Dieser Nachweis könnte mit Yeast-Two-Hybrid-

Versuchen oder nach funktioneller, heterologer Expression von EmTNFR in Säugerzellen geführt werden.

Neben der Untersuchung einer Interaktion zwischen TNF- α und EmTNFR wäre auch eine Untersuchung einer Interaktion zwischen EmTNFR und den „klassischen“ Liganden eines p75^{NTR} Rezeptors, wie Neutrophin 3 & 4, BDNF und NGF interessant. Des Weiteren könnten PZ-Versuche mit diesen Neutrophinen zur Untersuchung ihrer Effekte auf den Fuchsbandwurm sicherlich sinnvoll sein. Zunächst sollte jedoch die Konzentration dieser Neutrophine während einer Infektion mit dem Fuchsbandwurm sowohl im Blut als auch lokal in der Leber gemessen werden.

Zusätzlich ermöglicht die Charakterisierung eines weiteren Rezeptors des Fuchsbandwurmes und dessen Interaktionspartner die Entwicklung neuer Verfahren zur Diagnostik einer Infektion mit *E. multilocularis* sowie die Entwicklung neuer Therapieansätze gegen die AE. Vor allem Therapiemöglichkeiten, die nicht nur parasitostatisch wirken, sondern den Parasiten abtöten und somit die AE heilen, wären ein enormer Fortschritt und Erfolg in der Therapie der AE.

7.3 Welche molare Masse besitzt EmTNFR?

Nachdem in dieser Arbeit durch *in silico* Analysen und in Klonierungs- und Sequenzierungsversuchen *emtnfr* in seiner Sequenz untersucht und beschrieben werden konnte, wurde die molekulare Masse von EmTNFR auf zwei verschiedenen Internetseiten (https://web.expasy.org/compute_pi/ und <https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>) berechnet. Hierbei ergaben beide Berechnungen eine molare Masse von 51,77 kDa. Im Western Blot zum Nachweis von EmTNFR in den verschiedenen Fuchsbandwurmstadien und bei der Untersuchung einer löslichen Form von EmTNFR mittels Western Blot konnte bei ca. 60 kDa eine starke Bande nachgewiesen werden. Diese Bande wurde in dieser Arbeit als Bande für EmTNFR gewertet, da es durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen wie zum Beispiel durch Glykosylierungen zu einer höheren molaren Masse als der berechneten kommen kann. Bei p75^{NTR} wurden in der extrazellulären Region mehrere mögliche Stellen zur O-Glykosylierungen und eine mögliche Stelle zur O-Glykosylierungen beschrieben (Vilar 2017; Yan and Chao 1991; Baldwin et al. 1992). Monlauzeur *et al.* konnten zeigen, dass Mutanten von p75^{NTR}, bei denen die Möglichkeit zur O-Glykosylierungen durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz stark reduziert wurde, sich im Western Blot deutlich schneller bewegen als der Wildtyp und eine um ca. 10 kDa geringere molare Masse besitzen (Monlauzeur et al. 1998). In einer weiteren Arbeit wurde die Größe des O-Glykan-Clusters auf ca. 10 kDa geschätzt (Yeaman et al. 1997). Aufgrund dieser Erkenntnisse und der sehr hohen Ähnlichkeit von EmTNFR zu p75^{NTR} sowie der Vermutung, dass EmTNFR am ehesten ein Homolog von p75^{NTR} ist, haben wir in dieser Arbeit in den oben beschriebenen Western Blots sowie im quantitativen Western Blot eine molare Masse von EmTNFR von 60 kDa angenommen. In dieser Arbeit wurden keine weiteren Versuche zum Nachweis einer möglichen Glykosylierung von EmTNFR durchgeführt. Diese wären zur Bestätigung einer möglichen Glykosylierung von EmTNFR und der in dieser Arbeit angenommenen molaren Masse sicherlich hilfreich und sinnvoll.

7.4 Gibt es lösliche TNF-Rezeptoren beim Fuchsbandwurm und anderen Helminthen?

Durch die Charakterisierung des Fuchsbandwurm-Genoms wurde ein Gen für ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie nachgewiesen (Tsai *et al.* 2013). Dieses Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie wurde laut Vorhersage als ein löslicher Rezeptor beschrieben. In dieser Arbeit konnten jedoch im Anschluss an die Vorhersage drei weitere nicht vorhergesagte Abschnitte des Genes für *emtnfr* (Exon 5, 6 und 7) identifiziert werden, die zusammen mit den vorhergesagten Genabschnitten einen membrangebundenen Rezeptor kodieren. Aufgrund der Vorhersage ergab sich jedoch die Frage, ob beim Fuchsbandwurm eine membrangebundene und eine lösliche Variante des Mitgliedes der TNFR-Superfamilie existieren und ob diese Varianten durch ein Transkript oder zwei verschiedene Transkripte kodiert werden.

Die Existenz einer löslichen Form von EmTNFR hätte für die Wirts-Parasiten-Interaktionen während der AE eine entscheidende Rolle. Eine lösliche Form des Mitgliedes der TNFR-Superfamilie, die vom Parasiten produziert und anschließend an seine Umgebung sezerniert wird, könnte TNF- α binden, das während der Immunreaktion des Wirtes als Antwort auf das Eindringen eines Pathogens in den Organismus sezerniert wird und das Pathogen im besten Fall in Kombination mit weiteren Immunabwehrreaktionen abtöten soll. Durch die Bindung des Wirts-TNF- α an den parasitären Rezeptor könnte dessen Wirkung neutralisiert werden und ein wichtiger Bestandteil der Immunreaktion des Wirtes wäre außer Kraft gesetzt. Somit hätte der Fuchsbandwurm durch die Bildung und Sekretion einer löslichen Form des Mitgliedes der TNFR-Superfamilie einen deutlichen Vorteil in der Reaktion auf die Immunantwort des Wirtes.

Zur Klärung dieser Frage wurden in dieser Arbeit einige Versuche durchgeführt.

Bei der Betrachtung der Transkriptomdaten wurde im vorderen Bereich des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie, der die lösliche Variante des Rezeptors kodiert, eine deutlich höhere Anzahl an RNA-Seq Fragmenten als im hinteren Bereich verzeichnet. In PCR- und quantitativen Echtzeit-PCR-Versuchen konnte jedoch nur ein Transkript für *emtnfr* nachgewiesen werden. Dies würde allerdings noch nicht gegen zwei unterschiedliche Varianten des Rezeptors sprechen. Durch verschiedene Prozessierungen

der RNA könnte es weiterhin zu einer löslichen und einer membrangebundenen Form von EmTNFR kommen. Daher wurden weitere Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt. Hierbei konnte aus dem Zellkulturüberstand mit Hilfe der eigens hergestellten polyklonalen Antikörper (α -EmTNFR) kein löslicher Rezeptor extrahiert werden. Sicherlich könnte aufgrund der nicht optimalen Qualität der eigens hergestellten Antikörper der Versuch verfälscht worden sein, jedoch sprechen die bisher erhobenen Ergebnisse gegen die Existenz einer löslichen Form des Mitgliedes der TNFR-Superfamilie bei *E. multilocularis*, sodass am ehesten davon auszugehen ist, dass die Vorhersage für *emtnfr* bei *E. multilocularis* unvollständig gewesen war.

Auch die bisherigen Erkenntnisse über die Existenz von löslichen TNF-Rezeptoren bei anderen Organismen sprechen gegen eine lösliche Form des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei *E. multilocularis*. Generell ist bei Plathelminthen nur sehr wenig über TNF-Rezeptoren bekannt, jedoch konnten durch *in silico* Analysen bei 30 verschiedenen Plathelminthen 31 TNF-Rezeptoren, unter anderem auch bei *E. multilocularis*, nachgewiesen werden. Diese Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie besitzen alle eine Transmembrandomäne und sind nicht in einer löslichen Variante vorhanden (Bertevello *et al.* 2020). Weitere Untersuchungen des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie von *Schistosoma mansoni* ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf einen löslichen TNF-Rezeptor (Oliveira *et al.* 2009).

Prinzipiell gibt es in der TNF-Rezeptor-Superfamilie einige Rezeptoren, die auch in einer löslichen Form vorkommen können. Decoy-Rezeptor 3 (DCR3 oder TNFRSF6B) und Osteoprotegerin (OPG oder TNFRSF11B) existieren aufgrund einer fehlenden Transmembrandomäne nur in löslicher Form (Bodmer *et al.* 2002). Die TNF-Rezeptoren CD27, CD30, CD40, TNFR1, TNFR2, CD95 und 4-1BB können sowohl in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Form vorkommen, die durch proteolytische Spaltung der membrangebundenen Form oder durch alternatives Splicing entstehen (Bodmer *et al.* 2002). Bei TNFR1 und TNFR2 existieren ebenfalls lösliche Formen (sTNFR1 & 2), die TNF- α binden können (Engelmann *et al.* 1989; Engelmann, Novick, *et al.* 1990; Seckinger *et al.* 1989; Olsson *et al.* 1989; Engelmann, Holtmann, *et al.* 1990). Bei p75^{NTR} kann es durch Ectodomain-Shedding (Abspaltung der Ektodomäne) zu einer löslichen p75^{NTR}-Ektodomäne kommen, deren Funktion bisher noch nicht

bekannt ist (Yao et al. 2015; Zampieri et al. 2005; DiStefano et al. 1993; Weskamp et al. 2004). Der fehlende experimentelle Nachweis einer löslichen Form von EmTNFR, der am ehesten einem p75^{NTR}-Homolog entspricht, wird durch die Ergebnisse der eben genannten Arbeiten bekräftigt, sodass nur von einer membrangebundenen Form von EmTNFR bei *E. multilocularis* auszugehen ist.

7.5 TNF- α und seine Wirkung auf den Fuchsbandwurm

Der Krankheitsauslöser der AE ist das zweite Larvenstadium des Fuchsbandwurmes *E. multilocularis*, der Metazestode. Dieser entwickelt sich nach der oralen Aufnahme der Onkosphären, die das erste Larvenstadium des Fuchsbandwurmes und die teilungsaktiven Zellen, die sogenannten Germinalzellen, enthalten, in der Leber des Zwischenwirtes. Dort wächst der Parasit infiltrativ und tumorartig in das umliegende Gewebe (WHO/OIE 2001). Zur Untersuchung der Metamorphose des Fuchsbandwurmes von Onkosphäre bzw. Germinalzellen zum zweiten Larvenstadium, der Metazestode, wurde in den letzten Jahren die Primärzellkultur entwickelt (Spiliotis *et al.* 2008; Spiliotis *et al.* 2010). Hierdurch wird es ermöglicht den entscheidenden und kritischen Punkt einer Infektion des Zwischenwirtes mit dem Fuchsbandwurm (Thompson 1986) sowie die Einflüsse des Wirtes und dessen Botenstoffe auf den Fuchsbandwurm zu untersuchen. Bei Kontakt eines Organismus mit einem unbekanntem Agens wird das Immunsystem aktiviert und eine Immunreaktion ausgelöst. Hierbei werden von Immunzellen Botenstoffe, wie zum Beispiel TNF- α , ausgeschüttet, um weitere Immunzellen und die Produktion von zusätzlichen Botenstoffen zu aktivieren (Schulte *et al.* 2013; Akira *et al.* 2006). TNF- α ist eines der ersten Zytokine, das bereits 30 Minuten nach dem Kontakt mit einem Pathogen von Makrophagen sezerniert wird, hierdurch Immunzellen aktiviert und die Produktion weiterer Zytokine fördert (Cannon *et al.* 1990; Steeland *et al.* 2018). In der frühen Phase der Infektion mit *E. multilocularis*, in der es zur Metamorphose von Onkosphäre zu Metazestode kommt, wird vom Zwischenwirt vermehrt TNF- α als Abwehrmechanismus produziert, das vor allem in den ersten Tagen ansteigt und für ungefähr 30 Tage dieses Level beibehält und schließlich wieder abfällt (Wang, Lin, *et al.* 2014). Zur Untersuchung des Einflusses von TNF- α auf den Fuchsbandwurm, seine Entwicklung von Onkosphäre zu MZ und zur Nachahmung der Umgebungsverhältnisse während einer frühen Infektion des Zwischenwirtes wurden in dieser Arbeit PZ-Versuche mit einer TNF- α Behandlung in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass durch eine TNF- α Behandlung die Entwicklung von PZ über die Bildung von Kavitäten bis hin zur Ausbildung von MZ gefördert wird und schneller voranschreitet als in der Negativkontrolle, die keine TNF- α Behandlung erhalten hatte. Sowohl beim Wachstum der Aggregate und Kavitäten der PZ-Kultur als auch bei der

Anzahl der ausgebildeten MZ und dem anschließenden Verfall der Kavitäten konnte ein positiver Effekt durch TNF- α verzeichnet werden. Durch höhere TNF- α Konzentration (100 ng/ml bzw. 5,75 nM) konnte dieser Effekt früher als durch eine Behandlung mit einer niedrigeren TNF- α Konzentrationen (25 ng/ml bzw. 1,44 nM) ausgelöst werden. Gleichzeitig konnte durch eine TNF- α Behandlung ein schnellerer Zerfall der Kavitäten in der PZ-Kultur beobachtet werden. Zunächst scheint dies kein positiver Effekt zu sein. Jedoch wäre es möglich, dass der Fuchsbandwurm zu dieser Zeit bereits ausreichend MZ ausgebildet hatte und keine Kavitäten mehr zum Überleben benötigte, sodass unnötige Zellen absterben und keine Angriffsfläche für das Immunsystem des Wirtes mehr bieten konnten. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen vermuten, dass *E. multilocularis* durch eine TNF- α Behandlung schneller die kritische Phase einer Infektion durchlebt und schneller unnötige Zellen abtötet, sodass die Angriffspunkte für die Immunabwehr des Wirtes möglichst gering bleiben. Zur Verifizierung dieser These wären jedoch noch zahlreiche weitere Versuche, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, notwendig.

Neben den PZ-Versuchen mit TNF- α wurden ebenfalls PZ-Versuche mit einem Knockdown von *emtnfr* und einer zusätzlichen TNF- α Behandlung durchgeführt. In diesem Versuch zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in den vorherigen PZ-Versuchen. Eine Behandlung mit TNF- α konnte die Ausbildung von MZ im Vergleich zu den Kontrollgruppen unterstützen und erhöhen. Dieser Effekt konnte auch in den *emtnfr*-Knockdown Gruppen verzeichnet werden, wobei im Vergleich zu den vorherigen PZ-Versuchen die MZ-Ausbildung um einige Tage verzögert war. Dies lässt sich durch eine Regenerationszeit erklären, die die PZ nach der Perforation der Zellmembran zum Einbringen der RNAi-Sonde benötigen, und erst anschließend mit der Metamorphose von Germinalzelle zu Vesikel beginnen. Zusätzlich zeigte der Versuch, dass *emtnfr* eine entscheidende Rolle im Wachstum der Kavitäten spielt. Die *emtnfr*-Knockdown Gruppen, sowohl die TNF- α behandelten als auch die nicht behandelten Gruppen, zeigten einen signifikant kleineren Durchmesser der Kavitäten als die Gruppen ohne *emtnfr*-Knockdown. Eine Behandlung mit TNF- α hatte hierbei keine Auswirkung auf den Durchmesser der Kavitäten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass TNF- α die Entwicklung von PZ sowie die Ausbildung von MZ fördert. Für die Größenzunahme der ausgebildeten Kavitäten ist jedoch *emtnfr* wichtig.

Aufgrund der Ergebnisse in den TNF- α Versuchen könnte vermutet werden, dass der Fuchsbandwurm möglicherweise einen Weg gefunden hat, die Abwehrmechanismen des Zwischenwirtes, die den Parasiten abwehren oder sogar töten sollen, zu umgehen und gegebenenfalls in einen positiven Effekt umzuwandeln. In der vulnerablen Phase der Infektion des Zwischenwirtes, in der der Parasit noch keine Schutzmechanismen, wie zum Beispiel eine fibrotische Abkapselung gegenüber dem gesunden Lebergewebe, aufbauen konnte und dem Immunsystem des Zwischenwirtes vollkommen ausgesetzt ist, wäre es möglich, dass der Fuchsbandwurm die Expression des Mitgliedes der TNF-Rezeptor-Superfamilie erhöht, um eine möglichst hohe positive Wirkung des Wirts TNF- α erzielen zu können. Durch diese Wirkung hätte der Parasit die Möglichkeit sich schneller zu entwickeln, zu wachsen und sich so vor der weiteren Immunreaktion des Wirtes zu schützen. Sobald diese kritische Phase beendet wäre, könnte der Fuchsbandwurm die Expression von *emtnfr* erneut reduzieren. Jedoch ist dies nur eine mögliche Hypothese, die durch in dieser Arbeit ausgeführten Versuche nicht belegt werden kann. Die in dieser Arbeit ausgeführten Versuche mit einer TNF- α Behandlung konnten lediglich einen positiven Effekt einer TNF- α Behandlung auf die Ausbildung von MZ *in vitro* nachweisen. Um die aufgestellte Hypothese beweisen zu können, werden in der Zukunft noch eine Vielzahl an Untersuchungen und Experimente notwendig sein.

Auch der bereits beschriebene Verlauf der TNF- α Konzentration während einer Infektion mit *E. multilocularis* könnte ein weiterer Hinweis für die aufgestellte Hypothese sein. Aber auch hierfür konnten in dieser Arbeit keine Beweise erbracht werden.

Die Ergebnisse der Versuche könnten allerdings nicht nur eine Anpassungsstrategie des Fuchsbandwurmes aufzeigen, sondern könnten möglicherweise auch eine Erklärung zum Organotropismus des Parasiten liefern. In den durchgeführten PZ-Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine TNF- α Behandlung die Entwicklung der PZ verbessert und die Ausbildung der MZ fördert. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, dass das Vorhandensein von TNF- α auch *in vivo* wichtig für den Parasiten ist und ein

möglicher weiterer Faktor für den Organotropismus des Fuchsbandwurmes darstellen könnte.

Sobald der Fuchsbandwurm vom Gastrointestinaltrakt über die Pfortader in die Leber gelangt, nistet sich dieser in 99% der Fälle in der Leber ein (WHO/OIE 2001). Meist ist der rechte Leberlappen und in 40% dieser Fälle auch der Leberhilus, die Eintrittsstelle der Pfortader, anderer Gefäße und Gallengänge, betroffen (Kratzer et al. 2015; Heyd et al. 2000). In der Leber wird TNF- α hauptsächlich von sessilen Makrophagen, sogenannten Kupffer-Zellen, produziert. Vor allem die großen, periportal gelegenen Kupffer-Zellen (also um die Pfortader und deren Äste herum) sind die ersten Immunzellen, die mit pathogen-beladenem Blut aus dem GI-Trakt Kontakt haben, und produzieren im Vergleich zu peripher gelegenen Kupfer-Zellen am meisten TNF- α (Hoedemakers et al. 1995) (Fox et al. 1987). Der Fuchsbandwurm scheint sich nicht nur aufgrund der hohen Insulinkonzentration, die das parasitäre Wachstum fördert (Hemer et al. 2014), sondern auch möglicherweise aufgrund der hohen TNF- α Konzentration in der Leber anzusiedeln. Diese Hypothese wird durch die in den PZ-Versuchen nachgewiesenen positiven Effekte einer TNF- α Behandlung auf den Parasiten gestützt.

Auch bei weiteren Plathelminthen, wie zum Beispiel *S. mansoni*, wurde bereits der Einfluss von Wirts-TNF- α auf den Parasiten untersucht. In erwachsenen Schistosomen wird die Eiproduktion durch TNF- α stimuliert und die Anzahl der gebildeten Eier steht in Abhängigkeit zur Höhe der TNF- α Konzentration (Amiri *et al.* 1992). Bei 3 Stunden alten Schistosomula und erwachsenen Schistosomen wird durch eine TNF- α Behandlung das Genexpressionsmuster verändert. Vor allem Gene, die im Bereich der mRNA-Translation und Proteinherstellung aber auch Gene, die für die Eiproduktion und die Eiablage notwendig sind, werden durch eine Behandlung mit TNF- α verstärkt exprimiert. Oliveira et al. konnten in ihrer Arbeit also einen positiven Effekt durch TNF- α auf die Parasitenvermehrung nachweisen (Oliveira *et al.* 2009). Auch Schistosomen scheinen ähnlich wie der Fuchsbandwurm bei unseren Versuchen in der Primärzellkultur positiv auf ein Zytokin zu reagieren, das vom Immunsystem des Wirtes zur Abwehr produziert wird.

Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei *S. japonicum* nachgewiesen werden. Bei einer Infektion mit *S. japonicum* kommt es im Wirt zu einem Anstieg der Monozytenanzahl

und des TNF- α Spiegels. Durch das Herabsenken der Monozytenanzahl und des TNF- α Spiegels konnte eine Verringerung der Wurmlast des Wirts und eine Reduktion der Eiablage erzielt werden (Liu *et al.* 2019).

Dies lässt vermuten, dass unterschiedliche parasitär lebende Plathelminthen im Laufe der Evolution einen ähnlichen, wenn nicht sogar den gleichen Anpassungsmechanismus an ihren Wirt entwickelt haben. Es wird sogar vermutet, dass parasitär lebende Plathelminthen aufgrund des hohen Angebotes von Wirts-TNF- α ihren endogenen TNF- α Homolog stetig zurückgebildet und schließlich vollständig verloren haben (Bertevello *et al.* 2020). Freilebende Plathelminthen besitzen bis heute ein TNF-Homolog, wohingegen bei parasitär lebenden Plathelminthen, wie z.B. *S. mansoni*, *Hymenolepis nana* und *Taenia solium* kein TNF-Homolog mehr zu finden ist (Bertevello *et al.* 2020). Diese Arbeit, in der bei *E. multilocularis* ebenfalls kein TNF-Homolog gefunden werden konnte, unterstützt die Hypothese, dass parasitär lebende Plathelminthen einen endogenen TNF- α Homolog im Laufe der Evolution verloren haben.

Zur weiteren Unterstützung dieser Hypothese wären Zellkulturversuche mit einer TNF- α Behandlung bei weiteren parasitär lebenden Plathelminthen hilfreich. Aber auch bei *E. multilocularis* wären Langzeitversuche mit weiteren verschiedenen TNF- α Konzentrationen und einer erhöhten Anzahl an biologischen Replikaten zur Bestätigung des beobachteten Effekts sinnvoll. Zusätzlich wären *in vivo* Untersuchungen bei mongolischen Rennmäusen mit einer zusätzlichen TNF- α Gabe während einer Infektion mit *E. multilocularis* zur Bestätigung des bisher in *in vitro* Versuchen beobachteten positiven Effektes auf das Wachstum des Parasiten von Interesse. Gleichzeitig könnte die TNF- α Produktion des Zwischenwirtes durch die Gabe von bereits entwickelten und in der Medizin verwendeten TNF- α Inhibitoren, wie zum Beispiel Infliximab oder Adalimumab, oder durch immun-defiziente Mäuse, die kein TNF- α bilden können, unterbrochen werden und das Wachstum des Parasiten im Vergleich zur normalen *in vivo* Kultur untersucht werden. In solchen Versuchen wäre es schwierig nachzuweisen, dass die möglicherweise beobachteten Effekt nur durch eine zusätzliche TNF- α Gabe entstanden sind und nicht durch den Einfluss von TNF- α auf die Immunantwort des Wirtes. Dennoch könnten solche Versuche weitere Erkenntnisse zur Wirts-/Parasiteninteraktion liefern.

Außerdem könnte der Effekt von TNF- α Inhibitoren auf verschiedene Fuchsbandwurmstadien in *in vitro* Versuchen untersucht werden. Durch den Einsatz von TNF- α Inhibitoren könnte ein positiver Effekt von TNF- α , das möglicherweise im Zellkulturmedium enthalten ist, unterbunden werden. Zum Ausschluss von zusätzlichen oder störenden Effekten sollten solche Versuche in der axenischen Zellkultur ohne Fütterzellen durchgeführt werden. Es wird jedoch ein Zellkulturmedium verwendet, das vorher mit Fütterzellen inkubiert war und somit die überlebensnotwendigen Stoffe für die Zellen des Fuchsbandwurms enthält. Möglicherweise ist auch TNF- α ein solcher überlebensnotwendiger Stoff im Zellkulturmedium.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse der Primärzellversuche eine weitere Möglichkeit der Wirts-Parasiten-Interaktion auf und verbessern das Verständnis der Biologie des Parasiten. Hierdurch könnte ein neuer Angriffspunkt einer antiparasitären und gegebenenfalls parasitotoxischen Therapie aufgezeigt werden und neue Medikamente gegen den Fuchsbandwurm *E. multilocularis* und die AE entwickelt werden.

7.6 TNF-Signalweg bei *E. multilocularis*

Die TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie ist eine sehr heterogene Gruppe mit sehr vielfältigen Funktionen von Zellüberleben bis hin zum Zelltod. Die große Vielfalt von Funktionen und Effekten der TNF-/TNFR-Superfamilie entsteht unter anderem durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten zwischen Liganden und Rezeptoren, da sowohl Liganden als auch Rezeptoren mehrere spezifische Bindungen untereinander eingehen können (Hehlhans and Pfeffer 2005; Idriss and Naismith 2000). Nach der Bindung zwischen TNF-Ligand und TNF-Rezeptor können wiederum durch die intrazelluläre Bindung von diversen Adapterproteinen zahlreiche Signalwege aktiviert werden (McWhirter *et al.* 1999).

Auch in dieser Arbeit wurden nach der Charakterisierung von *emtnfr* in seiner Struktur und seinem Expressionsmuster in den verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes mögliche intrazelluläre Signalkaskaden durch *in silico* Analysen untersucht. Aufgrund des positiven Effektes von TNF- α in den PZ-Versuchen wurde zunächst der intrazelluläre Signalweg der TNF- α bindenden TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, untersucht. In vorherigen Arbeiten konnten bereits einige Signalwegmitglieder, wie zum Beispiel JNK (Riedl 2009) und eine MAPKK, EmMKK1 (Gelmedin *et al.* 2010), experimentell im Fuchsbandwurm nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten durch die Sequenzierung des *Echinococcus*-Genoms und durch eine *in silico* Analyse weitere Signalwegmitglieder, wie zum Beispiel verschiedene Caspasen und MAPKKK, vorhergesagt oder Hinweise auf deren Existenz beim Fuchsbandwurm gefunden werden.

In dieser Arbeit wurden durch *in silico* Analysen im Fuchsbandwurm Homologe von Komponenten eines TNF- α vermittelten Signalweges nachgewiesen, der über TRAF, verschiedene MAP-Kinasen, JNK und c-Jun zur Zellaktivierung und zum Zellüberleben führen könnte.

Aufgrund der höchsten Ähnlichkeit von EmTNFR zum humanen p75^{NTR}, der eine intrazelluläre Todesdomäne besitzt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls der intrazelluläre Signalweg von p75^{NTR} im Fuchsbandwurm untersucht. Auch hier konnten bis hin zu JNK alle Signalwegmitglieder des Signalweges über die Bildung von Ceramiden und über einen MAP-Kinase-Signalweg in bioinformatischen Analysen nachgewiesen werden. Auch die weiteren Downstream-Mitglieder nach der Aktivierung von JNK konnten mit

einer Ausnahme, einem Bad Homolog, ebenfalls durch *in silico* Analysen beim Fuchsbandwurm nachgewiesen werden.

Weiterhin konnten durch *in silico* Analysen einige Ko-Rezeptoren, mit denen p75^{NTR} interagiert, ebenfalls im *Echinococcus*-Genom nachgewiesen werden. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass EmTNFR ein p75^{NTR}-Homolog ist. Jedoch kann p75^{NTR} kein TNF- α binden, sondern nur mit Neutrophinen und deren Vorstufen interagieren.

In den durchgeführten experimentellen Versuchen konnte dennoch ein positiver Effekt von TNF- α auf den Fuchsbandwurm und dessen Wachstum nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass dieser Effekt durch die Bindung von TNF- α an einen anderen Rezeptor entstanden ist, oder EmTNFR eine nicht-kanonische Ligandenbindung mit TNF- α eingehen kann. Dies ist aufgrund der Vermutung, dass parasitäre Helminthen durch den Kontakt mit Wirts-TNF ihren endogenen TNF-Liganden verloren haben und freilebende Plathelminthen, deren TNF-Rezeptoren dem der parasitären Plathelminthen sehr stark ähneln, weiterhin TNF-Liganden besitzen und diese mit den TNF-Rezeptoren interagieren können, eher wahrscheinlich (Bertevello et al. 2020).

Auch bei *S. mansoni* wurden im Rahmen der Charakterisierung des TNF-Rezeptors ebenfalls die Down-Stream-Signalwege in einer *in silico* Analyse untersucht. Hier konnte ein möglicher Signalweg nach der Bindung von TNF- α an SmTNFR über TRAF, MAPKKK, JNKK, JNK und c-Jun vollständig in bioinformatischen Analysen nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2009).

Die frühe Abspaltung der Plathelminthen von den Deuterostomiern lässt ebenfalls vermuten, dass der TNF-Signalweg im Fuchsbandwurm eher der ursprünglichen Form als der Form in Vertebraten entspricht. Dennoch ist über die intrazellulären Signalwege von TNF-Rezeptoren in anderen Invertebraten bisher nur sehr wenig bekannt. Dies lässt aktuell über die Ähnlichkeiten oder Unterschiede dieser Signalwege zwischen *Echinococcus* und Säugern nur Spekulationen zu. Eine Beteiligung der in dieser Arbeit bioinformatisch identifizierten Gene ist wahrscheinlich, deren genaue Rolle im intrazellulären Signalweg müsste jedoch experimentell über Yeast-Two-Hybrid-Studien und biochemische Analysen untersucht und verifiziert werden.

7.7 Lokalisation und Spezifität von EmTNFR

Durch den Nachweis eines Rezeptors in verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes und die Untersuchung seiner exakten Lokalisation in diesen Stadien können viele Informationen über die Funktion und die Signalwege des Rezeptors und über die Biologie und Entwicklung des Fuchsbandwurmes gesammelt werden. Außerdem können hierdurch Mechanismen des Fuchsbandwurmes zur Anpassung und Beeinflussung seiner Umgebung und seines Wirtes aufgedeckt werden. Über Transkriptomdaten, quantitative Echtzeit-PCR-Versuche und Western Blots können Expressionsunterschiede der einzelnen Rezeptoren und Proteine in den verschiedenen Stadien des Fuchsbandwurmes untersucht werden. Durch WMISH-Versuche kann die Lokalisation von Rezeptoren oder Proteinen in Fuchsbandwurmstadien, wie Metazestode oder Protoskolices, bestimmt werden und Ko-Existenzen mit anderen Rezeptoren und eine Zellspezifität untersucht werden.

Im Falle des Mitgliedes der TNFR-Superfamilie beim Fuchsbandwurm konnte in dieser Arbeit durch die Untersuchung der Transkriptomdaten und durch quantitative Echtzeit-PCR-Versuche gezeigt werden, dass *emtnfr* von Primärzellen und dem zweiten Larvenstadium des Fuchsbandwurmes, dem Metazestod, sehr stark exprimiert wird. In Protoskolices, dem dritten Larvenstadium des Fuchsbandwurmes, das in den weitentwickelten MZ in den sogenannten Brutkapseln entsteht, wird *emtnfr* hingegen nur auf einem sehr geringen Niveau exprimiert. Die hohe Expression von *emtnfr* spricht für eine hohe Bedeutung des Mitgliedes der TNFR-Superfamilie in diesen Stadien. Auch die Ergebnisse aus den Primärzellversuchen sowie den *emtnfr*-Knockdown Versuchen können dies bestätigen. In Zusammenschau der Ergebnisse aus allen durchgeführten Versuchen in dieser Arbeit ist zu vermuten, dass sowohl EmTNFR als auch das produzierte TNF- α des Wirtes während der frühen Phase der Infektion für *E. multilocularis* wichtig sein könnten und dem Parasiten möglicherweise die Entwicklung und das Wachstum in der feindlichen Umgebung des Wirtes erleichtert.

EmTNFR ist spezifisch für das zweite Larvenstadium des Fuchsbandwurmes und könnte für dieses Stadium des Fuchsbandwurmes von wichtiger Rolle sein. Die Spezifität von EmTNFR für das zweite Larvenstadium konnte durch Lokalisationsversuche in dieser Arbeit gezeigt werden.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ergebnisse im ersten Lokalisationsversuch von EmTNFR wurden WMISH-Versuche zur weiteren Untersuchung durchgeführt. Hier konnten die Vermutungen aus den vorherigen Versuchen bestätigt werden. *emtnfr* wird ubiquitär in den Zellen auf der Oberfläche von MZ exprimiert. Eine Spezifität für Stammzellen, den einzigen teilungsfähigen Zellen, konnte über eine Ko-Lokalisation von *emtnfr*-gelabelten und EdU-gelabelten Zellen nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass *emtnfr* in Brutkapseln, die sich in älteren MZ ausbilden und Entstehungsort von Protoskolices sind, nicht exprimiert wird. Somit konnte für den Rezeptor der TNFR-Superfamilie des Fuchsbandwurmes zwar keine Spezifität zu einer einzelnen Zellart, aber eine Spezifität zu einem Stadium des Fuchsbandwurmes, nämlich den MZ, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Relevanz des Rezeptors der TNFR-Superfamilie für junge und frühentwickelte MZ.

Bei *S. mansoni* wurde ebenfalls ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie untersucht. Hier konnten positive Effekt durch eine Behandlung mit TNF- α nachgewiesen werden (Oliveira et al. 2009), jedoch sind bisher noch keine Untersuchungen zur Lokalisation des TNF-Rezeptors bei Schistosomen erfolgt. Auch bei weiteren Plathelminthen sind bisher noch keine Lokalisationsuntersuchungen des TNF-Rezeptors durchgeführt worden. Zum besseren Verständnis der Biologie der Plathelminthen und deren Anpassungsformen an die parasitäre Lebensweise wäre dies in Zukunft sicherlich sinnvoll. Zum anderen stellt das Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie mit seiner Spezifität für den Metazestod, der das krankheitsauslösende Stadium des Fuchsbandwurmes beim Menschen ist, eine neue Möglichkeit einer Therapie dar.

Bisher ist die Therapie der AE gerade wegen der sehr späten Diagnosestellung und damit schon sehr fortgeschrittenen Erkrankung sehr schwierig, oft ohne Heilungschance und meist lebenslang notwendig. Der Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie stellt jedoch einen Angriffspunkt für eine neue Therapie in der vulnerablen Entwicklungsphase des Fuchsbandwurmes dar. Der Parasit ist zu Beginn der Infektion noch sehr klein und muss sich durch Wachstum und Ausbildung einer fibrotischen Kapsel in der Leber des Zwischenwirtes etablieren und vor der Immunantwort des Wirtes schützen. Ein Medikament, das in genau dieser vulnerablen Phase wirkt, könnte nicht nur wie bisher

parasitostatisch, sondern vielleicht sogar parasitotoxisch wirken. Wie bereits in Kapitel 7.5 beschrieben, stellt jedoch genau der frühe Diagnosezeitpunkt eine Schwierigkeit dar. Denn die orale Aufnahme der Fuchsbandwurmeier erfolgt meist unbemerkt und der Krankheitsverlauf ist in den meisten Fällen über Jahre hinweg asymptomatisch. Eine regelmäßige Testung von gefährdeten Personen könnte asymptomatische und frühe Stadien der AE diagnostizieren, würde jedoch enorme Kosten verursachen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals ein Rezeptor des Fuchsbandwurmes beschrieben, der für ein Parasitenstadium spezifisch ist und daher viele weitere Möglichkeiten in Diagnostik und Therapie eröffnet.

8 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B. 1992. 'Tumor necrosis factors. Structure, function, and mechanism of action', *Immunol Ser*, 56: 1-587.
- Aggarwal, B. B., S. C. Gupta, and J. H. Kim. 2012. 'Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey', *Blood*, 119: 651-65.
- Aggarwal, B. B., W. J. Henzel, B. Moffat, W. J. Kohr, and R. N. Harkins. 1985. 'Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line', *J Biol Chem*, 260: 2334-44.
- Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, P. E. Hass, B. Moffat, S. A. Spencer, W. J. Henzel, T. S. Bringman, G. E. Nedwin, D. V. Goeddel, and R. N. Harkins. 1985. 'Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization', *J Biol Chem*, 260: 2345-54.
- Aggarwal, B. B., B. Moffat, and R. N. Harkins. 1984. 'Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization', *J Biol Chem*, 259: 686-91.
- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, S. K. Sandur, M. K. Pandey, and G. Sethi. 2006. 'Inflammation and cancer: how hot is the link?', *Biochem Pharmacol*, 72: 1605-21.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. 'Pathogen recognition and innate immunity', *Cell*, 124: 783-801.
- Amarzguioui, M., and H. Prydz. 2004. 'An algorithm for selection of functional siRNA sequences', *Biochem Biophys Res Commun*, 316: 1050-8.
- Amiot, F., P. Vuong, M. Defontaine, C. Pater, F. Dautry, and M. Liance. 1999. 'Secondary alveolar echinococcosis in lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha deficient mice: exacerbation of Echinococcus multilocularis larval growth is associated with cellular changes in the periparasitic granuloma', *Parasite Immunol*, 21: 475-83.
- Amiri, P., R. M. Locksley, T. G. Parslow, M. Sadick, E. Rector, D. Ritter, and J. H. McKerrow. 1992. 'Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice', *Nature*, 356: 604-7.
- Ammann, R. W., and J. Eckert. 1996. 'Cestodes. Echinococcus', *Gastroenterol Clin North Am*, 25: 655-89.
- Apaer, S., T. Tuxun, H. Zhang, A. Aierken, T. Li, J. M. Zhao, and H. Wen. 2019. 'Subcutaneous Inoculation of Echinococcus multilocularis Induces Delayed Regeneration after Partial Hepatectomy', *Sci Rep*, 9: 462.
- Arnett, H. A., J. Mason, M. Marino, K. Suzuki, G. K. Matsushima, and J. P. Ting. 2001. 'TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination', *Nat Neurosci*, 4: 1116-22.
- Atrekhany, K. N., V. S. Gogoleva, M. S. Drutskaya, and S. A. Nedospasov. 2020. 'Distinct modes of TNF signaling through its two receptors in health and disease', *J Leukoc Biol*, 107: 893-905.
- Baldwin, A. N., C. M. Bitler, A. A. Welcher, and E. M. Shooter. 1992. 'Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR)', *J Biol Chem*, 267: 8352-9.

- Balkwill, F. 2002. 'Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?', *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 135-41.
- Balkwill, F. 2009. 'Tumour necrosis factor and cancer', *Nat Rev Cancer*, 9: 361-71.
- Barker, P. A. 2004. 'p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights', *Neuron*, 42: 529-33.
- Baumann, S., R. Shi, W. Liu, H. Bao, J. Schmidberger, W. Kratzer, W. Li, and Ulm interdisciplinary Echinococcosis Working Group. 2019. 'Worldwide literature on epidemiology of human alveolar echinococcosis: a systematic review of research published in the twenty-first century', *Infection*, 47: 703-27.
- Becker, K., A. Cana, W. Baumgärtner, and I. Spitzbarth. 2018. 'p75 Neurotrophin Receptor: A Double-Edged Sword in Pathology and Regeneration of the Central Nervous System', *Vet Pathol*, 55: 786-801.
- Bernabeu, R. O., and F. M. Longo. 2010. 'The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis', *BMC Neurosci*, 11: 136.
- Bertevello, C. R., B. R. A. Russo, A. C. Tahira, E. H. Lopes-Junior, R. DeMarco, and K. C. Oliveira. 2020. 'The evolution of TNF signaling in platyhelminths suggests the cooption of TNF receptor in the host-parasite interplay', *Parasit Vectors*, 13: 491.
- Beutler, B., and F. Bazzoni. 1998. 'TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread?', *Blood Cells Mol Dis*, 24: 216-30.
- Bhardwaj, A., and B. B. Aggarwal. 2003. 'Receptor-mediated choreography of life and death', *J Clin Immunol*, 23: 317-32.
- Bibel, M., E. Hoppe, and Y. A. Barde. 1999. 'Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR', *Embo j*, 18: 616-22.
- Bilzer, M., F. Roggel, and A. L. Gerbes. 2006. 'Role of Kupffer cells in host defense and liver disease', *Liver Int*, 26: 1175-86.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. 'A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells', *Nature*, 385: 729-33.
- Bleidorn, C. 2008. 'Lophotrochozoan relationships and parasites. A snap-shot', *Parasite*, 15: 329-32.
- Bodmer, J. L., P. Schneider, and J. Tschopp. 2002. 'The molecular architecture of the TNF superfamily', *Trends Biochem Sci*, 27: 19-26.
- Borghi, A., M. Haegman, R. Fischer, I. Carpentier, M. J. M. Bertrand, C. Libert, I. S. Afonina, and R. Beyaert. 2018. 'The E3 ubiquitin ligases HOIP and cIAP1 are recruited to the TNFR2 signaling complex and mediate TNFR2-induced canonical NF- κ B signaling', *Biochem Pharmacol*, 153: 292-98.
- Brehm, K. 2010. 'The role of evolutionarily conserved signalling systems in Echinococcus multilocularis development and host-parasite interaction', *Med Microbiol Immunol*, 199: 247-59.

- Brehm, K., and U. Koziol. 2017. 'Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels', *Adv Parasitol*, 95: 147-212.
- Brehm, K., M. Spiliotis, R. Zavala-Góngora, C. Konrad, and M. Frosch. 2006. 'The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world', *Parasitol Int*, 55 Suppl: S15-21.
- Brehm, K., M. Wolf, H. Beland, A. Kroner, and M. Frosch. 2003. 'Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display', *Int J Parasitol*, 33: 1145-59.
- Brenner, D., H. Blaser, and T. W. Mak. 2015. 'Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die', *Nat Rev Immunol*, 15: 362-74.
- Bresson-Hadni, S., O. Petitjean, B. Monnot-Jacquard, B. Heyd, B. Kantelip, M. Deschaseaux, E. Racadot, and D. A. Vuitton. 1994. 'Cellular localisations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha mRNA in a parasitic granulomatous disease of the liver, alveolar echinococcosis', *Eur Cytokine Netw*, 5: 461-8.
- Brunetti, E., P. Kern, D. A. Vuitton, and Who-Iwge Writing Panel for the. 2010. 'Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans', *Acta Trop*, 114: 1-16.
- Cabal-Hierro, L., and P. S. Lazo. 2012. 'Signal transduction by tumor necrosis factor receptors', *Cell Signal*, 24: 1297-305.
- Cai, D., Y. Li, Y. Jiang, H. Wang, X. Wang, and B. Song. 2019. 'The role of contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of hepatic alveolar echinococcosis', *Medicine (Baltimore)*, 98: e14325.
- Cai, H., Y. Guan, X. Ma, L. Wang, H. Wang, G. Su, X. Zhang, X. Han, J. Ma, Y. F. Liu, J. Li, J. Zhang, Y. Wang, W. Wang, R. Du, W. Lei, and W. Wu. 2017. 'Epidemiology of Echinococcosis Among Schoolchildren in Golog Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai, China', *Am J Trop Med Hyg*, 96: 674-79.
- Cai, Z., S. Jitkaew, J. Zhao, H. C. Chiang, S. Choksi, J. Liu, Y. Ward, L. G. Wu, and Z. G. Liu. 2014. 'Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis', *Nat Cell Biol*, 16: 55-65.
- Campbell, J. B., and Y. A. Peerbaye. 1992. 'Saponin', *Res Immunol*, 143: 526-30;discussion 77-8.
- Cannon, J. G., R. G. Tompkins, J. A. Gelfand, H. R. Michie, G. G. Stanford, J. W. van der Meer, S. Endres, G. Lonnemann, J. Corsetti, B. Chernow, and et al. 1990. 'Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever', *J Infect Dis*, 161: 79-84.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. 'An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 3666-70.
- Casaccia-Bonnet, P., C. Gu, G. Khursigara, and M. V. Chao. 1999. 'p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions', *Microsc Res Tech*, 45: 217-24.
- Castro, G. A. 1996. 'Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development.' in S. Baron (ed.), *Medical Microbiology* (University of Texas Medical Branch at Galveston, Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.: Galveston (TX)).

- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo. 2000. 'A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling', *Science*, 288: 2351-4.
- Chen, N. J., Chio, H. W. J. Lin, G. Duncan, H. Chau, D. Katz, H. L. Huang, K. A. Pike, Z. Hao, Y. W. Su, K. Yamamoto, R. F. de Pooter, J. C. Zuniga-Pflucker, A. Wakeham, W. C. Yeh, and T. W. Mak. 2008. 'Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 12429-34.
- Cheng, Z., F. Liu, X. Li, M. Dai, J. Wu, X. Guo, H. Tian, Z. Heng, Y. Lu, X. Chai, and Y. Wang. 2017. 'EGF-mediated EGFR/ERK signaling pathway promotes germinative cell proliferation in *Echinococcus multilocularis* that contributes to larval growth and development', *PLoS Negl Trop Dis*, 11: e0005418.
- Cheng, Z., F. Liu, S. Zhu, H. Tian, L. Wang, and Y. Wang. 2015. 'A rapid and convenient method for fluorescence analysis of in vitro cultivated metacystode vesicles from *Echinococcus multilocularis*', *PLoS One*, 10: e0118215.
- Cheng, Z., S. Zhu, L. Wang, F. Liu, H. Tian, T. Pengsakul, and Y. Wang. 2015. 'Identification and characterisation of Emp53, the homologue of human tumor suppressor p53, from *Echinococcus multilocularis*: its role in apoptosis and the oxidative stress response', *Int J Parasitol*, 45: 517-26.
- Choi, S. J., K. H. Lee, H. S. Park, S. K. Kim, C. M. Koh, and J. Y. Park. 2005. 'Differential expression, shedding, cytokine regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in human fetal astrocytes', *Yonsei Med J*, 46: 818-26.
- Cohen, J. 2002. 'The immunopathogenesis of sepsis', *Nature*, 420: 885-91.
- Craig, P. 2003. '*Echinococcus multilocularis*', *Curr Opin Infect Dis*, 16: 437-44.
- Croft, M., C. A. Benedict, and C. F. Ware. 2013. 'Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies', *Nat Rev Drug Discov*, 12: 147-68.
- Croft, M., and R. M. Siegel. 2017. 'Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases', *Nat Rev Rheumatol*, 13: 217-33.
- Cucher, M. A., M. E. Ancarola, and L. Kamenetzky. 2021. 'The challenging world of extracellular RNAs of helminth parasites', *Mol Immunol*, 134: 150-60.
- Dempsey, P. W., S. E. Doyle, J. Q. He, and G. Cheng. 2003. 'The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily', *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 193-209.
- Depuydt, B., G. van Loo, P. Vandenaabeele, and W. Declercq. 2005. 'Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors', *J Cell Sci*, 118: 497-504.
- DiStefano, P. S., D. M. Chelsea, C. M. Schick, and J. F. McKelvy. 1993. 'Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo', *J Neurosci*, 13: 2405-14.
- Dopp, J. M., T. A. Sarafian, F. M. Spinella, M. A. Kahn, H. Shau, and J. de Vellis. 2002. 'Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells', *Neurochem Res*, 27: 1535-42.
- Dostert, C., M. Grusdat, E. Letellier, and D. Brenner. 2019. 'The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond', *Physiol Rev*, 99: 115-60.

- Eckert, J., and P. Deplazes. 2004. 'Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern', *Clin Microbiol Rev*, 17: 107-35.
- Ehlers, Ulrich. 1985. *Das phylogenetische System der Plathelminthes* (Fischer: Stuttgart).
- Eissner, G., W. Kolch, and P. Scheurich. 2004. 'Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system', *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 353-66.
- Elliot, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, A. Long-Fox, P. Charles, P. Katsikis, F. M. Brennan, H. Bijl, J. Ghayeb, and J. N. Woody. 2008. 'Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha', *Arthritis Rheum*, 58: S92-s101.
- Elmore, S. 2007. 'Apoptosis: a review of programmed cell death', *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.
- Engelmann, H., D. Aderka, M. Rubinstein, D. Rotman, and D. Wallach. 1989. 'A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity', *J Biol Chem*, 264: 11974-80.
- Engelmann, H., H. Holtmann, C. Brakebusch, Y. S. Avni, I. Sarov, Y. Nophar, E. Hadas, O. Leitner, and D. Wallach. 1990. 'Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity', *J Biol Chem*, 265: 14497-504.
- Engelmann, H., D. Novick, and D. Wallach. 1990. 'Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors', *J Biol Chem*, 265: 1531-6.
- Epping, K., and K. Brehm. 2011. 'Echinococcus multilocularis: molecular characterization of EmSmadE, a novel BR-Smad involved in TGF- β and BMP signaling', *Exp Parasitol*, 129: 85-94.
- Erfors, P., C. Wetmore, M. Eriksdotter-Nilsson, M. Bygdeman, I. Strömberg, L. Olson, and H. Persson. 1991. 'The nerve growth factor receptor gene is expressed in both neuronal and non-neuronal tissues in the human fetus', *Int J Dev Neurosci*, 9: 57-66.
- Faustman, D., and M. Davis. 2010. 'TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 482-93.
- Felleisen, R., and B. Gottstein. 1993. 'Echinococcus multilocularis: molecular and immunochemical characterization of diagnostic antigen II/3-10', *Parasitology*, 107 (Pt 3): 335-42.
- Fiers, W. 1991. 'Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level', *FEBS Lett*, 285: 199-212.
- Fiscella, M., J. W. Perry, B. Teng, M. Bloom, C. Zhang, K. Leung, L. Pukac, K. Florence, A. Concepcion, B. Liu, Y. Meng, C. Chen, E. C. Elgin, P. Kanakaraj, T. E. Kaufmann, J. Porter, R. Cibotti, Y. Mei, J. Zhou, G. Chen, V. Roschke, G. Komatsoulis, B. Mansfield, S. Ruben, I. Sanyal, and T. S. Migone. 2003. 'TIP, a T-cell factor identified using high-throughput screening increases survival in a graft-versus-host disease model', *Nat Biotechnol*, 21: 302-7.
- Forster, S., U. Koziol, T. Schafer, R. Duvoisin, K. Cailliau, M. Vanderstraete, C. Dissous, and K. Brehm. 2019. 'The role of fibroblast growth factor signalling in Echinococcus multilocularis development and host-parasite interaction', *PLoS Negl Trop Dis*, 13: e0006959.

- Fox, E. S., P. Thomas, and S. A. Broitman. 1987. 'Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells', *Infect Immun*, 55: 2962-6.
- Fu, C., W. P. Donovan, O. Shikapwashya-Hasser, X. Ye, and R. H. Cole. 2014. 'Hot Fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase', *PLoS One*, 9: e115318.
- Gaur, U., and B. B. Aggarwal. 2003. 'Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily', *Biochem Pharmacol*, 66: 1403-8.
- Gelmedin, V., R. Caballero-Gamiz, and K. Brehm. 2008. 'Characterization and inhibition of a p38-like mitogen-activated protein kinase (MAPK) from *Echinococcus multilocularis*: antiparasitic activities of p38 MAPK inhibitors', *Biochem Pharmacol*, 76: 1068-81.
- Gelmedin, V., M. Spiliotis, and K. Brehm. 2010. 'Molecular characterisation of MEK1/2- and MKK3/6-like mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK) from the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*', *Int J Parasitol*, 40: 555-67.
- Giribet, G. 2008. 'Assembling the lophotrochozoan (=spiralian) tree of life', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363: 1513-22.
- Goeddel, D. V. , and G. Chen. 2005. 'Tumor Necrosis Factor Pathway', *Science Signaling*, as seen 12 May 2009.
- Gottstein, B., W. J. Dai, M. Walker, M. Stettler, N. Müller, and A. Hemphill. 2002. 'An intact laminated layer is important for the establishment of secondary *Echinococcus multilocularis* infection', *Parasitol Res*, 88: 822-8.
- Gough, P., and I. A. Myles. 2020. 'Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects', *Front Immunol*, 11: 585880.
- Graf, M. 2006. 'Charakterisierung einer bisher noch unbekanntem MAPK aus dem Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis*', *Bachelorthesis, Würzburg: University Würzburg*.
- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 1995. 'The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor', *Cell*, 83: 793-802.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. 1998. 'The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 570-5.
- Guicciardi, M. E., and G. J. Gores. 2009. 'Life and death by death receptors', *Faseb j*, 23: 1625-37.
- Hall, T. A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. ." In *Nucl. Acids. Symp.* 41: 95-98.
- Heath, D. D. 1971. 'The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *T. serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host', *Int J Parasitol*, 1: 145-52.
- Hehlgans, T., and K. Pfeffer. 2005. 'The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games', *Immunology*, 115: 1-20.

- Hemer, S., C. Konrad, M. Spiliotis, U. Koziol, D. Schaack, S. Förster, V. Gelmedin, B. Stadelmann, T. Dandekar, A. Hemphill, and K. Brehm. 2014. 'Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development', *BMC Biol*, 12: 5.
- Hempstead, B. L., D. Martin-Zanca, D. R. Kaplan, L. F. Parada, and M. V. Chao. 1991. 'High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor', *Nature*, 350: 678-83.
- Henry, J. Q. 2014. 'Spiralian model systems', *Int J Dev Biol*, 58: 389-401.
- Heyd, B., L. Weise, V. Bettschart, and M. Gillet. 2000. '[Surgical treatment of hepatic alveolar echinococcosis]', *Chirurg*, 71: 16-20.
- Hoedemakers, R. M., H. W. Morselt, G. L. Scherphof, and T. Daemen. 1995. 'Heterogeneity in secretory responses of rat liver macrophages of different size', *Liver*, 15: 313-9.
- Hsu, H., J. Huang, H. B. Shu, V. Baichwal, and D. V. Goeddel. 1996. 'TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex', *Immunity*, 4: 387-96.
- Hüttner, M., M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J. D. Boomker, A. Dinkel, Y. Sako, U. Mackenstedt, T. Romig, and A. Ito. 2008. 'Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion', *Int J Parasitol*, 38: 861-8.
- Idriss, H. T., and J. H. Naismith. 2000. 'TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)', *Microsc Res Tech*, 50: 184-95.
- Irwin, M. W., S. Mak, D. L. Mann, R. Qu, J. M. Penninger, A. Yan, F. Dawood, W. H. Wen, Z. Shou, and P. Liu. 1999. 'Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium', *Circulation*, 99: 1492-8.
- Jiang, Y., J. D. Woronicz, W. Liu, and D. V. Goeddel. 1999. 'Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains', *Science*, 283: 543-6.
- Kallioliass, G. D., and L. B. Ivashkiv. 2016. 'TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies', *Nat Rev Rheumatol*, 12: 49-62.
- Katz, Y., E. T. Wang, J. Silterra, S. Schwartz, B. Wong, H. Thorvaldsdóttir, J. T. Robinson, J. P. Mesirov, E. M. Airoidi, and C. B. Burge. 2015. 'Quantitative visualization of alternative exon expression from RNA-seq data', *Bioinformatics*, 31: 2400-2.
- Kenneth Murphy, Casey Weaver. 2001a. '10. Die humorale Immunantwort.' in, *Janeway Immunologie* (Springer Spektrum Berlin, Heidelberg: Berlin).
- Kenneth Murphy, Casey Weaver. 2001b. *Janeway Immunologie* (Springer Spektrum Berlin, Heidelberg: Berlin).
- Kern, P., A. Ammon, M. Kron, G. Sinn, S. Sander, L. R. Petersen, W. Gaus, and P. Kern. 2004. 'Risk factors for alveolar echinococcosis in humans', *Emerg Infect Dis*, 10: 2088-93.
- Kern, P., H. Wen, N. Sato, D. A. Vuitton, B. Gruener, Y. Shao, E. Delabrousse, W. Kratzer, and S. Bresson-Hadni. 2006. 'WHO classification of alveolar echinococcosis: principles and application', *Parasitol Int*, 55 Suppl: S283-7.
- Koziol, U., G. Krohne, and K. Brehm. 2013. 'Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*', *Front Zool*, 10: 24.

- Koziol, U., T. Rauschendorfer, L. Zanon Rodríguez, G. Krohne, and K. Brehm. 2014. 'The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*', *Evodevo*, 5: 10.
- Koziol, Uriel. 2014. 'Molecular and developmental characterization of the *Echinococcus multilocularis* stem cell system', PhD thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Kraemer, B. R., S. O. Yoon, and B. D. Carter. 2014. 'The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor', *Handb Exp Pharmacol*, 220: 121-64.
- Kratzer, W., B. Gruener, T. E. Kaltenbach, S. Ansari-Bitzenberger, P. Kern, M. Fuchs, R. A. Mason, T. F. Barth, M. M. Haenle, A. Hillenbrand, S. Oeztuerk, and T. Graeter. 2015. 'Proposal of an ultrasonographic classification for hepatic alveolar echinococcosis: Echinococcosis multilocularis Ulm classification-ultrasound', *World J Gastroenterol*, 21: 12392-402.
- Kratzer, W., Schmidberger J., Hillenbrand A., Henne-Bruns D., Gräter T., Barth TFE., Grüner B., . 2019. 'Alveoläre Echinokokkose: Eine Herausforderung für Diagnostik, Therapie und Klinisches Management', *Epidemiologisches Bulletin*, 2019/41: 423-30.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. 'MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms', *Mol Biol Evol*, 35: 1547-49.
- Lascano, E. F., E. A. Coltorti, and V. M. Varela-Díaz. 1975. 'Fine structure of the germinal membrane of *Echinococcus granulosus* cysts', *J Parasitol*, 61: 853-60.
- Lass, A., B. Szostakowska, P. Myjak, and K. Korzeniewski. 2016. 'Fresh fruits, vegetables and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in highly endemic areas of Poland: reply to concerns', *Parasitol Res*, 115: 3637-42.
- Lauri, A., P. Bertucci, and D. Arendt. 2016. 'Neurotrophin, p75, and Trk Signaling Module in the Developing Nervous System of the Marine Annelid *Platynereis dumerilii*', *Biomed Res Int*, 2016: 2456062.
- Leducq, R., and C. Gabrion. 1992. 'Developmental changes of *Echinococcus multilocularis* metacestodes revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites', *Parasitology*, 104 Pt 1: 129-41.
- Li, H., M. Kobayashi, M. Blonska, Y. You, and X. Lin. 2006. 'Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation', *J Biol Chem*, 281: 13636-43.
- Li, J., T. McQuade, A. B. Siemer, J. Napetschnig, K. Moriwaki, Y. S. Hsiao, E. Damko, D. Moquin, T. Walz, A. McDermott, F. K. Chan, and H. Wu. 2012. 'The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis', *Cell*, 150: 339-50.
- Li, L., L. Qiu, L. Song, X. Song, J. Zhao, L. Wang, C. Mu, and H. Zhang. 2009. 'First molluscan TNFR homologue in Zhikong scallop: molecular characterization and expression analysis', *Fish Shellfish Immunol*, 27: 625-32.
- Li, X., Y. Yang, and J. D. Ashwell. 2002. 'TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2', *Nature*, 416: 345-7.
- Littlewood, D. T. 2008. 'Platyhelminth systematics and the emergence of new characters', *Parasite*, 15: 333-41.

- Littlewood, D. T. J., K. Rohde, and K. A. Clough. 1999. 'The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules', *Biological Journal of the Linnean Society*, 66: 75-114.
- Liu, J., L. Zhu, J. Wang, L. Qiu, Y. Chen, R. E. Davis, and G. Cheng. 2019. 'Schistosoma japonicum extracellular vesicle miRNA cargo regulates host macrophage functions facilitating parasitism', *PLoS Pathog*, 15: e1007817.
- Liu, Y., F. Tian, J. Shan, J. Gao, B. Li, J. Lv, X. Zhou, X. Cai, H. Wen, and X. Ma. 2020. 'Kupffer Cells: Important Participant of Hepatic Alveolar Echinococcosis', *Front Cell Infect Microbiol*, 10: 8.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. 'The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology', *Cell*, 104: 487-501.
- Loetscher, H., M. Steinmetz, and W. Lesslauer. 1991. 'Tumor necrosis factor: receptors and inhibitors', *Cancer Cells*, 3: 221-6.
- Mahoney, D. J., H. H. Cheung, R. L. Mrad, S. Plenchette, C. Simard, E. Enwere, V. Arora, T. W. Mak, E. C. Lacasse, J. Waring, and R. G. Korneluk. 2008. 'Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF- κ B activation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11778-83.
- Marchetti, L., M. Klein, K. Schlett, K. Pfizenmaier, and U. L. Eisel. 2004. 'Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B pathway', *J Biol Chem*, 279: 32869-81.
- McWhirter, S. M., S. S. Pullen, J. M. Holton, J. J. Crute, M. R. Kehry, and T. Alber. 1999. 'Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 8408-13.
- Meeker, R. B., and K. S. Williams. 2015. 'The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death', *Neural Regen Res*, 10: 721-5.
- Mi, S., X. Lee, Z. Shao, G. Thill, B. Ji, J. Relton, M. Levesque, N. Allaire, S. Perrin, B. Sands, T. Crowell, R. L. Cate, J. M. McCoy, and R. B. Pepinsky. 2004. 'LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex', *Nat Neurosci*, 7: 221-8.
- Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. 'Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes', *Cell*, 114: 181-90.
- Monaco, C., J. Nanchahal, P. Taylor, and M. Feldmann. 2015. 'Anti-TNF therapy: past, present and future', *Int Immunol*, 27: 55-62.
- Monlauzeur, L., L. Breuza, and A. Le Bivic. 1998. 'Putative O-glycosylation sites and a membrane anchor are necessary for apical delivery of the human neurotrophin receptor in Caco-2 cells', *J Biol Chem*, 273: 30263-70.
- Moro, P., and P. M. Schantz. 2009. 'Echinococcosis: a review', *Int J Infect Dis*, 13: 125-33.
- Naismith, J. H., and S. R. Sprang. 1998. 'Modularity in the TNF-receptor family', *Trends Biochem Sci*, 23: 74-9.
- Naudé, P. J., J. A. den Boer, P. G. Luiten, and U. L. Eisel. 2011. 'Tumor necrosis factor receptor cross-talk', *Febs j*, 278: 888-98.

- Nedwin, G. E., S. L. Naylor, A. Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D. V. Goeddel, and P. W. Gray. 1985. 'Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization', *Nucleic Acids Res*, 13: 6361-73.
- Newton, K., and G. Manning. 2016. 'Necroptosis and Inflammation', *Annu Rev Biochem*, 85: 743-63.
- Nono, J. K., M. B. Lutz, and K. Brehm. 2014. 'EmTIP, a T-Cell immunomodulatory protein secreted by the tapeworm *Echinococcus multilocularis* is important for early metacestode development', *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e2632.
- Nono, J. K., M. B. Lutz, and K. Brehm. 2020. 'Expansion of Host Regulatory T Cells by Secreted Products of the Tapeworm *Echinococcus multilocularis*', *Front Immunol*, 11: 798.
- Nykjaer, A., R. Lee, K. K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemannel, E. Schwarz, T. E. Willnow, B. L. Hempstead, and C. M. Petersen. 2004. 'Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death', *Nature*, 427: 843-8.
- Oliveira, K. C., M. L. Carvalho, T. M. Venancio, P. A. Miyasato, T. Kawano, R. DeMarco, and S. Verjovski-Almeida. 2009. 'Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF-alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile', *PLoS Negl Trop Dis*, 3: e556.
- Olson, P. D., M. Zarowiecki, F. Kiss, and K. Brehm. 2012. 'Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology', *Parasite Immunol*, 34: 130-50.
- Olsson, I., M. Lantz, E. Nilsson, C. Peetre, H. Thysell, A. Grubb, and G. Adolf. 1989. 'Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine', *Eur J Haematol*, 42: 270-5.
- Parker, G. A., and C. A. Picut. 2005. 'Liver immunobiology', *Toxicol Pathol*, 33: 52-62.
- Pathak, A., and B. D. Carter. 2017. 'Retrograde apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor', *Neuronal Signal*, 1: Ns20160007.
- Pérez, M. G., M. Spiliotis, N. Rego, N. Macchiaroli, L. Kamenetzky, N. Holroyd, M. A. Cucher, K. Brehm, and M. C. Rosenzvit. 2019. 'Deciphering the role of miR-71 in *Echinococcus multilocularis* early development in vitro', *PLoS Negl Trop Dis*, 13: e0007932.
- Piarroux, M., R. Piarroux, J. Knapp, K. Bardonnet, J. Dumortier, J. Watelet, A. Gerard, J. Beytout, A. Abergel, S. Bresson-Hadni, J. Gaudart, and Network FrancEchino Surveillance. 2013. 'Populations at risk for alveolar echinococcosis, France', *Emerg Infect Dis*, 19: 721-8.
- Pillai-Kastoori, L., A. R. Schutz-Geschwender, and J. A. Harford. 2020. 'A systematic approach to quantitative Western blot analysis', *Anal Biochem*, 593: 113608.
- Rauert, H., A. Wicovsky, N. Muller, D. Siegmund, V. Spindler, J. Waschke, C. Kneitz, and H. Wajant. 2010. 'Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2)', *J Biol Chem*, 285: 7394-404.
- Rausch, R. 1954. 'Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of *Echinococcus* species', *J Infect Dis*, 94: 178-86.

- Reuter, S., B. Grüner, A. K. Buck, N. Blumstein, P. Kern, and S. N. Reske. 2008. 'Long-term follow-up of metabolic activity in human alveolar echinococcosis using FDG-PET', *Nuklearmedizin*, 47: 147-52.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, and A. Khvorova. 2004. 'Rational siRNA design for RNA interference', *Nat Biotechnol*, 22: 326-30.
- Riedl, S. 2009. 'Molekulare Charakterisierung einer c-jun n-terminalen Kinase (jnk) aus *Echinococcus multilocularis*', Diplomarbeit (Fakultät für Biologie), Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Robert-Koch-Institut. 2022. 'SurvStat@RKI 2.0', Robert Koch Institut. <https://survstat.rki.de/>.
- Robertson, A. J., J. Croce, S. Carbonneau, E. Voronina, E. Miranda, D. R. McClay, and J. A. Coffman. 2006. 'The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*', *Dev Biol*, 300: 321-34.
- Robertson, L. J., K. Troell, I. D. Woolsey, and C. M. Kapel. 2016. 'Fresh fruit, vegetables, and mushrooms as transmission vehicles for *Echinococcus multilocularis* in Europe: inferences and concerns from sample analysis data from Poland', *Parasitol Res*, 115: 2485-8.
- Rogan, M. T., W. Y. Hai, R. Richardson, E. Zeyhle, and P. S. Craig. 2006. 'Hydatid cysts: does every picture tell a story?', *Trends Parasitol*, 22: 431-8.
- Rösch, H., R. Schweigreiter, T. Bonhoeffer, Y. A. Barde, and M. Korte. 2005. 'The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 7362-7.
- Rothe, M., M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres, and D. V. Goeddel. 1995. 'The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins', *Cell*, 83: 1243-52.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel, and D. V. Goeddel. 1994. 'A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor', *Cell*, 78: 681-92.
- Saarma, U., I. Jõgisalu, E. Moks, A. Varcasia, A. Lavikainen, A. Oksanen, S. Simsek, V. Andresiuk, G. Denegri, L. M. González, E. Ferrer, T. Gárate, L. Rinaldi, and P. Maravilla. 2009. 'A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence', *Parasitology*, 136: 317-28.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239: 487-91.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees', *Mol Biol Evol*, 4: 406-25.
- Sakamoto, T., and M. Sugimura. 1969. 'Studies on echinococcosis. XXI. Electron microscopical observations on general structure of larval tissue of multilocular *Echinococcus*', *Jpn J Vet Res*, 17: 67-80.
- Sakamoto, T., and M. Sugimura. 1970. '[Studies on echinococcosis. 23. Electron microscopical observations on histogenesis of larval *Echinococcus multilocularis*]', *Jpn J Vet Res*, 18: 31-44.

- Salic, A., and T. J. Mitchison. 2008. 'A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2415-20.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis', *Nat Methods*, 9: 676-82.
- Schroeder, A. B., E. T. A. Dobson, C. T. Rueden, P. Tomancak, F. Jug, and K. W. Eliceiri. 2021. 'The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis', *Protein Sci*, 30: 234-49.
- Schulte, W., J. Bernhagen, and R. Bucala. 2013. 'Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view', *Mediators Inflamm*, 2013: 165974.
- Schweiger, A., R. W. Ammann, D. Candinas, P. A. Clavien, J. Eckert, B. Gottstein, N. Halkic, B. Muellhaupt, B. M. Prinz, J. Reichen, P. E. Tarr, P. R. Torgerson, and P. Deplazes. 2007. 'Human alveolar echinococcosis after fox population increase, Switzerland', *Emerg Infect Dis*, 13: 878-82.
- Seckinger, P., S. Isaaz, and J. M. Dayer. 1989. 'Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor', *J Biol Chem*, 264: 11966-73.
- Seitz, M., P. Loetscher, B. Dewald, H. Towbin, H. Gallati, and M. Baggiolini. 1995. 'Interleukin-10 differentially regulates cytokine inhibitor and chemokine release from blood mononuclear cells and fibroblasts', *Eur J Immunol*, 25: 1129-32.
- Siegel, R. M., F. K. Chan, H. J. Chun, and M. J. Lenardo. 2000. 'The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity', *Nat Immunol*, 1: 469-74.
- Smith, R. A., and C. Baglioni. 1987. 'The active form of tumor necrosis factor is a trimer', *J Biol Chem*, 262: 6951-4.
- Smyth, J. D. 1968. 'In vitro studies and host-specificity in Echinococcus', *Bull World Health Organ*, 39: 5-12.
- Spiliotis, M., and K. Brehm. 2009. 'Axenic in vitro cultivation of Echinococcus multilocularis metacystode vesicles and the generation of primary cell cultures', *Methods Mol Biol*, 470: 245-62.
- Spiliotis, M., C. Konrad, V. Gelmedin, D. Tappe, S. Bruckner, H. U. Mosch, and K. Brehm. 2006. 'Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from Echinococcus multilocularis which is activated in response to human epidermal growth factor', *Int J Parasitol*, 36: 1097-112.
- Spiliotis, M., S. Lechner, D. Tappe, C. Scheller, G. Krohne, and K. Brehm. 2008. 'Transient transfection of Echinococcus multilocularis primary cells and complete in vitro regeneration of metacystode vesicles', *Int J Parasitol*, 38: 1025-39.
- Spiliotis, M., C. Mizukami, Y. Oku, F. Kiss, K. Brehm, and B. Gottstein. 2010. 'Echinococcus multilocularis primary cells: improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference', *Mol Biochem Parasitol*, 174: 83-7.
- Spiliotis, M., D. Tappe, S. Bruckner, H. U. Mosch, and K. Brehm. 2005. 'Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm Echinococcus multilocularis', *Mol Biochem Parasitol*, 139: 225-37.

- Spiliotis, M., D. Tappe, L. Sesterhenn, and K. Brehm. 2004. 'Long-term in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes under axenic conditions', *Parasitol Res*, 92: 430-2.
- Spriggs, D. R., S. Deutsch, and D. W. Kufe. 1992. 'Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha', *Immunol Ser*, 56: 3-34.
- Steeland, S., C. Libert, and R. E. Vandenbroucke. 2018. 'A New Venue of TNF Targeting', *Int J Mol Sci*, 19.
- Tautz, D., and C. Pfeifle. 1989. 'A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback', *Chromosoma*, 98: 81-5.
- Telford, M. J., S. J. Bourlat, A. Economou, D. Papillon, and O. Rota-Stabelli. 2008. 'The evolution of the Ecdysozoa', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363: 1529-37.
- Thompson, R. C. 1986. 'Biology and systematics of *Echinococcus*.' in R. C. Thompson (ed.), *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. (George Allen & Unwin: London).
- Thompson, R. C. 2008. 'The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*', *Exp Parasitol*, 119: 439-46.
- Thompson, R. C. 2017. 'Biology and Systematics of *Echinococcus*', *Adv Parasitol*, 95: 65-109.
- Thompson, R. C. A. 2020. 'The Molecular Epidemiology of *Echinococcus* Infections', *Pathogens*, 9.
- Thompson, R. C., A. J. Lymbery, and C. C. Constantine. 1995. 'Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus', *Adv Parasitol*, 35: 145-76.
- Thompson, R. C., and D. P. McManus. 2002. 'Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*', *Trends Parasitol*, 18: 452-7.
- Torgerson, P. R., K. Keller, M. Magnotta, and N. Ragland. 2010. 'The global burden of alveolar echinococcosis', *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e722.
- Torgerson PR, Keller K, Magnotta M, Ragland N
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_life_cycle_of_Echinococcus_multilocularis.jpg), <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>)
- Torgerson, P. R., A. Schweiger, P. Deplazes, M. Pohar, J. Reichen, R. W. Ammann, P. E. Tarr, N. Halkik, and B. Mullhaupt. 2008. 'Alveolar echinococcosis: from a deadly disease to a well-controlled infection. Relative survival and economic analysis in Switzerland over the last 35 years', *J Hepatol*, 49: 72-7.
- Tsai, I. J., M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garcarrubio, A. Sanchez-Flores, K. L. Brooks, A. Tracey, R. J. Bobes, G. Fragoso, E. Scitutto, M. Aslett, H. Beasley, H. M. Bennett, X. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T. A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernandez, P. W. H. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S. S. Hung, L. Kamenetzky, J. A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. Macchiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddiford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J. D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, J. Cai, X. Soberon, P. D. Olson, J. P. Lacleste, K. Brehm, and M. Berriman. 2013. 'The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism', *Nature*, 496: 57-63.
- Ui-Tei, K., and K. Saigo. 2004. '[Molecular mechanism of RNA interference and the selection of highly effective siRNA sequences]', *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 49: 2662-70.

- Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010. 'Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 700-14.
- Varela, M. L., M. Mogildea, I. Moreno, and A. Lopes. 2018. 'Acute Inflammation and Metabolism', *Inflammation*, 41: 1115-27.
- Vilar, M. 2017. 'Structural Characterization of the p75 Neurotrophin Receptor: A Stranger in the TNFR Superfamily', *Vitam Horm*, 104: 57-87.
- Vilar, M., M. Murillo-Carretero, H. Mira, K. Magnusson, V. Besset, and C. F. Ibáñez. 2006. 'Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle', *Embo j*, 25: 1219-30.
- Vilcek, J., and T. H. Lee. 1991. 'Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions', *J Biol Chem*, 266: 7313-6.
- Vuitton, D. A., and B. Gottstein. 2010. 'Echinococcus multilocularis and its intermediate host: a model of parasite-host interplay', *J Biomed Biotechnol*, 2010: 923193.
- Wajant, H., F. Henkler, and P. Scheurich. 2001. 'The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators', *Cell Signal*, 13: 389-400.
- Wajant, H., and P. Scheurich. 2011. 'TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway', *Febs j*, 278: 862-76.
- Wajant, H., and D. Siegmund. 2019. 'TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages', *Front Cell Dev Biol*, 7: 91.
- Wang, J., and B. Gottstein. 2016. 'Immunoregulation in larval Echinococcus multilocularis infection', *Parasite Immunol*, 38: 182-92.
- Wang, J., R. Lin, W. Zhang, L. Li, B. Gottstein, O. Blagosklonov, G. Lü, C. Zhang, X. Lu, D. A. Vuitton, and H. Wen. 2014. 'Transcriptional profiles of cytokine/chemokine factors of immune cell-homing to the parasitic lesions: a comprehensive one-year course study in the liver of E. multilocularis-infected mice', *PLoS One*, 9: e91638.
- Wang, K. C., J. A. Kim, R. Sivasankaran, R. Segal, and Z. He. 2002. 'P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp', *Nature*, 420: 74-8.
- Wang, S., X. Luo, S. Zhang, C. Yin, Y. Dou, and X. Cai. 2014. 'Identification of putative insulin-like peptides and components of insulin signaling pathways in parasitic platyhelminths by the use of genome-wide screening', *Febs j*, 281: 877-93.
- Ware, C. F., P. D. Crowe, T. L. Vanarsdale, J. L. Andrews, M. H. Grayson, R. Jerzy, C. A. Smith, and R. G. Goodwin. 1991. 'Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells', *J Immunol*, 147: 4229-38.
- Watts, A. D., N. H. Hunt, Y. Wanigasekara, G. Bloomfield, D. Wallach, B. D. Roufogalis, and G. Chaudhri. 1999. 'A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'', *Embo j*, 18: 2119-26.
- Weiner, S. M., V. Krenn, C. Koelbel, H. G. Hoffmann, K. Hinkeldey, and D. Ockert. 2011. 'Echinococcus multilocularis infection and TNF inhibitor treatment in a patient with rheumatoid arthritis', *Rheumatol Int*, 31: 1399-400.

- Weskamp, G., J. Schlöndorff, L. Lum, J. D. Becherer, T. W. Kim, P. Saftig, D. Hartmann, G. Murphy, and C. P. Blobel. 2004. 'Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR)', *J Biol Chem*, 279: 4241-9.
- Wessel, D., and U. I. Flügge. 1984. 'A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids', *Anal Biochem*, 138: 141-3.
- White, A. C., P. Cloutier, and R. T. Coughlin. 1991. 'A purified saponin acts as an adjuvant for a T-independent antigen', *Adv Exp Med Biol*, 303: 207-10.
- WHO. 2021. 'Control of Neglected tropical diseases'.
http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/.
- WHO/OIE. 2001. "Manual on Echinococcosis: Echinococcosis in Humans and Animals: A public Health Problem of Global Concern." In, edited by World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Health Organisation.
- Wilson, K. H. 2009. 'The genome sequence of the protostome *Daphnia pulex* encodes respective orthologues of a neurotrophin, a Trk and a p75NTR: evolution of neurotrophin signaling components and related proteins in the bilateria', *BMC Evol Biol*, 9: 243.
- Wong, L. W., J. Y. Tann, C. F. Ibanez, and S. Sajikumar. 2019. 'The p75 Neurotrophin Receptor Is an Essential Mediator of Impairments in Hippocampal-Dependent Associative Plasticity and Memory Induced by Sleep Deprivation', *J Neurosci*, 39: 5452-65.
- Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P. M. Schantz, P. S. Craig, and A. Ito. 2005. 'Echinococcus shiquicus n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China', *Int J Parasitol*, 35: 693-701.
- Yamashita, T., K. L. Tucker, and Y. A. Barde. 1999. 'Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth', *Neuron*, 24: 585-93.
- Yan, H., and M. V. Chao. 1991. 'Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding', *J Biol Chem*, 266: 12099-104.
- Yano, H., and M. V. Chao. 2000. 'Neurotrophin receptor structure and interactions', *Pharm Acta Helv*, 74: 253-60.
- Yao, X. Q., S. S. Jiao, K. Saadipour, F. Zeng, Q. H. Wang, C. Zhu, L. L. Shen, G. H. Zeng, C. R. Liang, J. Wang, Y. H. Liu, H. Y. Hou, X. Xu, Y. P. Su, X. T. Fan, H. L. Xiao, L. F. Lue, Y. Q. Zeng, B. Giunta, J. H. Zhong, D. G. Walker, H. D. Zhou, J. Tan, X. F. Zhou, and Y. J. Wang. 2015. 'p75NTR ectodomain is a physiological neuroprotective molecule against amyloid-beta toxicity in the brain of Alzheimer's disease', *Mol Psychiatry*, 20: 1301-10.
- Yeaman, C., A. H. Le Gall, A. N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. Le Bivic, and E. Rodriguez-Boulan. 1997. 'The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells', *J Cell Biol*, 139: 929-40.
- Zagrebelsky, M., A. Holz, G. Dechant, Y. A. Barde, T. Bonhoeffer, and M. Korte. 2005. 'The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons', *J Neurosci*, 25: 9989-99.
- Zampieri, N., C. F. Xu, T. A. Neubert, and M. V. Chao. 2005. 'Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains', *J Biol Chem*, 280: 14563-71.

- Zanin, J. P., J. L. Verpeut, Y. Li, M. W. Shiflett, S. S. Wang, V. Santhakumar, and W. J. Friedman. 2019. 'The p75NTR Influences Cerebellar Circuit Development and Adult Behavior via Regulation of Cell Cycle Duration of Granule Cell Progenitors', *J Neurosci*, 39: 9119-29.
- Zavala-Góngora, R., B. Derrer, V. Gelmedin, P. Knaus, and K. Brehm. 2008. 'Molecular characterisation of a second structurally unusual AR-Smad without an MH1 domain and a Smad4 orthologue from *Echinococcus multilocularis*', *Int J Parasitol*, 38: 161-76.
- Zavala-Góngora, R., A. Kroner, P. Bernthaler, P. Knaus, and K. Brehm. 2006. 'A member of the transforming growth factor-beta receptor family from *Echinococcus multilocularis* is activated by human bone morphogenetic protein 2', *Mol Biochem Parasitol*, 146: 265-71.
- Zavala-Góngora, R., A. Kroner, B. Wittek, P. Knaus, and K. Brehm. 2003. 'Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*', *Int J Parasitol*, 33: 1665-77.
- Zhang, C., J. Wang, G. Lu, J. Li, X. Lu, G. Manton, D. A. Vuitton, H. Wen, and R. Lin. 2012. 'Hepatocyte proliferation/growth arrest balance in the liver of mice during *E. multilocularis* infection: a coordinated 3-stage course', *PLoS One*, 7: e30127.
- Zhou, X., Y. Zhao, R. Zhou, and H. Zhang. 2013. 'Suppression of *E. multilocularis* hydatid cysts after ionizing radiation exposure', *PLoS Negl Trop Dis*, 7: e2518.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Position der Gattung <i>Echinococcus</i> :	12
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>Echinococcus multilocularis</i> : (Torgerson PR, Keller K, Magnotta M, Ragland N (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_life_cycle_of_Echinococcus_multilocularis.jpg), https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode)	14
Abbildung 3: Anzahl der gemeldeten Fälle von AE in Deutschland:	15
Abbildung 4: Ligand-Rezeptor-Interaktion in der TNF/TNFR-Superfamilie:.....	25
Abbildung 5: Ligand-Rezeptor-Interaktion in der TNF/TNFR-Superfamilie:.....	33
Abbildung 6: TNF- α Signalweg:	37
Abbildung 7: Darstellung der Genstruktur von <i>emtnfr</i> (EmuJ_000990500) in IGV:	91
Abbildung 8: Vergrößerte Darstellung der letzten 3 Exons von <i>emtnfr</i> in IGV:	92
Abbildung 9: Sashimi Blot der Genstruktur von <i>emtnfr</i> :	94
Abbildung 10: Schematische Darstellung von EmTNFR, EmTNFR-V2 und EmTNFR-V3:	97
Abbildung 11: Alignment der Proteinsequenzen verschiedener TNF-Rezeptoren:	99
Abbildung 12: Phylogenetische Analyse von TNFR1, TNFR2 und TNFR16 Mitgliedern:	101
Abbildung 13: Verschiedene Klone von <i>emtnfr</i> und deren entsprechende Proteinstruktur:	104
Abbildung 14: Expressionsdaten von <i>emtnfr</i> in den verschiedenen Stadien von <i>E. multilocularis</i> :	106
Abbildung 15: Western Blot mit Material unterschiedlicher Parasitenstadien von unterschiedlichen Isolaten mit α -EmTNFR als 1. Antikörper:.....	107

Abbildung 16: Prozentuale Darstellung der Expression von EmTNFR in unterschiedlichen Parasitenstadien im quantitativen Western Blot:.....	110
Abbildung 17: Auswertung des zweiten quantitativen Western Blots der Expression von EmTNFR in unterschiedlich alten MZ:	111
Abbildung 18: Darstellung eines möglichen TNF- α Signalweges bei <i>E. multilocularis</i> :	117
Abbildung 19: Darstellung eines möglichen durch p75 ^{NTR} vermittelten intrazellulären Signalweges bei <i>E. multilocularis</i> :	120
Abbildung 20: Kavitäten in Primärzellversuchen nach einer Behandlung mit TNF- α über 11, 22 und 28 Tage:	124
Abbildung 21: Verlauf der Vesikelbildung in der Primärzellkultur unter einer TNF- α Behandlung:	125
Abbildung 22: Quantitative Echtzeit-PCR der <i>emtnfr</i> -Expression in Primärzellen nach einer TNF- α Behandlung:	126
Abbildung 23: Kavitäten im Primärzellversuch nach einer Behandlung mit TNF- α über 5, 7 und 23 Tage:	129
Abbildung 24: Anzahl an Vesikeln in der Primärzellkultur unter der Behandlung mit TNF- α :	131
Abbildung 25: Quantitative Echtzeit-PCR der Genexpression von <i>emtnfr</i> an Tag 3:..	134
Abbildung 26: Quantitative Echtzeit-PCR der Genexpression von <i>emtnfr</i> an Tag 20 nach Knockdown:	135
Abbildung 27: PZ-Kultur an Tag 12 nach Knockdown von <i>emtnfr</i> :	137
Abbildung 28: Durchmesser der Kavitäten an Tag 12 des <i>emtnfr</i> -Knockdown-Versuches:	139
Abbildung 29: Vesikelbildung in der Primärzellkultur im Verlauf über 20 Tage nach dem Knockdown von <i>emtnfr</i> :	141

Abbildung 30: Coomassie-Gel zum Nachweis des rekombinanten EmTNFR aus Induktionskultur:.....	145
Abbildung 31: Western Blot nach Protein-Aufreinigung des rekombinanten Proteins des extrazellulären Abschnittes von EmTNFR:	147
Abbildung 32: Dot Blot des rekombinanten TNF-Rezeptors:.....	149
Abbildung 33: Western Blot zum Nachweis von EmTNFR in verschiedenen Proben des Fuchsbandwurmes:	150
Abbildung 34: Western Blot zum Nachweis von EmTNFR in verschiedenen Fuchsbandwurmproben mit aufgereinigtem polyklonalen α -EmTNFR:.	151
Abbildung 35: Quantitative Echtzeit-PCR zur Untersuchung der Anzahl der Transkripte von <i>emtnfr</i> : Proben:	154
Abbildung 36: Expression von <i>emtnfr</i> (kurzes & langes Transkript) in qPCR mit Verwendung von random Primer:	155
Abbildung 37: Western Blot zum Nachweis einer löslichen Form von EmTNFR aus dem Zellkulturmedium:	158
Abbildung 38: Western Blots zur Untersuchung unklarer Banden:	160
Abbildung 39: Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung von <i>emtnfr</i> in MZ:	163

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PNM-Klassifikation der WHO-IWGE für die AE	18
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	48
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper	49
Tabelle 4: Pipettierschema für einen 20 µl PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase	53
Tabelle 5: PCR-Programm mit Taq-Polymerase	53
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Arbeitslösungen	59
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele	60
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme	70
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Medien	72
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Isolate	73
Tabelle 11: Übersicht über Mitglieder des TNFR- oder NGFR-Signalweges bei <i>E. multilocularis</i> :	113
Tabelle 12: Ko-Rezeptoren von p75 ^{NTR} im Genom des Fuchsbandwurmes:	121

11 Anhang

11.1 Mitglieder der TNF-Superfamilie

Symbol	Name	Synonym	UniProt ID (Homo sapiens)
TNFSF 1	Lymphotoxin alpha	LT- α , TNF- β	P01374
TNFSF 2	Tumor necrosis factor alpha	TNF- α	P01375
TNFSF 3	Lymphotoxin beta	LT- β , TNF- γ	Q06643
TNFSF 4	OX40 Ligand	CD252, Gp34	P23510
TNFSF 5	CD40 Ligand	CD154, Gp39, TRAP	P29965
TNFSF 6	Fas Ligand	FasL, CD95L, Apo1L	P48023
TNFSF 7	CD27 Ligand	CD27L, CD70	P32970
TNFSF 8	CD30 Ligand	CD30L, CD153	P32971
TNFSF 9	CD 137 Ligand	CD137L, 4-1BBL	P41273
TNFSF 10	TNF-related apoptosis-inducing ligand	TRAIL, Apo2L, CD253	P50591
TNFSF 11	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand	RANKL, TRACE, CD254	Q14788
TNFSF 12	TNF-related weak inducer of apoptosis	TWEAK, Apo3L	O43508
TNFSF 13	A proliferation-inducing ligand	APRIL, CD256, TALL2	O75888
TNFSF 13B	B-cell activating factor	BAFF, CD257, BlyS	Q9Y275

TNFSF 14	LIGHT	CD258, HVEM	Q43557
TNFSF 15	Vascular endothelial growth inhibitor	VEGI, TL-1A	Q95150
TNFSF 18	GITRL	AITRL, TL-6	Q9UNG2
	Ectodysplasin A	EDA-A1	Q92838-1
	Ectodysplasin A	EDA-A2	Q92838-3

11.2 Mitglieder der TNFR-Superfamilie

Symbol	Name	Synonym	Ligand	UniProt ID (Human)
TNFRSF 1	Tumor necrosis factor receptor 1	TNFR1, CD120a	TNF- α , LT- α , LT- β	P19438
	Tumor necrosis factor receptor 2	TNFR2, CD120b	TNF- α , LT- α	P20333
TNFRSF 3	Lymphotoxin- β receptor	CD18, LT β R	LT- β , LT- α	P36941
TNFRSF 4	OX40	CD134	OX40L	P43489
TNFRSF 5	CD40	Bp50	CD40L	P25942
TNFRSF 6	FAS	APT1, CD95	FasL	P25445
	Decoy receptor 3	DcR3, TR6	FasL, LIGHT	O95407
TNFRSF 7	CD27	T14	CD27L	P26842
TNFRSF 8	CD30	Ki-1-antigen	CD30L	P28908
TNFRSF 9	4-1BB ligand receptor	CD137	4-1BB ligand	Q07011
TNFRSF 10	Death receptor 4	TRAIL-R1, CD261	TRAIL/Apo2L	O00220
	Death receptor 5	TRAIL-R2, CD262		O14763
	Decoy receptor 1	TRAIL-R3, CD263		O14798
	Decoy receptor 2	TRAIL-R4, CD264		Q9UBN6
TNFRSF 11	RANK	CD265, ODFR	RANKL	Q9Y6Q6
	Osteoprotegerin	OPG, OCIF		O00300
TNFRSF 12	TWEAK receptor	Fn14, CD266	TWEAK	Q9NP84
TNFRSF 13	TACI	CD267, 13B	APRIL, BAFF	O14836

	BAFF receptor	BR3, BAFFR, CD268	BAFF	Q96RJ3
TNFRSF 14	Herpesvirus entry mediator	HVEM, CD270	LIGHT	Q92956
TNFRSF 16	Nerve growth factor receptor	<i>p75^{NTR}</i> , NGFR, CD271	NGF (kein TNFSF-Mitglied)	P08138
TNFRSF 17	B-cell maturation antigen	BCM, BCMA, CD269	BAFF, APRIL	Q02223
TNFRSF 18	Glucocorticoid-induced TNFR-related	AITR, GITR, CD357	GITRL	Q9Y5U5
TNFRSF 19	TROY	TAJ, TRADE	unbekannt	Q9NS68
TNFRSF19L	RELT	19L	unbekannt	Q969Z4
TNFRSF 21	Death receptor 6	DR6, CD358	N-APP (kein TNFSF-Mitglied)	O75509
TNFRSF 25	Death receptor 3	APO3, DR3, TRAMP	TL-1A, TWEAK	Q93038
TNFRSF 27	Ectodyslasin A2 receptor	XEDAR, EDA2R	EDA-A2	Q9HAV5
	Ectodysplasins-A-receptor	EDAR	EDA-A1	Q9UNE0

11.3 kodierende Sequenzen

11.3.1 *emtnfr*

1	ATGCTGATTC	TGCTTCTGAT	CTTGACTCTT	CTCTCTTCCT	TCCGGTG TTC
51	CGCTATGCCC	CATGCCCTTC	AACAATCTCT	CAATTCCTACT	CAGTTGGATC
101	CAATTCAACG	GGAAACCTGC	CCTAGCGCAA	ATGAAGAGTT	GGTTTCCACT
151	CTGAATGGAC	CGCTGAGATG	CTGCAATAAA	TGCCCCTCTG	GCGAAGGGAT
201	GCTTCAACTC	TGCACCAACC	AAACACAGAC	TGTCTGCAGA	CCTTGTCAAG
251	AGGGTTCGGA	GTTCTCTCTG	GAGGCCTCTG	CAACTGCCAA	ATGTATGCAG
301	TGCAGGCAAT	GTCAAGAGTT	GCATCCATTT	GCCAAGTTTC	GCAAACACTG
351	TACGCCTACG	TCGGACGCTG	TCTGTGAATG	TGTTTCAGGC	TACTTCTTCA
401	TTGAAGCCCA	TTCCACCTGC	CAAAGTTGCA	CAAAATGCCC	TCCCGGTCAG
451	GGCGCTGAGA	AGCCTTGTGA	ATGGAACGAG	AACAGCGTGT	GCAAGCCCTG
501	TGCTGAGGGC	ACCTGGTCGG	CAACGGACTC	TGCCACGGAA	ACATGCCAGA
551	CCTGCAGAAG	GTGTAACCCC	GGGCAGATCG	AAATGCGGCT	TTGTACAGCC
601	ACACAAATCC	CCGTGTGCTG	CCCCTTGCAT	AACCCCAATT	GGCAGGACAC
651	GTTCGCAGAG	GCTGAATTCC	ACGAACCAAA	GTCTATCCAA	AACCAAGGGC
701	AGTGCGCAGA	AGACCAGGCG	GCTTCACAAC	TGGCCTACGG	TGATGACTAT
751	CCAATGATCA	CGATATACTG	CTCTTTGCTT	GGACTGGTGA	TTCTCACCT
801	TCTTATTTAT	GTGTTCTACA	AGCTGTGGCA	GCAGCGATTA	TCAGCGGAAG
851	ATGCCAAAAC	TATTGAAGCG	GACGTCTTTT	ATCCCGCATT	TATGGGACTC
901	AAGTCTGGTG	GAGGCAAATC	GAGGAGCTCC	AAGATGTCCG	CTTCCTCAA
951	GGTTACAACG	GATCGACAGC	ACTTGCTCGG	CGGATTACAG	CAGTATTCAT
1001	GCACCCTACA	AAATCCCACG	CTTCATGACG	CACTTCTAAC	AGAATTGTCC

1051	CAAGGCCTAG	CAGTTGAGAA	TCGATGGAAA	GATGTTGGTG	GATTGTTGGG
1101	TTTCAGCGAA	GAATCTCTTC	AAAATTTCGA	GGTGGGAGCT	TCTGAGAAAA
1151	CTTCAAACCTC	GGTAGATTCA	GCTGCTGTCTG	CGACTCGGCT	GATGTTGACT
1201	TCCTGGTATT	CTGCAAGAGC	TGCGACGGAT	GCTGATCCTC	TGAGGTCACT
1251	GCTGATGGTT	TTAGGATGCA	CTCCAAGCAC	TGGACACCTT	TGTCGATGGT
1301	TGAAAGAATA	CATGAAACAT	TCTAGCATCG	CACCTTGCTA	CGCAATACCC
1351	CCAACAGAAT	CGCCATCTCA	GTCGCCGGCT	ACAGCAATTT	CTCCTGAAGC
1401	CCAGAACATC	AGTAATCACT	GA		

11.3.2 *emtnfr-v2*

1	ATGCTGATTC	TGCTTCTGAT	CTTGACTCTT	CTCTCTTCCT	TCCGGTGTTT
51	CGCTATGCCC	CATGCCCTTC	AACAATCTCT	CAATTCCTACT	CAGTTGGATC
101	CAATTCAACG	GGAAACCTGC	CCTAGCGCAA	ATGAAGAGTT	GGTTTCCACT
151	CTGAATGGAC	CGCTGAGATG	CTGCAATAAA	TGCCCTCTG	GCGAAGGGAT
201	GCTTCAAACCTC	TGCACCAACC	AAACACAGAC	TGTCTGCAGA	CCTTGTCAAG
251	AGGGTTCGGA	GTTCTCTCTG	GAGGCCTCTG	CAACTGCCAA	ATGTATGCAG
301	TGCAGGCAAT	GTCAAGAGTT	GCATCCATTT	GCCAAGTTTC	GCAAACACTG
351	TACGCCTACG	TCGGACGCTG	TCTGTGAATG	TGTTTCAGGC	TACTTCTTCA
401	TTGAAGCCCA	TTCCACCTGC	CAAAGTTGCA	CAAATGCCC	TCCCGGTCAG
451	GGCGCTGAGA	AGCCTTGTGA	ATGGAACGAG	AACAGCGTGT	GCAAGCCCTG
501	TGCTGAGGGC	ACCTGGTCGG	CAACGGACTC	TGCCACGGAA	ACATGCCAGA
551	CCTGCAGAAG	GTGTAACCCC	GGGCAGATCG	AAATGCGGCT	TTGTACAGCC
601	ACACAAATCC	CCGTGTGCTG	CCCCTTGCAT	AACCCCAATT	GGCAGGACAC

651	GTTCGCAGAG	GCTGAATTCC	ACGAACCAAA	GTCTATCCAA	AACCAAGGGC
701	AGTGCGCAGA	AGACCAGGCG	GCTTCACAAC	TGGCCTACGG	TGATGACTAT
751	CCAATGATCA	CGATATACTG	CTCTTTGCTT	GGACTGGTGA	TTCTCACCT
801	TCTTATTTAT	GTGTTCTACA	AGCTGTGGCA	GCAGCGATTA	TCAGCGGAAG
851	ATGCCAAAAC	TATTGAAGCG	GACGTCTTTT	ATCCCGCATT	TATGGGACTC
901	AAGTCTGGTG	GAGGCAAATC	GAGGAGCTCC	AAGATGTCCG	CTTCCTCAAA
951	GGTTACAACG	GATCGACAGC	ACTTGCTCGG	CGGATTACAG	CAGTATTCAT
1001	GCACCCTACA	AAATCCCACG	CTTCATGACG	CACTTCTAAC	AGAATTGTCC
1051	CAAGGCCTAG	CAGTTGAGAA	TCGATGGAAA	GATGTTGGTG	GATTGTTGGG
1101	TAGGCTGAAT	TACCAAGCAA	ATATAAAGCC	TTAA	

11.3.3 emtnfr-v3

1	ATGCCACCGA	TTAGCCAGCA	GTCGGAGGGT	CAGTTGGGTT	TTTATCAAAT
51	ACGTGCAGGC	GCCCAGGCGG	CTGCAAGTGG	CCTCGAATCA	AATTGGATCT
101	CTTTCTCTGA	AAAGGGGATC	TCCCACGACC	TTAATGGAAC	TCTAGATTCC
151	ATGAACATCA	AGACGGCTTT	TCGCATTGAG	GAACCAAAGT	CTATCCAAAA
201	CCAAGGGCAG	TGCGCAGAAG	ACCAGGCGGC	TTCACAACCTG	GCCTACGGTG
251	ATGACTATCC	AATGATCACG	ATATACTGCT	CTTTGCTTGG	ACTGGTGATT
301	CTCACCCCTC	TTATTTATGT	GTTCTACAAG	CTGTGGCAGC	AGCGATTATC
351	AGCGGAAGAT	GCCAAAATA	TTGAAGCGGA	CGTCTTTTAT	CCCGCATTTA
401	TGGGACTCAA	GTCTGGTGGA	GGCAAATCGA	GGAGCTCCAA	GATGTCCGCT
451	TCCTCAAAGG	TTACAACGGA	TCGACAGCAC	TTGCTCGGCG	GATTACAGCA
501	GTATTCATGC	ACCCTACAAA	ATCCCACGCT	TCATGACGCA	CTTCTAACAG

551	AATTGTCCCA	AGGCCTAGCA	GTTGAGAATC	GATGGAAAGA	TGTTGGTGGA
601	TTGTTGGGTT	TCAGCGAAGA	ATCTCTTCAA	AATTTGAGG	TGGGAGCTTC
651	TGAGAAAAC	TCAAACTCGG	TAGATTCAGC	TGCTGTCGCG	ACTCGGCTGA
701	TGTTGACTTC	CTGGTATTCT	GCAAGAGCTG	CGACGGATGC	TGATCCTCTG
751	AGGTCACTGC	TGATGGTTTT	AGGATGCACT	CCAAGCACTG	GACACCTTTG
801	TCGATGGTTG	AAAGAATACA	TGAAACATTC	TAGCATCGCA	CCTTGCTACG
851	CAATACCCCC	AACAGAATCG	CCATCTCAGT	CGCCGGCTAC	AGCAATTCT
901	CCTGAAGCCC	AGAACATCAG	TAATCACTGA		

11.4 Proteinsequenzen

11.4.1 EmTNFR

1	MLLLLLLITL	LSSFRCSAMP	HALQQSLNST	QLDPIQRETC	PSANEELVST
51	LNGPLRCCNK	CPSGEGMLQL	CTNQTQTVCR	PCQEGSEFSL	EASATAKCMQ
101	CRQCQELHPF	AKFRKHCTPT	SDAVCECVSG	YFFIEAHSTC	QSCTKCPPGQ
151	GAEKPCEWNE	NSVCKPCAEG	TWSATDSATE	TCQTCRR CNP	GQIEMRLCTA
201	TQIPVCCPLH	NPNWQDTFAE	AEFH EPKSIQ	NQGQCAEDQA	ASQLAYGDDY
251	PMIT IYCSLL	GLVILTLLIY	VFYKLWQQRL	SAEDAKTIEA	DVFYPAFMGL
301	KSGGGKSRSS	KMSASSKVTT	DRQHLLGGLQ	QYSCTLQNPT	LHDALLTELS
351	QGLAVENRWK	DVGGLLGFSE	ESLQNF E VGA	SEKTSNSVDS	AAVATRLMLT
401	SWYSARAATD	ADPLRSLLMV	LGCTPSTGHL	CRWLKEYMKH	SSIAPCYAIP
451	PTESPSQSPA	TAISPEAQNI	SNH*		

11.4.2 EmTNFR-V2

1	MLLLLLLITL	LSSFRCSAMP	HALQQSLNST	QLDPIQRETC	PSANEELVST
51	LNGPLRCCNK	CPSGEGMLQL	CTNQTQTVCR	PCQEGSEFSL	EASATAKCMQ
101	CRQCQELHPF	AKFRKHCTPT	SDAVCECVSG	YFFIEAHSTC	QSCTKCPPGQ
151	GAEKPCEWNE	NSVCKPCAEG	TWSATDSATE	TCQTCRR CNP	GQIEMRLCTA
201	TQIPVCCPLH	NPNWQDTFAE	AEFH EPKSIQ	NQGQCAEDQA	ASQLAYGDDY
251	PMIT IYCSLL	GLVILTLLIY	VFYKLWQQRL	SAEDAKTIEA	DVFYPAFMGL
301	KSGGGKSRSS	KMSASSKVTT	DRQHLLGGLQ	QYSCTLQNPT	LHDALLTELS
351	QGLAVENRWK	DVGGLLGRLN	YQANIKP*		

11.4.3 EmTNFR-V3

1	MPPISQQSEG	QLGFYQIRAG	AQAAASGLES	NWISFSEKGI	SHDLNGTLDS
51	MNIKTAFRIE	EPKSIQNQGQ	CAEDQAASQL	AYGDDYPMIT	IYCSLLGLVI
101	LTLIIYVFYK	LWQQRLSAED	AKTIEADVfy	PAFMGLKSGG	GKSRSSKMSA
151	SSKVTTDRQH	LLGGLQQYSC	TLQNPTLHDA	LLTELSQGLA	VENRWKDVGG
201	LLGFSEESLQ	NFEVGASEKT	SNSVDSAAVA	TRLMLTSWYS	ARAATDADPL
251	RSLLMVLGCT	PSTGHLCRWL	KEYMKHSSIA	PCYAIPTES	PSQSPATAIS
301	PEAQNISNH*				

11.5 Proteinsequenzen für die phylogentische Analyse von EmTNFR

Protein	Organismus	Accession number
Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie	<i>Echinococcus multilocularis</i>	CDS42197.1
Tumornekrosefaktor-Rezeptor	<i>Echinococcus granulosus</i>	CDS17169.1
Tumornekrosefaktor-Rezeptor	<i>Schistosoma mansoni</i>	ACS92719.1
Tumornekrosefaktor-Rezeptor (related)	<i>Schistosoma haematobium</i>	XP_012791959.2
Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilien Mitglied	<i>Hymenolepis microstoma</i>	CDS30880.1
Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (auch TNFR 1b genannt)	<i>Bos taurus</i>	DAA21267.1
	<i>Danio rerio</i>	NP_001082979.2
	<i>Homo sapiens</i>	AAA36755.1
	<i>Mus musculus</i>	EDL29730.1
Tumornekrosefaktor Rezeptor 1	<i>Bos taurus</i>	AAI13279.1
	<i>Danio rerio</i>	AAH68424.1
	<i>Gallus gallus</i>	NP_001025950.1
	<i>Homo sapiens</i>	AAA36754.1
	<i>Mus musculus</i>	AAA40465.1
	<i>Xenopus laevis</i>	BAF95748.1
Tumornekrosefaktor-Rezeptor 16 (nerve growth factor receptor)	<i>Bos taurus</i>	DAA18576.1
	<i>Danio rerio</i>	XP_700985.3
	<i>Gallus gallus</i>	P18519.1
	<i>Homo sapiens</i>	EAW94677.1
	<i>Mus musculus</i>	AAD17943.1

	<i>Xenopus laevis</i>	XP_018093536.1
	<i>Schistosoma japonicum</i>	TNN08705.1
	<i>Trichinella spiralis</i>	KRY36262.1
	<i>Trichinella nelsoni</i>	KRX16182.1

