

Gonadenspezifische Transkriptionsanalysen und erste  
Charakterisierungen von Transmembranrezeptoren aus  
*Schistosoma mansoni*

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie und Chemie der

Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Steffen Hahnel**

geboren am 26.12.1979 in Gießen

Gießen, August 2013



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Parasitologie des Fachbereiches Veterinärmedizin (FB 10) der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt

Dekan des Fachbereiches Biologie und Chemie (FB 08): Prof. Dr. Holger Zorn

Erstgutachter: Prof. Dr. Adriaan W. C. Dorresteyn

Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christoph G. Grevelding

Institut für Parasitologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 09.08.2013

Disputation am:



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1 <i>Schistosoma mansoni</i> - Schistosomiasis und Lebenszyklus .....	10
1.2 <i>S. mansoni</i> - Genom-Projekt und „Post-Genomics“ .....	12
1.3 Reproduktionsbiologie adulter <i>S. mansoni</i> .....	14
1.4 Die Beteiligung von Signalmolekülen an paarungsinduzierten Entwicklungsprozessen adulter <i>S. mansoni</i> .....	17
1.5 Transmembranrezeptoren in <i>S. mansoni</i> .....	21
1.5.1 Transmembrane Mucine und ihre Rolle in Signaltransduktionsprozessen .....	24
1.5.2 Neuropeptidrezeptoren in Plattwürmern .....	26
1.5.3 <i>Frizzled</i> -Signalwege .....	27
1.5.4 FGFR-Signalwege .....	30
1.5.5 Progesteron und seine Rezeptoren .....	32
1.6 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	35
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
2.1 Material .....	37
2.1.1 Puffer und Lösungen .....	37
2.1.2 Medien und Zusätze .....	41
2.1.3 Inhibitoren .....	43
2.1.4 Enzyme.....	43
2.1.5 Kommerzielle Kits für molekularbiologische Arbeiten .....	44
2.1.6 Molekulargewichtstandards .....	45
2.1.7 Bakterienstämme .....	45
2.1.8 Verwendete Antikörper .....	45
2.1.9 Primer .....	45
2.1.9.1 Primer zur Sequenzaufklärung ausgewählter Transmembranrezeptoren .....	46
2.1.9.2 Primer für gonadenspezifische RT-PCRs .....	47
2.1.9.3 Primer zur Herstellung von RNA-Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung....	49
2.1.9.4 qPCR-Primer .....	50
2.1.9.5 Primer zur Herstellung von dsRNA .....	51
2.1.9.6 Primer mit angehängten Restriktionsschnittstellen .....	52
2.1.9.7 Primer für <i>in vitro</i> -Mutagenese .....	52

2.1.10	Kommerzielle und rekombinante Plasmide .....	53
2.1.10.1	Kommerzielle Plasmide .....	53
2.1.10.2	Rekombinante Plasmide .....	53
2.1.10.3	Datenbanken und Software-Tools .....	54
2.2	Methoden.....	56
2.2.1	Laborzyklus von <i>Schistosoma mansoni</i> .....	56
2.2.1.1	Infektion des Endwirtes.....	56
2.2.1.2	Perfusion des Endwirtes zur Gewinnung adulter <i>S. mansoni</i> .....	56
2.2.1.3	Gewinnung von <i>S. mansoni</i> Larvenstadien (Miracidien, Cercarien) .....	57
2.2.1.4	Haltung und Infektion des Zwischenwirtes.....	57
2.2.2	Arbeiten mit Bakterien .....	58
2.2.2.1	Anzucht von Bakterienkulturen .....	58
2.2.2.2	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien.....	58
2.2.2.3	Transformation von Hitzeschock-kompetenten Bakterien.....	58
2.2.2.4	Anlegen von Glycerin-Stocks .....	58
2.2.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	59
2.2.3.1	Restriktion von DNA .....	59
2.2.3.2	Klonierung von DNA in Plasmid-Vektoren.....	59
2.2.3.3	Agarosegelelektrophorese von DNA .....	59
2.2.3.4	Agarosegelelektrophorese von RNA.....	60
2.2.3.5	Elution von DNA aus Agarosegelen .....	60
2.2.3.6	Plasmid-Präparation aus transformierten <i>E. coli</i> -Zellen .....	60
2.2.3.7	DNA-Extraktion aus adulten <i>S. mansoni</i> .....	60
2.2.3.8	RNA-Extraktion aus adulten <i>S. mansoni</i> .....	61
2.2.3.9	RNA-Extraktion aus isolierten Testes und Ovarien.....	61
2.2.3.10	Bestimmung der RNA-Qualität mittels BioAnalyzer .....	62
2.2.4	PCR-Methoden.....	62
2.2.4.1	Standard-PCRs .....	62
2.2.4.2	Colony-PCR .....	63
2.2.4.3	<i>In vitro</i> -Mutagenese von Plasmid-DNA .....	63
2.2.4.4	Genome Walking.....	65
2.2.4.5	RT-PCR.....	65
2.2.4.6	Quantitative <i>real time</i> -PCR.....	65
2.2.4.7	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA.....	67
2.2.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	67
2.2.5.1	Herstellung von Gewebeschnitten adulter <i>S. mansoni</i> .....	67

2.2.5.2	<i>In vitro</i> -Transkription zur Synthese von RNA-Sonden.....	68
2.2.5.3	Transkript-Blot .....	69
2.2.5.4	Hybridisierung der Sonden und Farbreaktion .....	70
2.2.6	Isolation von Testes und Ovarien aus adulten <i>S. mansoni</i> .....	71
2.2.7	RNA-Interferenz-Versuche bei adulten <i>S. mansoni</i> .....	73
2.2.7.1	Synthese von dsRNA .....	73
2.2.7.2	Elektroporation adulter <i>S. mansoni</i> .....	73
2.2.8	<i>in vitro</i> -Behandlungen adulter <i>S. mansoni</i> mit Inhibitoren bzw. Antagonisten ...	74
2.2.9	Karminrot-Färbung adulter <i>S. mansoni</i> .....	74
2.2.10	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (KLSM).....	74
2.2.11	<i>Germinal vesicle breakdown</i> -Assays .....	75
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
3.1	Etablierung einer Methode zur Isolation von Gonaden aus adulten <i>S. mansoni</i> und erste Transkriptionsanalysen .....	76
3.1.1	Isolation von Testes und Ovarien aus adulten <i>S. mansoni</i> .....	77
3.1.2	RNA-Isolation aus isolierten Testes und Ovarien.....	82
3.1.3	Gonadenspezifische RT-PCRs .....	84
3.2	Lokalisationsstudien und initiale Transkriptionsanalysen zu Transmembranrezeptoren adulter <i>S. mansoni</i> .....	88
3.2.1	Lokalisation von Rezeptoren über Organ-spezifische RT-PCRs.....	88
3.2.2	Verifizierung der Lokalisation ausgewählter Rezeptoren über <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	92
3.2.3	Quantifizierung der Transkription ausgewählter Rezeptoren über qPCR.....	94
3.3	Weiterführende Charakterisierung ausgewählter Rezeptoren.....	98
3.3.1	Charakterisierung des transmembranen Mucins SmTmMuc1 aus <i>S. mansoni</i> ....	98
3.3.1.1	Aufklärung der SmTmMuc1-Sequenz .....	99
3.3.1.2	RNAi-Experimente zur funktionalen Analyse der Rolle von SmTmMuc1 in adulten <i>S. mansoni</i> .....	102
3.3.2	Weiterführende Charakterisierung des potentiellen Neuropeptidrezeptors SmNPYR1 aus <i>S. mansoni</i> .....	104
3.3.2.1	Aufklärung der SmNPYR1-Sequenz .....	104
3.3.2.2	RNAi-Experimente zur funktionalen Analyse der Rolle von SmNPYR1 in adulten <i>S. mansoni</i> .....	107
3.3.3	Charakterisierung des <i>Frizzled</i> -Rezeptors SmFrz1 aus <i>S. mansoni</i> .....	109
3.3.3.1	Aufklärung der SmFrz1-Sequenz.....	109
3.3.3.2	Inhibitorbehandlung von <i>S. mansoni</i> -Pärchen .....	111

3.3.3.3	RNAi-Experimente zur funktionellen Analyse der Rolle von SmFrz1 in adulten <i>S. mansoni</i> .....	115
3.3.4	Charakterisierung von zwei FGF-Rezeptoren aus <i>S. mansoni</i> .....	118
3.3.4.1	Aufklärung der SmFGFR1- und SmFGFR2-Sequenzen.....	119
3.3.4.2	Behandlung von <i>S. mansoni</i> -Pärchen mit dem FGFR-Inhibitor BIBF1120 ....	121
3.3.4.3	RNAi-Experimente zur funktionellen Analyse der Rolle von SmFGFR1 und SmFGFR2 in adulten <i>S. mansoni</i> .....	127
3.3.5	Untersuchungen zu zwei Progesteron-bindenden Transmembranrezeptoren und Behandlung adulter <i>S. mansoni</i> mit Progesteron .....	128
3.3.5.1	Aufklärung der Sequenz zweier potentieller transmembranen Progesteron-Rezeptoren SmpMRC1 und SmProgesterinR1 .....	129
3.3.5.2	Behandlung von <i>S. mansoni</i> -Pärchen mit dem Steroidhormon Progesteron ...	133
3.3.5.3	RNAi-Experimente zur funktionellen Analyse der Rolle von SmpMRC1 und SmProgesterinR1 in adulten <i>S. mansoni</i> .....	135
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>137</b>
4.1	Etablierung einer Methode zur Isolation von Testes und Ovarien aus adulten <i>S. mansoni</i> und erste Transkriptionsanalysen ausgewählter Gene .....	137
4.2	Lokalisationsstudien und erste Analysen zur paarungsabhängigen Transkription von Transmembranrezeptoren in adulten <i>S. mansoni</i> .....	144
4.3	Erste Charakterisierungen ausgewählter Transmembranrezeptoren aus <i>S. mansoni</i> ...	152
4.3.1	Charakterisierung des transmembranen Mucins SmTmMuc1 aus <i>S. mansoni</i> ..	152
4.3.2	Charakterisierung des potentiellen Neuropeptidrezeptors SmNPYR1 aus <i>S. mansoni</i> .....	158
4.3.3	Charakterisierung des <i>Frizzled</i> -Rezeptors SmFrz1 aus <i>S. mansoni</i> .....	161
4.3.4	Charakterisierung der FGFR-Rezeptoren SmFGFR1 und SmFGFR2 aus <i>S. mansoni</i> .....	166
4.3.5	Charakterisierung zweier potentieller transmembranen Progesteron-Rezeptoren aus <i>S. mansoni</i> .....	172
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>179</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>184</b>
6.1	SmTmMuc1-Sequenz.....	184
6.2	SmNPYR1-Sequenz .....	186
6.3	SmFrz1-Sequenz .....	187
<b>7.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>189</b>



---

<b>8. Abkürzungen und Einheiten .....</b>	<b>224</b>
8.1 Abkürzungen .....	224
8.2 Einheiten.....	227
8.3 Aminosäuren .....	227
<b>9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>229</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis .....	229
9.2 Tabellenverzeichnis.....	230
<b>10. Veröffentlichungen und Stipendien.....</b>	<b>232</b>
10.1 Publikationen.....	232
10.2 Kongressbeiträge .....	232
10.3 Stipendien.....	233
<b>11. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>234</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>235</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 *Schistosoma mansoni* - Schistosomiasis und Lebenszyklus

*Schistosoma mansoni* und weitere Arten der Gattung *Schistosoma* zählen zu den Erregern der Schistosomiasis (auch Bilharziose), neben der Malaria einer der bedeutendsten parasitären Infektionserkrankungen weltweit. Die globale Verbreitung der Krankheit umfasst 76 Länder, vornehmlich in den tropischen und subtropischen Regionen der Erde, mit über 650 Millionen Menschen, die direkt in Risikogebieten angesiedelt sind (Engels & Chitsulo, 2002; McManus, 2012). Nach Schätzungen der WHO sind weltweit über 200 Millionen Menschen mit dem Parasiten infiziert (WHO/TDR, 2005; WHO *Fact sheet* N°115, 2013). Davon zeigen ca. 20 Millionen schwere Krankheitssymptome. Über 85 % der Infektionen treten auf dem afrikanischen Kontinent auf, mit geschätzten 200 000 Todesfällen pro Jahr (Engels & Chitsulo, 2002). Darüber hinaus besitzt die Krankheit zusätzlich eine große veterinärmedizinische und ökonomische Bedeutung, da einige Schistosomen-Arten neben dem Menschen auch Nutztiere als Endwirte befallen (De Bont & Vercruyse 1998; Eckert et al. 2005; Quack, et al., 2006).

Schistosomen gehören zu den wenigen Vertretern innerhalb der Klasse der *Trematoda*, die im Laufe ihrer Evolution zwei getrennte Geschlechter ausgebildet haben. Die Entwicklung des Parasiten umfasst einen komplexen Lebenszyklus mit einem obligaten Wirtswechsel sowie zwei freilebende Larvenstadien. Innerhalb des Endwirts besiedeln die adulten *S. mansoni* die Mesenterialvenen des Darms. Hier leben beide Geschlechter in einer Dauerkopulation, bei der das fadenförmige Weibchen innerhalb einer Bauchfalte des morphologisch kompakteren Männchens, dem *canalis gynaecophorus*, liegt. Als Folge dieses Paarungskontakts erlangen die weiblichen Würmer ihre Geschlechtsreife und somit die Fähigkeit zur Fortpflanzung. Ein reifes Weibchen ist in der Lage ca. 300 Eier am Tag zu legen (Moore & Sandground, 1956). Diese durchwandern unter Sezernierung proteolytischer Enzyme die Darmwand und werden mit den Fäzes ausgeschieden. Bereits während der Migration der Eier im Darmgewebe kommt es zur Entwicklung der ersten Larvenform, einer als Miracidium bezeichneten Wimpernlarve. Bei Kontakt mit Süßwasser und Sonnenlicht schlüpfen die Miracidien aus den Eiern und infizieren aktiv den Zwischenwirt. Hierbei handelt es sich um Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria*. Innerhalb der Schnecke kommt es zunächst zu einer Umwandlung des Miracidiums in eine Muttersporocyste. Hieran schließt sich eine asexuelle Vermehrungsphase des Parasiten an. Diese erfolgt über mitotische Teilungsprozesse innerhalb der

Muttersporocyste, was letztlich zur Bildung von Tochtorsporocysten führt. Die Tochtorsporocysten wandern in die Mitteldarmdrüse des Zwischenwirts ein und bilden innerhalb von drei bis sieben Wochen nach Infektion die zweite freilebende Larvenform aus. Diese werden als Cercarien bezeichnet und stellen das für den Endwirt infektiöse Parasitenstadium dar. Die Infektion selbst erfolgt über eine Penetration der Haut unter Sekretion proteolytischer Enzyme (McKerrow & Salter, 2002; Ingram et al., 2012). Innerhalb des Endwirts kommt zur Entwicklung des präadulten Schistosomulums, welches über den Blutkreislauf die Pfortader der Leber als adulter Wurm erreicht. Hier kommt es zur Paarung beider Geschlechter, die als Pärchen schließlich den Mesenterialkomplex des Darms besiedeln (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

Die pathologisch betrachtet gravierendsten Folgen der Schistosomiasis gehen nicht auf die Würmer zurück, sondern werden durch die abgelegten Eier des Parasiten hervorgerufen. Von diesen werden nur ca. 50 % ausgeschieden, während die andere Hälfte im Darmgewebe verbleibt oder über den Blutkreislauf in verschiedene Organe, vornehmlich Leber und Milz, transportiert wird. Dies kann zum Verschluss von Blutgefäßen und zu lokalen Entzündungsreaktionen führen. Die Folgen sind neben Schädigungen des Darmgewebes häufig schadhafte Vergrößerungen von Leber und Milz (Hepatosplenomegalie) sowie Aszites. Besonders die Beeinträchtigung der Leber kann unbehandelt zur Leberzirrhose und schließlich zum Tod des Patienten führen (Ross et al., 2002; Gryseels et al., 2006).

Als derzeit wirksamstes Therapeutikum gegen Schistosomiasis steht das gegen adulte Würmer gerichtete Antihelminthikum Praziquantel zur Verfügung (Fenwick et al., 2003). Anders als Alternativ-Präparate wie Oxamniquin wirkt es gegen mehrere humanparasitäre Schistosomenarten und ist daher das Mittel der Wahl für flächendeckende Anwendungen in Endemiegebieten (Fenwick et al., 2003). Allerdings stellen die von staatlichen und internationalen Einrichtungen initiierten Kontrollprogramme aufgrund hoher Kosten und beträchtlicher Reinfektionsraten bisher keine nachhaltige Lösung zur Bekämpfung der Krankheit dar. Zusätzlich mehren sich Anzeichen von Resistenzbildung gegen das Medikament (Doenhoff & Pica-Mattocchia, 2006; Melman et al., 2009; Messerli et al., 2009; Pica-Mattocchia et al., 2009; Wang et al., 2012).

Die Limitierung therapeutischer Mittel sowie das Fehlen einer Vakzine (McManus & Loukas, 2008; Siddiqui et al., 2011) zum langfristigen Schutz gegen Schistosomiasis verdeutlichen die Problematik, welche die Krankheit besonders für Menschen in den Endemiegebieten darstellt und zeigen die Notwendigkeit von alternativen Ansatzpunkten zu ihrer Kontrolle.

## 1.2 *S. mansoni* - Genom-Projekt und „Post-Genomics“

Mit dem Ziel, die Genome von *S. mansoni* sowie *S. japonicum* zu entschlüsseln und so weitere Grundlagen zur Entwicklung neuer Medikamente, Vakzine und diagnostischer Methoden zu schaffen, wurde 1994 das *Schistosome Genome Project* von der *World Health Organization* (WHO) ins Leben gerufen (Degraeve et al., 2001; Zerlotini & Oliveira, 2010; Mourão et al., 2012). Die Sequenzierung des *S. mansoni*-Genoms erfolgte als Kooperation des *Wellcome Trust Sanger Institute* (WTSI) (Cambridge, UK) und dem *The Institute of Genomic Research* (TIGR; jetzt *J. Craig Venter Institute*) (Maryland, USA), die Arbeiten zu *S. japonicum* am *Chinese Human Genome Center* (Shanghai, China). Die Ergebnisse beider Sequenzierungsprojekte wurden 2009 veröffentlicht (Berriman et al., 2009; Zhou et al., 2009) und 2012 durch das Genom von *S. haematobium* ergänzt (Young et al., 2012). Zeitnah zum Start des *S. mansoni*-Genomprojekts begann auch die Analyse des Transkriptom von *S. mansoni* mittels *expressed sequence tags* (ESTs) (Verjovski-Almeida et al., 2003; Oliveira, 2007). Heute sind Genom- und Transkriptomdaten von *S. mansoni* in verschiedenen Datenbanken für die Öffentlichkeit frei zugänglich. Neben den vom WTSI zusammengefassten Rohdaten (aktueller Stand: *Genome assembly* 3.1) stehen mit der *GeneDB* (Protasio et al., 2012) und der *SchistoDB* (Zerlotini et al., 2009; Zerlotini et al., 2013) außerdem zwei automatisch-annotierte Gendatenbanken zu Verfügung. Nach aktuellem Stand umfasst das Genom von *S. mansoni* 380 Mb und enthält insgesamt ca. 10.800 Gene (Protasio et al., 2012).

Die Entschlüsselung des Genoms in Kombination mit EST-Analysen bildete letztlich die notwendige Basis für *in silico*-Analysen einzelner Gene (Cardoso et al., 2006; Rofatto et al., 2009) und ganzer Genfamilien (Roger et al., 2008a, b; Bos et al., 2009; Andrade et al., 2011; Avelar et al., 2011; Zamanian, et al., 2011) bis hin zu weiterführenden Transkriptom-, Proteom- und Glycomanalysen mit unterschiedlichen Fragestellungen zur Biologie von *S. mansoni* (Hokke et al., 2007; Wilson et al., 2007). Hierzu zählen Analysen zur geschlechts- und paarungsabhängigen Expression von Genen in adulten Schistosomen (Hoffmann et al., 2002; Fitzpatrick et al., 2005; Fitzpatrick & Hoffmann, 2006; Waisberg et al. 2007; Verjovski-Almeida et al., 2007; Ojopi et al., 2007), wie auch der Vergleich der Expressionsprofile unterschiedlicher, über den Lebenszyklus verteilter Entwicklungsstadien (Dillon et al., 2006; Vermeire et al., 2006; Jolly et al., 2007; Williams et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2009; Wu et al., 2009; Mathieson & Wilson, 2010; Dewalick et al., 2011, Parker-Manuel et al., 2011) und immunologische Aspekte während der Parasit-Wirtsinteraktion (van

Diepen, et al., 2012). Während viele dieser Analysen auf Ebene ganzer Organismen erfolgten, lieferten Proteomstudien des Teguments adulter *S. mansoni* erstmals Einblick in die Genexpression einzelner Gewebe (Braschi et al., 2006; van Hellemond et al., 2006; Castro-Borges et al., 2011). Einen weiteren Fortschritt in dieser Hinsicht stellte die Publikation von Nawaratna et al. (2011) dar, in der erstmals Transkriptionsprofile einzelner Gewebe und Organe aus adulten *S. mansoni*, wie Testis, Ovar, Vitellarium und Gastrodermis mittels einer Kombination von Lasermikrodissektion und Microarrays untersucht wurden.

Zusammenfassend erbringen diese Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Glycomstudien eine Fülle an Daten, die erste Hinweise auf die Expression und Funktion von Genen bzw. Gengruppen sowie posttranslationale Modifikationen in verschiedenen Lebensstadien, Geschlechtern und Geweben von *S. mansoni* liefern und bilden damit eine Grundlage weiterführender, funktioneller Genanalysen. Diese sind letztlich notwendig, um biologische Prozesse, wie Stadienkonversion, Parasit-Wirtsinteraktion und Reproduktion sowie deren molekulare/biochemische Mechanismen und Grundlagen besser zu verstehen.

Im Vergleich zu verschiedenen Modelorganismen ist das Methodenrepertoire zur Charakterisierung von Genen bei *S. mansoni* aus unterschiedlichen Gründen limitiert. Zunächst besitzt *S. mansoni* einen komplexen Lebenszyklus mit zwei unterschiedlichen Wirten, die den Zugriff auf den Organismus in wichtigen Entwicklungsphasen erschweren und definierte Kulturbedingungen verhindern. Außerdem fehlen *S. mansoni*-Zelllinien, so dass bei Expression-Studien auf heterologe Systeme wie HEK-Zellen oder *Xenopus*-Oocyten ausgewichen werden muss, die immer nur als eine Annäherung an die *in vivo* Bedingungen verstanden werden können (Quack et al., 2010). Durch den massiven Körperbau adulter *S. mansoni* mit einem Parenchym, in das differenzierte Zellen sowie Gewebe eingebettet und von einem widerstandsfähigen Tegument umgeben sind, ist der Zugriff auf definierte Zell- und Gewebetypen kaum möglich. Dies ist allerdings Grundvoraussetzung für zellspezifische Genanalysen und den Zugang zu Stammzellen (Wilson et al., 2007; Quack et al., 2010).

Diese und weitere Gründe erschweren zudem die Etablierung von Transfektionsprotokollen zur Herstellung transgener *S. mansoni*. In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden wie Lipofektion, Elektroporation und Partikel-Bombardement zum Einbringen von Fremd-DNA in *S. mansoni*-Stadien angewandt (Beckmann & Grevelding, 2012). Letzteres ermöglichte eine transiente Transformation über mehrere Generationen mit GFP-Reportergenkonstrukten (Beckmann et al., 2007; Beckmann & Grevelding, 2012). Dennoch blieb bisher der Nachweis einer stabilen Keimbahntransfektion von *S. mansoni* aus.

Vielversprechend erscheint ein neuer Ansatz über virale Vektoren, die eine chromosomale Integration von Reportergenen in die Keimbahn ermöglichen (Rinaldi, et al., 2012). Allerdings wurde die Stabilität der Integration nicht über den gesamten Zyklus untersucht. So fehlt die Bestätigung einer generationsübergreifenden Transfektion.

Demnach stellt RNA-Interferenz (RNAi) derzeit die Methode der Wahl dar, um *S. mansoni*-Stadien genetisch zu manipulieren und über Transkriptreduktion spezifische Genfunktionen zu untersuchen (Beckmann & Grevelding, 2012). Abhängig vom Parasitenstadium wird dabei zum Einbringen genspezifischer siRNAs oder dsRNAs *Soaking* und/oder Elektroporation angewendet. RNAi-Experimente wurden bereits erfolgreich für Eier, Larvalstadien und adulte *S. mansoni* durchgeführt (Beckmann & Grevelding, 2012). Allerdings wirkt RNAi nicht für alle Gene mit der gleichen Effizienz und zeitgleich wächst die Liste jener Gene, die durch RNAi unbeeinflusst bleiben und daher als „*not knockables*“ bezeichnet werden (Krautz-Peterson et al., 2010a; Beckmann & Grevelding, 2012). Weitere Gene können wiederum in ihrer Transkription herunter reguliert werden, ohne allerdings zu einem Phänotyp zu führen (Atkinson et al., 2010; McVeigh et al., 2011).

### 1.3 Reproduktionsbiologie adulter *S. mansoni*

Der komplexe Lebenszyklus von *S. mansoni* mit mehreren, frei lebenden und parasitären Entwicklungsstadien bietet ein breites Arbeitsfeld für die parasitäre Grundlagenforschung. Besonders in den Focus wissenschaftlicher Untersuchungen ist dabei die im Tierreich nahezu einzigartige Reproduktionsbiologie adulter Schistosomen gerückt. Zum einen gehören Schistosomen zu den wenigen getrenntgeschlechtlichen Vertretern der *Trematoda*, zum anderen leben beide Geschlechter in einem permanenten, für die Fortpflanzung notwendigen Paarungskontakt. Dieses Phänomen erlangt zusätzliche Bedeutung durch den Umstand, dass die Eier des Parasiten den eigentlichen Auslöser der Schistosomiasis darstellen (Ross et al., 2002; Gryseels et al., 2006).

Der kontinuierliche Paarungskontakt zwischen den adulten *S. mansoni* ist für die Entwicklung weiblicher Reproduktionsorgane und damit für die Eiablage essentiell (Kunz, 2001; Grevelding, 2004; LoVerde et al., 2004). Während der Paarung liegt das fadenförmige Weibchen in dem *canalis gynaecophorus* des morphologisch kompakteren Männchens. Hierdurch werden im Weibchen Wachstums- und Differenzierungsprozesse induziert, welche zur Reifung von Ovarium und Vitellarium führen. Diese werden begleitet von einer sichtbaren

Größenzunahme, wie morphologische Vergleiche mit paarungsunerfahrenen, immaturren Weibchen aus unisexuellen (*single sex*)-Infektionen zeigen (Erasmus, 1973; Den Hollander & Erasmus, 1985; Popiel, 1986; Kunz, 2001; Knobloch et al., 2002a). Besagter Größenunterschied ist hauptsächlich auf das Wachstum des Vitellariums zurückzuführen, welches in paarungserfahrenen, maturaen Weibchen das größte Organ darstellt. Dies liegt in dem hohen Bedarf an Vitellinzellen für die Eiproduktion begründet. Da die zusammengesetzten Eier von *S. mansoni* aus je einer Oocyte und 30 bis 40 Vitellinzellen bestehen, müssen im Vitellarium, bei einer täglichen Synthese von bis zu 300 Eiern (Moore & Sandground, 1956; Cheever et al., 1994) mehr als 10.000 Vitellinzellen pro Tag gebildet werden (Popiel, 1986). Basierend auf histologischen Untersuchungen wird zwischen vier Stadien der Vitellzellentwicklung unterschieden. In immaturren Weibchen sind ausschließlich undifferenzierte S1-Zellen mit Stammzellcharakter zu finden (Erasmus, 1973; Shaw, 1987). Als Folge der Paarung kommt es im Vitellarium über die als S2 und S3 bezeichneten Zwischenstufen zur Bildung vollständig ausgereifter S4-Vitellinzellen (Erasmus, 1975). Hierbei ist nicht abschließend geklärt, ob die Paarung mitotische Prozesse in S1-Zellen induziert (Kunz, 2001) oder wie eine aktuelle Studie diskutiert, die Apoptose bereits proliferierender S1-Zellen in immaturren Weibchen inhibiert (Galanti et al., 2012).

Das zweite Reproduktionsorgan, dessen Entwicklung direkt durch die Paarung beeinflusst wird, ist das Ovar. Ovarien immaturren Weibchen verfügen ausschließlich über kleine, undifferenzierte Oocyten, sog. Oogonien (Shaw & Erasmus, 1981; Neves et al., 2005; Beckmann et al., 2010b). Erst nach Kontakt mit dem Männchen kommt es zur Bildung primärer Oocyten. Beides, das Fehlen differenzierter Vitellinzellen und Oocyten resultiert letztlich in einem Unvermögen immaturren Weibchen, entwicklungsfähige Eier zu legen. Die hier beschriebenen paarungsinduzierten Entwicklungsprozesse des Weibchens sind allerdings reversibel. Klassische Experimente zeigten, dass Weibchen nach einer Trennung vom Männchen in einem Zeitraum von 35 Tagen morphologisch wieder einen immaturren Phänotyp annehmen (Clough, 1981; Popiel et al., 1984). Eine erneute Verpaarung stellt den maturaen Entwicklungszustand wieder her (Kunz, 2001).

Neben den morphologisch sichtbaren Veränderungen der weiblichen Reproduktionsorgane konnten die Auswirkungen der paarungsinduzierten Reifung auch auf Ebene der Genexpression nachgewiesen werden. Der zunächst für einzelne Gene, wie z.B. den Eischalenvorläuferproteinen p14, p19, und p48 (Chen et al., 1992; Grevelding et al., 1997; Michel et al., 2003; Cogswell et al., 2012) gezeigte Einfluss der Paarung auf

Transkriptionsprozesse im Weibchen hat sich mittlerweile u.a. durch SAGE- und Microarray-Analysen für eine Vielzahl weiterer Gene bestätigt (Fitzpatrick et al., 2006; Waisberg et al., 2007).

Im Gegensatz zum Weibchen ist der Einfluss der Paarung auf die Morphologie der Männchen wesentlich geringer. Paarungsunerfahrene Männchen besitzen die gleiche Körpergröße wie paarungserfahrene Männchen und verfügen bereits über vollständig differenzierte, zur Spermienproduktion befähigte Testes (Armstrong, 1965). Allerdings gibt es Hinweise, dass die Größe der Testesloben abhängig vom Paarungsstatus leicht variieren kann, wie eine morphologischen Studie über konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (KLSM) feststellte (Neves et al., 2005). Weiterhin zeigten Paarungsexperimente von Den Hollander und Erasmus (1985), dass paarungserfahrene Männchen über das Potential verfügen, schneller Reifungsprozesse in immaturren Weibchen zu induzieren als paarungsunerfahrene Männchen. Dies deutet darauf hin, dass Männchen unabhängig von morphologischen Differenzierungen über einen paarungsabhängigen Kompetenzstatus verfügen. Der Einfluss der Paarung auf die Genexpression des Männchens konnte mittlerweile vielfach über Microarray- und SAGE-Analysen auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden (Fitzpatrick & Hoffmann 2006; Waisberg, et al. 2007; Leutner et al., eingereicht).

Die Frage, welcher Stimulus des Männchens letztlich die sexuelle Reifung des Weibchens induziert ist bisher ungeklärt. Durch klassische Studien wurde gezeigt, dass die Reifung unabhängig vom Spermientransfer erfolgt (Armstrong, 1965; Popiel et al., 1984). Zur Diskussion steht neben einem taktilen Reiz auch eine Versorgung mit Nährstoffen sowie die Ausschüttung chemischer Signalstoffe durch den männlichen Wurm als derzeit favorisierte Hypothesen (Kunz, 2001; LoVerde et al., 2004; Huang, S. et al., 2012). Zusätzlich wird eine direkte oder indirekte Beteiligung von Wirtsfaktoren vermutet, da Weibchen in der *in vitro*-Kultur trotz Paarungskontakt über einen längeren Zeitraum de-differenzieren (Irie et al., 1987; Cogswell et al., 2012; Galanti et al., 2012). Dieser als *in vitro*-Regression bezeichnete Kultureffekt ist bisher nicht ausreichend verstanden, könnte aber möglicherweise mit immunzellstimulatorischen Einflüssen zusammenhängen (Davies et al., 2001; Lamb et al., 2010).



## 1.4 Die Beteiligung von Signalmolekülen an paarungsinduzierten Entwicklungsprozessen adulter *S. mansoni*

Die Erforschung der Reproduktionsbiologie adulter Schistosomen auf molekularer Ebene bildete einen bedeutenden Ausgangspunkt für die Entdeckung zellulärer Signalmoleküle und ihrer Signalwege in *S. mansoni* (Knobloch et al., 2007; Lo Verde et al., 2007; Beckmann et al., 2010b). Basierend auf dem Wissen um die fundamentale Bedeutung komplexer Signaltransduktionsprozesse für die Entwicklung und Differenzierung von Modellorganismen, konnten eine Reihe von Signalmolekülen in *S. mansoni* identifiziert werden. Grundlage hierfür bildete die hohe Konservierung von Signalsystemen innerhalb der *Eumetazoa*, welche sich sowohl in ihrer Funktion, als auch auf molekularer Ebene widerspiegelt (Krauss, 2008). So zeigen viele der in *S. mansoni* gefundenen Signalmoleküle sowohl Sequenzähnlichkeit als auch ein hohes Maß an Übereinstimmung mit homologen Molekülen anderer Organismen bezüglich ihrer funktionellen Domänen, katalytischer Aktivität und Substrate (Knobloch et al., 2002b; Osman et al., 2004; Kapp et al., 2004; Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2011; Beckmann et al., 2012b). Zunächst konnten durch RT-PCR-Ansätze mit degenerierten Primern gegen konservierte Sequenzbereiche und später, unterstützt durch die Verfügbarkeit von Genom- und Transkriptomdaten, verschiedene Signalmoleküle in *S. mansoni* gefunden und kloniert werden. Hierzu gehörten u.a. cytoplasmatische Tyrosinkinase (CTKs) (Kapp et al., 2001; Kapp et al., 2004; Knobloch et al., 2002b; Beckmann et al. 2010a; Beckmann et al. 2011), kleine GTPasen der Ras- und Rho-Familie (Kampkötter et al., 1999; Santos et al., 2002) als auch unterschiedliche Klassen von Zelloberflächenrezeptoren wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (Hamdan et al., 2002; El-Shehabi et al., 2009; Taman & Ribeiro, 2009; El-Shehabi & Ribeiro, 2010; Taman & Ribeiro, 2011; El-Shehabi et al., 2012) und Rezeptortyrosinkinase (RTKs) (Shoemaker et al., 1992; Vicogne et al., 2003, Collins et al., 2013) oder Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine (Beckmann et al., 2012b). Zusätzlich lieferten *in silico*-Analysen einen Überblick über ganze Genfamilien in *S. mansoni* (Berriman et al., 2009; Andrade et al., 2011; Avelar et al., 2011; Zamanian, et al., 2011). Weiterführende Charakterisierungen z.B. durch Transkriptionsanalysen, Gewebelokalisations- und Interaktionsstudien sowie RNAi-Experimente eröffneten zudem Einblicke in die biologische Funktion von Signalmolekülen und ermöglichten erste Vernetzungen zu Signalwegen (LoVerde et al., 2007; Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2011).

Viele der identifizierten Signalmoleküle konnten mit paarungsinduzierten Entwicklungsprozessen in den Reproduktionsorganen adulter Schistosomen in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählt beispielsweise der TGF $\beta$ /Smad-Signalweg, als einer der am umfassendsten charakterisierten Signalwege in *S. mansoni*. Zu allen essentiellen Komponenten dieser bei Säugetieren in Zellwachstum und Teilung involvierten Signalkaskade konnten in *S. mansoni* homologe Moleküle gefunden sowie deren Interaktion *in vitro* bestätigt werden (LoVerde et al., 2007). Nach derzeitigem Stand spielt der TGF $\beta$ -Signalweg unterschiedliche Rollen in der Reproduktion adulter Schistosomen. Zum einen wird vermutet, dass TGF $\beta$ -Signalkomponenten direkt an der Männchen-Weibcheninteraktion im *canalis gynaecophorus* beteiligt sind (Osman et al., 2006), zum anderen wird der TGF $\beta$ -Signalweg mit der Vitellinzellentwicklung und der Embryogenese im Ei in Verbindung gebracht (Knobloch et al., 2007; Freitas et al., 2007; LoVerde et al., 2009).

Weitere Signalmoleküle werden hingegen in den Gonaden adulter *S. mansoni* exprimiert. Hierzu zählen eine Reihe von CTKs wie die Syk-Kinase SmTK4 (Knobloch et al., 2002b; Beckmann et al., 2010a), die Src-Kinasen SmTK3 (Kapp et al., 2004) und SmTK5 (Kapp et al., 2001), die Abl-Kinasen SmAbl1 und SmAbl2 (Beckmann & Grevelding, 2010) sowie die Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 (Beckmann et al., 2010a; Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2011). CTKs stellen intrazelluläre Signalmoleküle dar, welche als Mediatoren zwischen aktivierten Rezeptoren und verschiedenen *downstream*-Effektoren wie z.B. Transkriptionsfaktoren vermitteln. Darüber hinaus sind vor allem Src-Kinasen dafür bekannt, in Signalwege zur Regulation von Zellproliferation und -differenzierung involviert zu sein. In dieser Funktion beeinflussen sie sowohl den Zellzyklus und die Transkription mitotischer Gene als auch die Steuerung von Strukturierungsprozessen des Cytoskeletts (Hubbard & Till, 2000; Roskoski, 2004). Unter anderem können Src-Kinasen auf den Ras/MAPK-Signalweg einwirken (Qi & Elion, 2005). Ihre Aktivierung erfolgt häufig über RTKs für Wachstumsfaktoren. Des Weiteren ist aber auch eine Aktivierung von CTKs über Integrine und GPCRs bekannt (Tatosyan & Mizenina, 2000; Delon & Brown, 2007; Lutrell, 2008).

Erste funktionelle Analysen zu CTKs erfolgten durch die Behandlung adulter *S. mansoni* mit kommerziellen Kinase-Inhibitoren in der *in vitro*-Kultur. Die hierdurch erzielten physiologischen und morphologischen Effekte sprechen für eine Beteiligung von Src- und Syk-Kinasen an gonadenspezifischen Entwicklungsprozessen in *S. mansoni*. So führte eine *in vitro*-Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit dem gegen Src-Kinasen gerichteten Inhibitor Herbimycin A in gepaarten Weibchen zu einer Reduktion der paarungsinduzierten,

mitotischen Aktivität sowie der Eiproduktion (Knobloch et al., 2006) und zu einem veränderten Phänotyp in den Gonaden beider Geschlechter (Beckmann et al., 2010b). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem Syk-Kinase-spezifischen Inhibitor Piceatannol erzielt. Die Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen bewirkte eine Reduktion der Eiablage um 50 %. Darüber hinaus besaßen behandelte *S. mansoni* eine reduzierte Anzahl an primären Oocyten und reifen Spermatozyten in Ovar und Testes (Beckmann et al. 2010a; Beckmann et al. 2010b). Da es sich bei der in Ovar und Testes exprimierten SmTK4 um die einzige in *S. mansoni* bekannte Syk-Kinase handelt, wird vermutet, dass sie das primäre Ziel des Inhibitors darstellt. Gestützt wird diese Annahme durch RNA-Interferenz-(RNAi)-Experimente mit SmTK4-spezifischer dsRNA, die zu einem mit der Piceatannol-Behandlung vergleichbaren morphologischen Phänotyp führten (Beckmann et al., 2010a).

Diese Ergebnisse in Kombination mit *Yeast-two-hybrid*(Y2H)-Interaktionsstudien führten zur Postulierung eines trimeren Kinasekomplexes bestehend aus der Src-Kinase SmTK3, der Syk-Kinase SmTK4 und der Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 mit einer zentralen Rolle in der Gonadenentwicklung und -differenzierung adulter *S. mansoni* (Beckmann et al., 2010a; Beckmann et al., 2011). Hiervon ausgehend wurden in den letzten Jahren verschiedene *upstream*- und *downstream*-Interaktionspartner dieser Kinasen identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass alle drei Kinasen über ihre SH2- und SH3-Domänen mit dem intrazellulären Bereich der RTK SmVKR1 und dem  $\beta$ -Integrin Sm $\beta$ -Int1 interagieren können (Beckmann et al., 2011; Beckmann et al., 2012b). Beide transmembranen Proteine sind ebenfalls in den Reproduktionsorganen lokalisiert (Vicogne et al., 2003; Beckmann et al., 2012b). Als ein weiterer *upstream*-Interaktionspartner von SmTK6 wurde außerdem das transmembrane Mucin SmTmMuc1 (siehe 1.5.1) beschrieben (Beckmann, 2008; Hahnel, 2010; Beckmann et al., 2011).

Ebenso vielfältig stellt sich das Repertoire an *downstream*-Interaktionspartnern der drei Kinasen da, das sowohl auf eine Beteiligung an der Zelldifferenzierung als auch an der Regulation mitotischer Aktivität schließen lässt. So konnte z.B. ein Signalkomplex aus SmRho1, dem *S. mansoni* Diaphanous-Homolog SmDia und der Src-Tyrosinkinase SmTK3 in den Gonaden adulter Schistosomen nachgewiesen werden (Quack et al., 2009). Von Diaphanous und kleinen GTPasen der Rho-Familie ist bekannt, dass sie unter anderem an der Strukturierung des Cytoskeletts beteiligt sind (Krebs et al., 2001; Wallar & Alberts, 2003). In *S. mansoni* könnte SmDia innerhalb des besagten Signalkomplexes eine Brücke zwischen RTK-abhängigen Signalwegen über Src-Kinasen und GPCR-vermittelten Signalwegen über

SmRho darstellen (Quack et al., 2009). Hinweise aus RNAi-Experimenten mit SmDia-spezifischer dsRNA deuten auf eine Beteiligung an der Oocyten-Differenzierung im Ovar maturer Weibchen hin. Interessanterweise gleicht dieser Phänotyp Ergebnissen von RNAi-Versuchen gegen Sm $\beta$ -Int1. Dies bekräftigt die Hypothese, dass beide Moleküle Bestandteile des gleichen, bzw. kooperierender Signalwege sind (Beckmann et al., 2012b). Weitere Interaktionspartner deuten wiederum an, dass der trimere Kinase-Komplex über SmTK4 mit einer MAPK-Kaskade in Verbindung steht (Beckmann 2008; Beckmann et al., 2010a).

Trotz der Fortschritte, welche in den letzten Jahre bei der Identifizierung und Charakterisierung von Signalwegen erreicht wurden, ist die molekulare Grundlage der paarungsinduzierten Entwicklung und Differenzierung der Reproduktionsorgane adulter *S. mansoni* bisher nicht vollständig geklärt. Zwar konnten vor allem CTKs, aber auch weitere Signalmoleküle als wichtige Komponenten der Gonadenentwicklung adulter *S. mansoni* ausgemacht werden, allerdings sind die meisten ihrer Signalwege bisher nicht vollständig entschlüsselt. Einerseits fehlen Informationen über *downstream*-gelegene Effektormoleküle wie Transkriptionsfaktoren und ihren Zielgenen, andererseits sind die initialen Zelloberflächenrezeptoren und ihre Liganden in den meisten Fällen noch unbekannt oder unzureichend charakterisiert.

Ein besseres Verständnis dieser Signalprozesse und ihrer involvierten Moleküle ist dabei nicht ausschließlich von entwicklungsbiologischer Relevanz, sondern liefert zudem im Hinblick auf die Eiproduktion Hinweise auf potentielle Ansatzpunkte für neue Therapien (Dissous et al., 2007; Swierczewski & Davies, 2009). Besonders die Verwendung kommerzieller Inhibitoren aus der Krebsforschung, wie sie in diesem Abschnitt für Herbimycin A und Piceatannol beschrieben ist, zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der *in vitro*-Behandlung von Schistosomen (Dissous & Grevelding, 2011). Auch weitere Kinase-Inhibitoren wie z.B. das gegen Abl-Kinasen gerichtete Imatinib verdeutlichen das Potential von Tyrosinkinase als Ziele neuer Therapeutika gegen Schistosomiasis (Beckmann & Grevelding, 2010; Beckmann et al. 2012a).

## 1.5 Transmembranrezeptoren in *S. mansoni*

Lebende Zellen stehen in einen stetigen Kontakt mit ihrer Umwelt, um auf Veränderungen des äußeren Milieus zu reagieren und mit anderen Zellen zu kommunizieren. Eine Vielzahl an extrazellulären Signalen chemischer und physikalischer Natur müssen dazu von der Zelle registriert und verarbeitet werden. Die hierbei involvierten zellulären Prozesse, bestehend aus der Detektion von Signalen, deren Weiterleitung und Integration bis hin zu der physiologischen Antwort der Zelle werden in ihrer Gesamtheit als Signaltransduktion bezeichnet. Zu Beginn einer solchen Ereigniskette steht häufig die Bindung des primären Botenstoffes an einen membrangebundenen Rezeptor, der das Signal über die Plasmamembran in das Zellinnere weiterleitet. Diese Sonderstellung als Vermittler zwischen extra- und intrazellulärer Kommunikation macht Transmembranrezeptoren zu einem zentralen Gegenstand der Erforschung zellulärer Signal- und Kommunikationsprozesse und aus medizinischer Sicht zu einem wichtigen Ziel von Medikamenten. Die Mehrzahl von Hormonen endokriner, parakriner und autokriner Signalwege bindet an membranständige Rezeptormoleküle von Zielzellen und entfaltet so ihre biologische Wirkung, ohne selbst in das Zellinnere zu gelangen. Stattdessen führt die Bindung eines Liganden im extrazellulären Bereich des Rezeptors zu Veränderungen der cytosolischen Domäne, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen werden. Die Bindung von Ligand und Rezeptor ist in der Regel spezifisch, so dass nur Zellen mit entsprechendem Rezeptor auf das extrazelluläre Signal reagieren. Die genauen Mechanismen der transmembranen Signalübertragung sind vielfältig und richten sich nach der Art des beteiligten Rezeptors. Ebenso divers stellen sich die unterhalb des Rezeptors gelegenen Signalwege dar. Man unterscheidet mehrere Hauptgruppen von Zelloberflächenrezeptoren wie beispielsweise GPCRs, Rezeptoren mit einer intrazellulären Enzymaktivität wie Rezeptorkinasen sowie eine Reihe von transmembranen aber katalytisch inaktiven Molekülen wie beispielsweise Integrine, Mucine, Tetraspanine und auch ligandenabhängige Ionenkanäle (Krauss, 2008).

Unterstützt durch die Daten des Genom-Projekts konnte in den letzten Jahren eine große Anzahl an verschiedener Transmembranrezeptoren in *S. mansoni* identifiziert und partiell charakterisiert werden. Die größte Gruppe bildet hierbei, wie auch in anderen Organismen die Klasse der GPCRs. Über *in silico*-Analysen wurden insgesamt ca. 120 Gene gefunden, die Vertreter aller Untergruppen dieser evolutionär stark konservierten Rezeptor-Superfamilie im Genom von *S. mansoni* kodieren (Hahnel, 2010; Zamanian et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass GPCRs in Schistosomen ein ähnlich breites Spektrum biologischer Funktionen

einnehmen, wie bereits für andere Organismen beschrieben (Krauss, 2008). Diese Vermutung wurde verstärkt durch den Umstand, dass GPCRs über den gesamten Entwicklungszyklus des Parasiten exprimiert werden, wie Transkriptionsanalysen mittels Microarrays zeigten (Fitzpatrick et al., 2009). RT-PCR-Experimente ergaben zusätzlich für ausgewählte GPCRs eine geschlechts- und paarungsabhängige Transkription in adulten *S. mansoni* (Hahnel, 2010). Eine detailliertere Charakterisierung erfolgte bisher vor allem für GPCRs von Neurotransmittern. Hierzu zählen Rezeptoren für Glutamat, Dopamin und Histamin (Hamdan et al., 2002; El-Shehabi et al., 2009; Taman & Ribeiro, 2009; El-Shehabi & Ribeiro, 2010; Taman & Ribeiro, 2011; El-Shehabi et al., 2012). Der Inhalt der Studien umfasste vornehmlich pharmakologische Assays in heterologen Systemen zur Identifizierung von Liganden und die Gewebelokalisation in adulten und larvalen *S. mansoni*. Die entsprechenden Rezeptoren zeigten vielfach eine Assoziation mit dem zentralen und peripheren Nervensystem und der Muskulatur und werden primär mit Bewegungsprozessen in Verbindung gebracht. Der Glutamat-Rezeptor SmGluR konnte zusätzlich in Teilen des weiblichen Reproduktionstrakts, Ovidukt, Ootyp und Uterus, lokalisiert werden (Taman & Ribeiro, 2011). Der Dopamin-bindende Rezeptor SmGPR3 hingegen wird auch in Nervenfasern exprimiert, die in die Testes innervieren (El-Shehabi et al., 2012). Ihre Bedeutung für Reproduktionsprozesse ist allerdings ungeklärt. Dennoch wird vermutet, dass GPCRs in *S. mansoni* an Signalwegen zur Entwicklung und Differenzierung von Gonaden involviert sind. So wird postuliert, dass ein GPCR oberhalb des oben beschriebenen Signalkomplexes aus SmRho, SmDia und SmTK3 steht (siehe 1.4) (Quack et al., 2009). Mögliche *downstream*-Partner untersuchter GPCRs oder Interaktionen mit bereits beschriebenen Signalwegen sind bis jetzt jedoch nicht bekannt. Weitere GPCRs und ihre möglichen Funktionen in *S. mansoni* werden in den Abschnitten 1.5.2 und 1.5.3 beschrieben.

Eine weitere Klasse von Rezeptoren aus *S. mansoni* stellen transmembrane Rezeptorkinasen dar (Avelar et al., 2011; Andrade et al., 2011). Diese Rezeptoren vermitteln extrazelluläre Signale über eine intrinsische Kinaseaktivität in das Zellinnere. Ihr molekularer Aufbau besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen Transmembranhelix sowie einem intrazellulären Abschnitt mit einer katalytischen Kinase-Domäne. Abhängig von der Art des phosphorylierten Substrats erfolgt eine Unterscheidung in unterschiedliche Gruppen von Rezeptorkinasen (Krauss, 2008). In *S. mansoni* konnten sowohl Serin/Threonin-Kinaserezeptoren als auch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) identifiziert werden. Zu ersteren zählen die Rezeptoren SmTβR1 (Davies & Pearce, 1995) und SmTβR2

(Forrester et al., 2004) als initiale Komponenten des im Abschnitt 1.4 beschriebenen TGF $\beta$ /Smad-Signalweges adulter Schistosomen (LoVerde et al., 2009) (siehe 1.3). Zu den näher charakterisierten RTKs gehören das EGFR-Homolog SmSER, die Insulin-Rezeptor-Homologe SmIR-1 und SmIR-2 sowie die Venus-Kinaserezeptoren SmVKR1 und SmVKR2. Der EGF-bindende SmSER wird sowohl in Cercarien als auch in der Muskulatur adulter Schistosomen exprimiert und ist möglicherweise an der Entwicklung und Steuerung muskulärer aber auch reproduktiver Prozesse beteiligt (Ramachandran et al., 1996; Vicogne et al., 2004; Buro, 2013). Die beiden Insulin-Rezeptoren werden in allen Entwicklungsstadien des Parasiten exprimiert. SmIR-1 wurde vornehmlich in der Muskulatur und der Basalmembran adulter Schistosomen detektiert, während SmIR-2 hauptsächlich im Parenchym zu finden war. Vermutlich spielen beide Rezeptoren eine Rolle bei der Glucose-Aufnahme des Parasiten (Khayath et al., 2007; Ahier et al., 2008).

SmVKR1 und SmVKR2 besitzen ein extrazelluläre *Venus-Flytrap*-Motiv (VFT), ähnlich der Ligandenbindungsdomäne von GABA-Rezeptoren und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne mit Homologie zu Insulin-Rezeptoren (Vicogne et al., 2003; Ahier et al., 2009; Gouignard et al., 2012). Ihre Expression erfolgt unter anderem im Ovar adulter Schistosomen, wo sie möglicherweise mit dem trimeren Kinasekomplex aus SmTK4, SmTK3 und SmTK6 interagieren (siehe 1.4) (Beckmann et al., 2010b; Beckmann et al., 2011). Eine weitere Gruppe von RTKs, die FGFRs, werden im Abschnitt 1.5.4 behandelt.

Zusätzlich zu GPCRs und Rezeptorkinasen sind weitere Gruppen von Transmembranproteinen aus *S. mansoni* als mögliche Rezeptoren in Erscheinung getreten. Hierzu gehören das transmembrane Mucin SmTmMuc1 (Siehe 1.5.1) sowie eine Familie von  $\alpha/\beta$ -Integrinen. Letztere wurden u.a. im Ovar lokalisiert. Darüber hinaus interagiert Sm $\beta$ -Int1 mit dem SmTK4/TK3/TK6-Komplex und ein *knock down* des Rezeptors über RNAi führte zu morphologischen Veränderungen in reifen Oocyten (Beckmann et al., 2012b).

Neben diesen bereits charakterisierten Rezeptoren sind in den Datenbanken zum *S. mansoni*-Genom-Projekt eine Vielzahl weiterer Sequenzen enthalten, die putative Transmembranrezeptoren kodieren aber noch nicht beschrieben wurden. Hierzu zählen u.a. Homologe transmembraner Progesteron-Rezeptoren aus Vertebraten (siehe 1.5.5)

### **1.5.1 Transmembrane Mucine und ihre Rolle in Signaltransduktionsprozessen**

Mucine sind langkettige und stark glykosylierte Proteine, welche vornehmlich in Epithelgeweben exprimiert werden. Aufgrund ihres molekularen Aufbaus können sezernierte und transmembrane Mucine unterschieden werden. Erstere werden in das extrazelluläre Medium abgegeben und erhöhen so die Viskosität von Körperflüssigkeiten. Membranständige Mucine sind hingegen an der Zelloberfläche lokalisiert und verfügen häufig über einen intrazellulären C-Terminus. Auf diese Weise tragen Mucine entscheidend zum Schutz des Epithels bei (Hollingsworth & Swanson, 2004). Darüber hinaus sind membrangebundene Mucine in den letzten Jahren als wichtige Bestandteile verschiedener Signaltransduktionsprozesse identifiziert worden. Hierbei nehmen sie ein breites Spektrum unterschiedlicher Funktionen ein. Diese reichen von der Detektion biochemischer Parameter wie pH-Wert und Ionen-Konzentrationen im extrazellulären Milieu, der Interaktion mit anderen Rezeptoren sowie der Bindung cytosolischer Signalmoleküle bis hin zu einer Beteiligung an der Regulation transkriptionaler Prozesse im Zellkern (Singh & Hollingsworth, 2006).

Aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung verschiedener Tumore gehören die humanen Mucine MUC1 und MUC4 zu den am intensivsten charakterisierten transmembranen Mucinen (Hollingsworth & Swanson, 2004; Singh & Hollingsworth, 2006). Für beide Proteine konnte eine Interaktion mit RTKs der EGFR- und FGFR-Familien nachgewiesen werden (Senapati et al., 2010; Rachagani et al., 2012). Hierbei zeigte sich, dass MUC1 als Co-Rezeptor die aktivierte RTK stabilisieren und einer Internalisierung des Rezeptors entgegen wirken kann (Pochampalli et al., 2007). Außerdem sind EGFRs und FGFRs in der Lage, spezifische Tyrosine im intrazellulären Bereich von MUC1 zu phosphorylieren wodurch eine Interaktion des Mucins mit  $\beta$ -Catenin oder auch verschiedenen CTKs ermöglicht wird (Li et al., 2001, Raina et al., 2006; Ren et al., 2006). Im Falle einer  $\beta$ -Catenin-Bindung kommt es nach proteolytischer Spaltung zu einer Translokation des MUC1 C-Terminus in den Zellkern. Hier wird eine Beteiligung des MUC1-Catenin-Komplexes an der Regulation von Transkriptionseignissen postuliert (Singh & Hollingsworth, 2006). Weiterhin sind direkte Interaktionen mit weiteren Transkriptionsregulatoren wie p53 (Wei et al., 2005) und der DNA-Bindungsdomäne des Östrogen-Rezeptors  $\alpha$  beschrieben worden (Wei et al., 2006).

Darüber hinaus interagiert der intrazelluläre C-Terminus von MUC1 nach Phosphorylierung direkt mit Mitgliedern der Src- und Abl-Familie über konservierte SH2-Bindungsmotive (Raina et al., 2006; Singh & Hollingsworth, 2006) sowie mit Komponenten des MAPK-Signalwegs wie dem *Scaffold*-Protein GRB2 und dem Guanin-Austauschfaktor



*Son of Sevenless* (SOS) (Pandey et al., 1995; Schroeder et al., 2001). Neuere Studien liefern zudem erste Hinweise auf eine direkte Bindung von Wachstumsfaktoren durch eine N-terminal verkürzte Form von MUC1. Diese wirkt in humanen Stammzellen als Rezeptor für den Wachstumsfaktor NM23 und inhibiert im aktivierten Zustand deren Differenzierung (Hikita et al., 2008; Smaghe et al., 2013).

Demgegenüber ist eine Beteiligung von Mucinen an Signalprozessen in Invertebraten und anderen Organismen kaum untersucht. Lediglich Studien aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* bringen Mucine mit Signalwegen in Verbindung, die an der Osmoregulation beteiligt sind. Transmembrane Mucine scheinen in diesen Fällen eine Funktion als Sensoren für osmotischen Stress einzunehmen (de Nadal et al., 2007; Rohlfing et al., 2011). Über die Funktion von Mucinen in *S. mansoni* ist bisher ebenfalls wenig bekannt. Menrath et al. (1995) identifizierten die Teilsequenz eines Mucins, welches geschlechtsspezifisch exprimiert wird und über Lokalisationsstudien im Epithelgewebe des weiblichen Reproduktionstraktes nachgewiesen wurde. Dort ist es möglicherweise an der Ausbildung der Eischale beteiligt. Weitere Mucine konnten in Miracidien und Sporocysten identifiziert werden (Roger et al., 2008a). Diese, als *S. mansoni polymorphic mucins* (SmPoMuc) bezeichnete Gruppe sekretierter Mucine weist innerhalb und zwischen verschiedenen *S. mansoni*-Stämmen aufgrund von Rekombination, Spleißvariationen und differentiellen Glykosylierungsmustern hohe Variabilität auf. Da ihre Expression auf die mit dem Zwischenwirt assoziierten Larvalstadien beschränkt ist, wird dieser Mucin-Familie eine Schlüsselrolle bei der Adaptation von *S. mansoni* an das Immunsystem von Mollusken zugesprochen (Roger et al. 2008b). Erste Hinweise einer Beteiligung von Mucinen an Signaltransduktionsprozessen in *S. mansoni* lieferten Proteininteraktionsstudien mit der Src/Abl Hybridkinase SmTK6 (Beckmann, 2008; Beckmann et al., 2011). In einem Y2H-Screening wurde das Mucin-Homolog SmTmMUC1 als häufigster Interaktionspartner der CTK gefunden. Direkte Bindungsstudien bestätigten eine Interaktion beider Proteine über ein konserviertes SH2-Bindungsmotiv im C-Terminus des Mucins. Darüber hinaus lieferten erste *in situ*-Hybridisierungen Anhaltspunkte auf eine Co-Lokalisation beider Moleküle im Ovar adulter *S. mansoni* (Hahnel, 2010).

### 1.5.2 Neuropeptidrezeptoren in Plattwürmern

Das zentrale Nervensystem (ZNS) der Plathelminthen besteht aus einem Kopfganglion von dem ausgehend zwei parallele Nervenstränge den Wurmkörper der Länge nach durchziehen. Diese sind über regelmäßige Querverbindungen vernetzt und geben dem ZNS einen leiterähnlichen Aufbau (Lucius & Loos-Frank, 2008). Hieran schließt sich das fein verästelte periphere Nervensystem an, welches Kontakt zu allen wichtigen Körperstrukturen, wie dem Tegument, der Muskulatur und den Reproduktionsorganen herstellt. In Abwesenheit einer Leibeshöhle und eines Kreislaufsystems als Voraussetzung endokriner Kommunikation, kommt dem Nervensystem damit eine primäre Bedeutung bei der Koordination biologischer Prozesse wie z.B. Bewegung, Verhalten und Stoffwechsel zu (Ribeiro et al., 2005). Studien zur Neurobiologie von Plattwürmern führten in den letzten Jahrzehnten zur Identifizierung verschiedener neuroaktiver Stoffe. Hierzu zählt u.a. klassische Neurotransmitter wie Dopamin, Serotonin und Acetylcholin. Viele dieser Substanzen zeigen einen deutlichen Effekt auf Bewegung und Muskelkontraktion verschiedener Plattwurmartarten (Holmes & Fairweather, 1984; Maule et al., 1989; Boyle et al., 2000; Ribeiro et al. 2005; El-Shehabi et al., 2012). Darüber hinaus konnten auch weitere Funktionen nachgewiesen werden. So wird Serotonin z.B. mit Stimulation von Stoffwechselenzymen in *S. mansoni* (Rahman et al., 1985) und der Geweberegeneration von Planarien in Verbindung gebracht (Saitho et al., 1996). Die *in vitro*-Behandlung adulter Schistosomen mit Acetylcholin wiederum stimuliert die Glucoseaufnahme über das Tegument (Camacho & Agnew, 1995). Neben diesen klassischen physiologischen Studien konnten in den letzten Jahren viele Rezeptoren für neuroaktive Stoffe wie GPCRs und Ionenkanäle identifiziert und charakterisiert werden. Die Mehrzahl neuer Erkenntnisse geht dabei auf Untersuchungen aus Schistosomen und Planarien zurück (Saitho et al., 1997; Bentley et al., 2004; Ribeiro et al., 2005; Taman & Ribeiro, 2011; El-Shehabi et al., 2012).

Neben Neurotransmittern stellen Neuropeptide die zweite große Gruppe von neuroaktiven Substanzen in Plattwürmern dar. So sind u. a. die bei Invertebraten weit verbreiteten Familien der *FMRFamide-like* Peptide (FLPs) und *neuropeptides-F* (NPFs) auch bei den Plathelminthen vertreten (McVeigh et al., 2005). Letztere sind eng verwandt mit der Neuropeptid-Y(NPY)-Familie der Vertebraten (McVeigh et al., 2005; McVeigh et al., 2009; Nässel & Wegener, 2011). Verschiedene Neuropeptide konnten über Immunohistologie im zentralen und peripheren Nervensystem verschiedener Plattwürmer lokalisiert werden. Sie zeigen dabei vergleichbare Lokalisationen wie zahlreiche Neurotransmitter, einschließlich der Muskulatur, Tegument, Verdauungstrakt und Reproduktionsorgane (Day & Maule, 1999;

Maule et al. 2002; Halton & Maule, 2004). Aufgrund einer Mehrzahl von Untersuchungen werden Neuropeptide bisher hauptsächlich mit einer Modulation der Muskeltätigkeit in Verbindung gebracht (Graham et al., 1997; Moneypenny et al., 2001; McVeigh et al., 2005; Novozhilova et al., 2010; McVeigh et al., 2011). Aktuelle Ergebnisse offenbaren zudem eine herausragende Bedeutung von Neuropeptiden der NPF/Y-Familie bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Reproduktionsorgane in *Schmidtea mediterranea* (Collins et al., 2010). Das sog. *NPY-like peptide 8* (NPY-8) wird nur in sich sexuell fortpflanzenden Planarien mit ausgereiften Reproduktionsorganen transkribiert. Zu den Transkriptionsorten gehören neben verschiedenen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems auch Zellen, welche eng mit den Testesloben assoziiert sind. RNAi-Experimente zur Reduktion der NPY-8 Expression führten zur Degeneration der Testes und der Abwesenheit reifer Spermien in vollentwickelten Planarien (Collins et al., 2010).

Wie auch für Neurotransmitter, sind GPCRs die primären Rezeptoren für Neuropeptide (Grimmelikhuijzen & Hauser, 2012). Allerdings konnten Neuropeptidrezeptoren bisher in Plattwürmern kaum näher charakterisiert werden, obwohl über *in silico*-Analysen die Existenz entsprechender Gene u.a. in *S. mansoni* und *S. mediterranea* nachgewiesen wurde (Hahnel, 2010; Zamanian et al., 2012). Über die Funktion von Neuropeptiden und ihrer Rezeptoren bei Reproduktionsprozessen von *S. mansoni* ist darüber hinaus noch nichts bekannt. Einzig die Lokalisation eines potentiellen Allatostatin-Rezeptors im Ovar gepaarter *S. mansoni*-Weibchen über *in situ*-Hybridisierung lieferte erste Hinweise auf eine Beteiligung an der Reproduktion (Hahnel, 2010).

### **1.5.3 Frizzled-Signalwege**

Bei den Mitgliedern der *Frizzled*-Proteinfamilie handelt es sich um Rezeptoren für Wnt-Lipoglykoproteine mit einer Siebentransmembranhelix(7-TMH)-Struktur. Wnt/*Frizzled*-Signalwege sind evolutionär stark konserviert und in nahezu allen Gruppen der *Eumetazoa* von den *Cnidaria* bis zu den Säugetieren vertreten (Huang & Klein, 2004). Sie sind an der Kontrolle und Regulation verschiedener Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse sowohl im Embryo als auch im adulten Organismus beteiligt. Die erste Beschreibung von *Frizzled*-Rezeptoren erfolgte zunächst aus Screenings adulter *Drosophila*-Mutanten, bei denen ein Verlust der *Frizzled*-Funktion mit einer Auflösung der Polarität von Epidermiszellen einherging (Gubb & Garcia-Bellido, 1982; Adler, 2002). Weitere Studien aus *Drosophila* führten zur Identifizierung von Wnts, als die natürlichen Liganden von *Frizzled* (Chen &

Struhl, 1999) und offenbarten eine Beteiligung von *Wnt/Frizzled* Signalwegen an der Embryogenese (Müller et al., 1999), der Ausbildung des Nervensystems (Bhat, 1998) und der Organogenese (Bhanot et al., 1999). Mittlerweile sind *Wnt/Frizzled*-Signalwege und ihre biologischen Funktionen bei der Entwicklung, Differenzierung und Regeneration verschiedener (Model-)Organismen wie Planarien-Arten, *C. elegans*, *Xenopus* und auch Säugetieren detailliert beschrieben (Eisenmann, 2005; De, 2011; Wansleeben & Meijlink, 2011; Almuedo-Castillo et al., 2012). So scheint z. B. ihre Bedeutung bei der Determinierung der anterioren-posterioren Körperachse in nahezu allen bilateralen Tieren konserviert zu sein (Petersen & Reddien, 2009). Darüber hinaus geraten *Frizzled*-Rezeptoren immer stärker in den Focus der Stammzellforschung (Dalton, 2013; Holland et al., 2013). So mehren sich Hinweise, dass *Wnt/Frizzled*-Signalwege u.a. für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen von Bedeutung sind (Nusse, 2008; Sokol, 2011; Merrill, 2012). Beim Menschen werden Wnts und *Frizzled*-Rezeptoren außerdem mit der Entstehung verschiedener Tumore in Verbindung gebracht und stellen daher mögliche Ziele in der Krebstherapie dar (Klaus & Birchmeier, 2008; Schulte, 2010).

*Frizzled*-Rezeptoren verfügen über eine 7-TMH-Struktur mit einem extrazellulären N-Terminus sowie einem intrazellulären C-Terminus und werden daher der Superfamilie der GPCRs zugeordnet. Hier bilden sie eine eigene Klasse (Schiöth & Frederiksson, 2005). Anders als andere GPCRs interagieren *Frizzled*-Rezeptoren nicht primär mit heterotrimeren G-Proteinen sondern vornehmlich mit dem Adapter-Molekül *Dishevelled* (Dsh oder Dvl). Die Bindung beider Proteine erfolgt über die PDZ-Domäne von Dsh und einem konservierten PDZ-Bindungsmotiv im C-Terminus von *Frizzled* und dient als Plattform für vielfältige Signaltransduktionsprozesse (Gao & Chen, 2010). Die Bindung von Wnts erfolgt über eine extrazelluläre *cysteine-rich* Domäne (CRD) und wird häufig, aber nicht in allen Signalwegen durch Co-Rezeptoren, wie z. B. *low density lipoprotein receptor-related proteins* (LRPs) unterstützt. Zudem mehren sich die Hinweise auf alternative Liganden für *Frizzled*-Rezeptoren wie z. B. sezernierte *Frizzled-related* Proteine, Norrin oder Mitglieder der Dickkopf Familie aus *Drosophila* (Schulte, 2010).

Die stetig zunehmende Zahl neu identifizierter Interaktionspartner lassen das Bild von *Frizzled*-Rezeptoren und ihrer Signaltransduktionsprozesse immer komplexer werden (Schulte, 2010). Dennoch lässt sich trotz ihrer vielfältiger Funktionen und dem breiten Spektrum unterschiedlicher Zielzellen zwischen drei Hauptsignalwegen unterscheiden, in denen *Frizzled*-Rezeptoren involviert sind. Zu diesen zählt der *Wnt/β-Catenin*-, der *planar*

*cell polarity* (PCP)- und der Wnt/Calcium-Signalweg (Huang & Klein, 2004). Ersterer wirkt über die ligandeninduzierte Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und seiner anschließender Translokation in den Zellkern. In der nicht-stimulierten Zelle bilden Axin, *adenomatous polyposis coli* (APC) und die *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK-3) mit weiteren Komponenten einen  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplex, welcher die cytoplasmatische Konzentration von  $\beta$ -Catenin über Phosphorylierung reguliert. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird ubiquitiniert und so einem Abbau durch das Proteasom zugeführt. In Anwesenheit von Wnt kommt es zur Bindung des Liganden an den *Frizzled*-Rezeptor. Stabilisiert wird die Wnt-Bindung dabei durch LRP, welches als Co-Rezeptor fungiert. Hierauf folgt eine Interaktion des intrazellulären C-Terminus von *Frizzled* mit der PDZ-Domäne von Dsh und der Rekrutierung von Axin und weiteren Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes an die Plasmamembran. Unphosphoryliertes  $\beta$ -Catenin sammelt sich im Cytoplasma an und gelangt letztlich in den Zellkern, wo es durch Bindung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression der Zielzelle beeinflusst (Gordon & Nusse, 2006; Schulte, 2010). Dieser, auch als *canonical pathway* bezeichnete Signalweg ist z.B. an der Aufrechterhaltung der Segmentpolarität von *Drosophila*-Embryonen beteiligt (Wallingford & Habas, 2005).

Der PCP-Signalweg wiederum steuert die Orientierung von Zellen in Epithelien und wurde am intensivsten für die Zellpolarität im Insektenauge und bei der Flügelbildung von *Drosophila* beschrieben (Fanto & McNeill, 2004). Darüber hinaus sind viele Komponenten des *Frizzled*-abhängigen PCP-Signalwegs evolutionär stark konserviert und nahezu im gesamten Tierreich vertreten. So spielt dieser eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen wie z.B. bei Gastrulation während der frühen Embryogenese von Wirbeltieren, wie an Studien von *Danio* und *Xenopus* gezeigt werden konnte (Wansleben & Meijlink, 2011). Grundlage des Signalweges ist eine asymmetrische Formation eines Komplexes verschiedener Signalmoleküle an die Plasmamembran, was letztlich in einer Reorganisation des Cytoskeletts resultiert. Auch hier sind nicht alle Details verstanden bzw. variieren abhängig von Organismus und Zielgewebe. Letztlich jedoch bewirkt die Wnt-abhängige Aktivierung von *Frizzled* die Bindung von Dsh an den intrazellulären Bereich des Rezeptors. Hierauf folgt eine Aktivierung der kleinen GTPase Rho und der Rho-assoziierten Kinase ROCK. In die Interaktion von Dsh und Rho ist weiterhin das Formin-Homolog DAAM1 involviert, welches direkt mit dem Cytoskelett interagieren kann. Alternativ zu Rho kann auch eine Wnt/*Frizzled*-induzierte Aktivierung der kleinen GTPase Rac erfolgen (Wallingford & Habas, 2005).

Der dritte klassische *Wnt/Frizzled*-Signalweg läuft über eine Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration. Viele Hinweise sprechen dafür, dass die Zunahme von Calcium im Cytoplasma über eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen und möglicherweise unabhängig von Dsh erfolgt. Dies kann einerseits durch eine Aktivierung der Phospholipase C oder einer Beteiligung cGMP-abhängiger Phosphodiesterasen erfolgen. Bisher identifizierte *downstream*-Effektoren sind u.a. die Calmodulin-abhängige Kinase und die  $Ca^{2+}$ -abhängige Kinase PKC (Schulte, 2010).

Eine Sonderstellung innerhalb der *Frizzled*-Familie nimmt der *Smoothened* (Smo)-Rezeptor ein, da er nicht als Rezeptor für Wnts in Erscheinung tritt, sondern indirekt durch *Hedgehog* (HH)-Lipoglykoproteine aktiviert wird (Schulte, 2010). Wie *Wnt/Frizzled* sind auch HH/Smo-Signalwegen an unterschiedlichsten Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt (Nusse, 2003).

Obwohl über *in silico*-Analysen wichtige Komponenten von *Wnt/Frizzled*-Signalwegen, wie beispielsweise *Wnt*, *Frizzled*, *Dsh*,  $\beta$ -Catenin, oder Axin in parasitischen Plattwürmern, wie *Ecchinokokken* und *Schistosomen* nachgewiesen werden konnten, ist über ihre Funktionen außerhalb der *Planaria* wenig bekannt (Riddiford & Olson, 2011). So enthält das Genom von *S. mansoni* Gene für insgesamt fünf Wnts sowie vier *Frizzled*- und einen *smoothened-like* Rezeptor (Hahnel, 2010; Riddiford & Olson, 2011; Zamanian et al., 2012). Erste molekularbiologische Studien zu *Wnt* und *Frizzled* stammen hingegen aus *S. japonicum* (Li et al., 2010). Hier konnte u.a. die Expression eines Frz-Homologs über Immunohistologie in den Reproduktionsorganen adulter *S. japonicum* nachgewiesen werden (Wang et al., 2011).

### 1.5.4 FGFR-Signalwege

*Fibroblast growth factors* (FGFs) und ihre Rezeptoren, RTKs der FGFR-Familie, sind evolutionär stark konserviert und in nahezu allen *Eumetazoa* von den *Cnidaria* bis hin zu den Säugetieren vertreten (Rebscher et al., 2009; Itoh & Ornitz, 2011; Rudolf et al., 2013). Sie erfüllen ein breites Spektrum zellulärer Funktionen wie Wachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose (Powers et al., 2000). Eine besondere Bedeutung kommt FGFs/FGFRs bei der Entwicklung verschiedener Organsysteme während der Embryogenese zu (De Moerloose et al., 2000; Turner & Grose, 2010). Im adulten Organismus steuern sie zudem vielfältige physiologische Prozesse, wie Regeneration von Geweben, Homöostase und Angiogenese (Turner & Grose, 2010). Dysregulation FGF-induzierter Signalprozesse beim Menschen gehen oftmals einher mit schweren Erkrankungen oder Tumorgenese. Dies führte

in den vergangenen Jahren dazu, dass FGFRs als mögliches Ziel für Therapeutika stärker in den Focus der klinischen Forschung gerückt sind und mittlerweile eine Reihe verschiedener Inhibitoren entwickelt wurden (Turner & Grose, 2010; Brooks et al., 2012). Darüber hinaus spielen FGFs wie auch Wnts (siehe 1.5.3) eine wichtige Rolle bei der Regulation des Stammzellstatus (Dvorak et al., 2006; Gotoh, 2009; Dalton, 2013).

Innerhalb der Invertebraten sind die Modellorgansimen *D. melanogaster* und *C. elegans* am intensivsten auf biologische Funktionen von FGF/FGFR-Signalwegen untersucht worden. *Breathless*, einer von zwei FGFRs aus *D. melanogaster*, steuert die Entwicklung des Trachealsystems und ist weiterhin an der Ausbildung der Testes beteiligt. Der zweite FGFR, *Heartless*, kontrolliert die Differenzierung des Mesoderms während der Embryogenese. Das *C. elegans* Homolog Egl-15 wird u.a. in den sich entwickelnden Gonaden exprimiert und lenkt über die Migration von sog. *sex*-Myoblasten die Entwicklung der Muskulatur des Geschlechtstraktes. Außerdem ist Egl-15 an der Regulation des Flüssigkeitshaushalts im adulten Wurm beteiligt. Ein vollständiger Verlust der Egl-15-Aktivität ist bereits im Larvalstadium letal (Huang & Stern, 2005). In *Dugesia japonica* werden die beiden FGFR-Homologe neben der Regulation der Homöostase mit Kontrolle der Neoblasten- und Keimzellendifferenzierung in Verbindung gebracht (Ogawa et al., 1998; Ogawa et al., 2002; Adell et al., 2010). Ähnliche Hinweise liefern Forschungsergebnisse aus Schistosomen. In einer aktuellen Studie wurden somatische Stammzellen, sog. *neoblast-like stem cells* in adulten *S. mansoni* identifiziert, welche möglicherweise einer Regulation durch das FGFR-Homolog SmFGFR-A (in dieser Arbeit als SmFGFR2 bezeichnet) unterliegen (Collins et al., 2013).

Während z.B. bei *Drosophila* und *C. elegans* nur jeweils drei bzw. zwei FGF-Homologe vorkommen, sind bei Säugetieren insgesamt 18 FGFs und vier FGFRs beschrieben. Ein fünfter FGFR, auch als FGFR1L bezeichnet, verfügt über keine Kinasedomäne und ist vermutlich an einer Regulation von FGF-Signalen beteiligt (Turner & Grose, 2010). FGFs sind sekretierte Glykoproteine, welche eng mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Durch proteolytische Prozesse oder Transportereignisse gelangen sie an die Zelloberfläche, wo sie von *heparan sulphate proteoglycans* (HPSGs) gebunden werden. Diese wirken gleichzeitig als Co-Rezeptoren für FGFRs und stabilisieren die Ligandenbindung der RTK durch Bildung eines ternären Komplexes (Harmer et al., 2004; Mohammadi et al., 2005). Als Folge der FGF-Bindung kommt es zur FGFR-Dimerisierung und anschließender intermolekularer Transphosphorylierung der intrazellulären C-Termini durch die

Tyrosinkinasedomänen (Powers et al., 2000). Phosphorylierte Tyrosinreste werden anschließend durch Adapter-Proteine wie das *FGFR substrate 2* (FRS2) gebunden. Diese können wiederum selbst phosphoryliert werden und so weiteren Signalmolekülen als Plattform zur Verfügung stehen (Eswarakumar et al., 2005). Auf diese Weise kann z.B. über eine Interaktion des Rezeptors mit FRS2 die Rekrutierung von SOS und eine anschließende Aktivierung der MAPK-Kaskade erfolgen (Eswarakumar et al., 2005). Ähnliche Mechanismen sind auch für Invertebraten beschrieben worden. So sind bei *Drosophila* und *C. elegans* ebenfalls HPSGs in die Ligandenbindung involviert. Auch eine Aktivierung der MAPK-Kaskade durch FGFRs ist bekannt. Bei Planarien und Schistosomen hingegen sind die Signaltransduktionsprozesse, durch die FGFRs wirken noch nicht bekannt.

### 1.5.5 Progesteron und seine Rezeptoren

Progesteron gehört zur Gruppe der Steroide und steuert als Sexualhormon bei Säugetieren u.a. den Menstruationszyklus sowie die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft (Penzlin, 1996; Scarpin et al., 2009). Neben seinen vielfältigen Funktionen in den weiblichen Reproduktionsorganen, vornehmlich Ovar, Uterus und Brustdrüsen sind weiterhin das Gehirn, das Kardiovaskularsystem und die Knochen Zielorgane und -gewebe, die durch dieses Hormon beeinflusst werden (Graham & Clarke, 1997; Scarpin et al., 2009). Eine Dysregulation des Progesteron-Haushalts geht mit vielfältigen Entwicklungsstörungen sowie einem erhöhten Krebsrisiko einher (Scarpin et al., 2009; Kim & Chapman-Davis, 2011; Fauser et al., 2011; Hellberg, 2012). In Vertebraten allgemein spielen Progestine (Progesteron und nah verwandte Verbindungen) eine zentrale Rolle bei Reproduktionsprozessen wie z. B. der Reifung von Oocyten (Thomas, 2012) und der Vitellogenese (Custodia-Lora & Callard, 2002).

Bei Invertebraten hingegen ist wenig über biologische Funktionen von Progestinen und anderen Wirbeltiersteroiden bekannt. Hier nehmen hingegen andere Steroide wie z.B. die Ecdysteroide der Arthropoden zentrale Rollen als Hormone ein (Penzlin, 1996; Spindler et al., 2009). Am intensivsten wird derzeit das Auftreten von Progestinen und anderen Wirbeltiersteroiden bei den Mollusken diskutiert. Mollusken verfügen über die meisten Stoffwechsellenzyme, die für die Synthese von Progesteron, Testosteron und Östradiol aus Cholesterin benötigt werden und entsprechende Steroide wurden bereits in allen großen Gruppen dieses Tierstamms nachgewiesen. Weiterhin wurden in mehreren Studien Effekte dieser Hormone vornehmlich auf Fortpflanzungsprozesse verschiedener Molluskenarten



gezeigt. Allerdings ist bisher unklar, ob dabei Hormone wie Progesteron wirklich endogenen Ursprungs sind und über endokrine Regulationsprozesse im Organismus wirken, oder ob sie möglicherweise aus der Umwelt aufgenommen werden (Lafont & Mathieu, 2007; Scott, 2012; Scott, 2013). Auch in anderen Invertebraten, wie verschiedenen Insekten, Nematoden und Plattwürmer wurden Wirbeltiersteroiden nachgewiesen und vielfältige Effekte auf Entwicklung und Fortpflanzung beschrieben (Kashian & Dodson, 2004; Lafont & Mathieu, 2007; Coccia et al., 2010). So beeinflussten z.B. Progesteron, Östrogen und Testosteron die Vitellogenese bei *C. elegans* (Custodia et al., 2001) und für die Planarienart *Bdellocephala brunnea* wurden schwankende Testosteron-Level während der Spermatogenese detektiert (Fukushima et al., 2008). Außerdem konnten sowohl Homologe von Stoffwechsellzymen der Steroidsynthese als auch von steroidhormonbindenden Rezeptoren aus Wirbeltieren in verschiedenen Invertebraten nachgewiesen werden (Köhler et al., 2007; Mimoto et al., 2007; Keay & Thornton, 2009; He et al., 2010). Dennoch bleibt auch hier unklar, ob Progestine und andere Wirbeltiersteroiden natürlich vorkommende Hormone in diesen Tiergruppen darstellen (Lafont & Mathieu, 2007). Eine Sonderstellung in dieser Frage nehmen parasitierende Helminthen von Wirbeltieren ein, da sie natürlicherweise mit Sexualsteroiden in Kontakt stehen und in ihren Entwicklungsprozessen vielfach von Wirtskomponenten beeinflusst werden (Escobedo et al., 2005; Brehm, 2010; Oliveira et al., 2012). Beispielsweise wurden positive Effekte von Progesteron auf die Larvalentwicklung von *Trichinella spiralis* (Hernandez-Bello et al., 2011) und auf die Reproduktion verschiedener *Taenia*-Arten beobachtet (Escobedo et al., 2004; Escobedo et al., 2010). Darüber hinaus sind auch im Genom vieler parasitierender Helminthen wie *S. mansoni* Steroidhormonrezeptor-Homologe kodiert (de Mendonca et al., 2000; Lafont & Mathieu, 2007).

Anders als andere extrazelluläre Liganden, wie beispielsweise Proteine und Peptide sind Progesteron und andere Steroidhormone aufgrund ihrer Größe und lipophilen Eigenschaften ihrer Struktur in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren (Thomas, 2012). Dort werden sie von intrazellulären Rezeptoren der *nuclear steroid receptor*-Superfamilie gebunden, welche ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren darstellen (Tsai & O'Malley, 1994). Dieser „klassische“ Mechanismus der Steroidhormonwirkung ereignet sich auf Ebene der Genexpression und erfolgt aufgrund notwendiger mRNA- und Proteinsynthese relativ langsam. Im Gegensatz hierzu mehrten sich in den letzten beiden Jahrzehnten die Beweise für eine Interaktion von Progesteron und anderer Steroidhormone mit verschiedenen, an der Zellmembran lokalisierten Rezeptoren. Diese Signalwege laufen häufig über die Ausschüttung von *second messengers* ab und rufen daher eine wesentlich schnellere zelluläre

Antwort auf einen Steroidstimulus hervor als die „klassischen“ nukleären Rezeptoren (Thomas, 2012). Beispiele für solche „schnellen“, auch als *non-genomic* bezeichneten Effekte sind u.a. die Progesteron- bzw. Progestin-induzierte Oocyten-Reifung bei Amphibien (Maller, 2001; Josefberg et al., 2007) und Fischen (Nagahama & Yamashita, 2008) sowie der Einfluss von Progesteron auf die Spermienmotilität (Thomas et al., 2009) oder die Kontraktion glatter Muskelzellen des Darm- und Kardiovaskularsystems (Minshall et al., 2002; Xiao et al., 2006). Untersuchungen auf diesem Feld führten zur Identifizierung zweier bis dahin unbekannter, Progesteron-bindender Transmembranrezeptorgruppen, den *membrane progestin receptors* (mPRs) und den *progesterone membrane receptor component* (PMRC)-Proteinen. Erstere gehören zusammen mit Rezeptoren des an Stoffwechselprozessen beteiligten Peptidhormons Adiponektin zur Familie der *progestine and AdipoQ* Rezeptoren (PAQRs). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Siebentransmembranrezeptoren, welche sich analog zur Superfamilie der GPCRs entwickelt hat (Tang et al., 2005). Wie GPCRs sind auch PAQRs in der Lage heterotrimere G-Proteine zu aktivieren. So konnte z.B. für mPR $\alpha$  gezeigt werden, dass eine rezeptorabhängige Regulation der Adenylatcyclase-Aktivität oder des MAPK-Signalwegs durch G $\alpha$ - bzw. G $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird (Hanna et al. 2006; Karteris et al., 2006). Obwohl ihre biologischen Funktionen vielfach noch unbekannt sind, wurden mPRs u. a. als die entscheidenden Rezeptoren bei dem durch Progestin induzierten *germinal vesicle breakdown* (GVBD) von Oocyten verschiedener Fischarten identifiziert (Thomas, 2012).

Als zweite Gruppe Progesteron-bindender Transmembranrezeptoren weisen die PMRCs nur eine einzelne TMH auf. Sie verfügen über ein breites Spektrum an Liganden, welches von Progesteron und weiteren Steroiden zu Cholesterin und Häm-Gruppen reicht (Cahill, 2007). Hierbei ist allerdings noch nicht abschließend geklärt, ob eine Bindung des Progesterons direkt oder im Komplex mit weiteren Proteinen erfolgt (Thomas, 2012). Ebenfalls weitgehend unklar sind bisher die Signalprozesse, in die PMRCs involviert sind. Allerdings scheinen sie bei der Progestin-induzierten Calcium-Mobilisierung aus intrazellulären Kompartimenten beteiligt zu sein (Thomas, 2008). Eine weitere Studie zeigte, dass humanes PMRC1 mit EGFRs interagieren kann und dabei den Rezeptor an der Membran stabilisiert (Ahmed et al., 2010a).

Beide Rezeptortypen werden in Reproduktionsorganen und anderen Geweben wie der Muskulatur und dem zentralen Nervensystem von Säugetieren vielfach exprimiert, was den Schluss zulässt, dass Progesteron-bindende PAQRs und PMRCs an vielen Progesteron-

induzierten physiologischen Funktionen beteiligt sind (Thomas, 2008; Rohe et al., 2009). Zudem spielen sie bei der Entstehung verschiedener Tumore des Menschen eine Rolle (Rohe et al., 2009; Ahmed et al., 2010b; Thomas, 2012).

Das Auftreten von Homologen der zwei Rezeptorfamilien bei Invertebraten wurde bisher kaum untersucht, doch zumindest für PMRC-Homologe gibt es erste Hinweise auf verschiedene Funktionen bei Wirbellosen. So wurden PMRCs u.a. mit der Oocyten-Reifung von *Penaeus monodon* (Preechaphol et al., 2010) und der sexuellen Reproduktion von *Brachionus manjavacas* in Verbindung gebracht (Stout et al., 2010). Ein *Drosophila*-Homolog wiederum scheint als Ecdysteroid-Rezeptor zu fungieren (Fujii-Taira et al., 2009). In Schistosomen sind potentiell Progesteron-bindende Rezeptoren der PAQR- und PMRC-Familien bisher nicht beschrieben.

## **1.6 Zielsetzung der Doktorarbeit**

Aufgrund der globalen Bedeutung der Schistosomiasis und limitierter Strategien zu ihrer nachhaltigen Bekämpfung sind in den letzten Jahren enorme Anstrengungen unternommen worden, die Biologie des Parasiten besser zu verstehen und so Ansatzpunkte für neue Therapien zu finden. Hierbei ist u.a. die außergewöhnliche Reproduktionsbiologie adulter *S. mansoni* in den Focus wissenschaftlicher Forschung gelangt. Beide Geschlechter leben in einem permanenten Paarungskontakt, der essentiell für die Reifung der weiblichen Reproduktionsorgane, und damit für die Fortpflanzung des Parasiten ist. Ein Umstand, der mit Hinblick auf die Pathogenität der Eier auch von großer medizinischer Relevanz ist. Eine molekularbiologische Betrachtung dieses Phänomens offenbarte eine Beteiligung zum Teil konservierter Signalwege an der Entwicklung und Differenzierung weiblicher und männlicher Reproduktionsorgane. In der Arbeitsgruppe von Prof. Grevelding konnten cytosolische Tyrosinkinasen und weitere Signalmoleküle als Schlüsselemente dieser Signaltransduktionsprozesse ausgemacht werden. Trotz kontinuierlicher Fortschritte sind die betreffenden Signalwege allerdings bisher nicht in ihrer Gänze verstanden, da essentielle Elemente wie *downstream* gelegene Transkriptionsfaktoren und initiale Transmembranrezeptoren vielfach noch unbekannt sind. Erschwert wird ihre Aufklärung u.a. durch den Umstand, dass gonadenspezifische Genanalysen in *S. mansoni* bisher nur mit sehr großem Aufwand und unter erheblichen Einschränkungen möglich gewesen sind.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war, ein Protokoll zur Isolation von Organen wie Testes und Ovarien aus adulten *S. mansoni* zu etablieren und das gewonnene Material cytologisch und molekularbiologisch zu charakterisieren. So sollte die Anwendbarkeit des Protokolls für die Bearbeitung weiterer Fragestellungen evaluiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltete Lokalisationsstudien zu ausgewählten Transmembranrezeptoren in adulten *S. mansoni* über testes- und ovarspezifische RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen. Weiterhin sollten Transkriptionsanalysen mittels qPCRs durchgeführt werden, um erste Hinweise auf paarungsabhängige Transkriptionsmuster dieser Rezeptoren in adulten Männchen und Weibchen sowie auf Ebene der Gonaden zu erhalten.

Schließlich war es das Vorhaben des dritten Teils, auf Basis der gewonnenen Ergebnisse erste weiterführende molekularbiologische Untersuchungen sowie funktionale Charakterisierungen ausgewählter Transmembranrezeptoren mittels RNAi-Experimente und Inhibitorstudien durchzuführen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

Die für die Herstellung der folgenden Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich, Fluka, Merck, Roth und Serva bezogen.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
AFA-Fixativ	2 % Essigsäure, 3 % Formaldehyd, 95 % Ethanol (70 %)	Fixierung adulter <i>S. mansoni</i>
Blockierungslösung	4 % <i>Blocking</i> Reagenz (Roche) in Maleinsäure-Puffer	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Bouin-Fixativ	15 % gesättigte Pikrinsäure, 5 % Formaldehyd, 1 % Essigsäure in DEPC-dH <sub>2</sub> O	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Denhardt's (100 ×)	2 × SSC; 2 % Ficoll, 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % BSA in dH <sub>2</sub> O; filtriert	<i>In situ</i> -Hybridisierung
DEPC-dH <sub>2</sub> O	0,1 % Diethylpyrocarbonat in dH <sub>2</sub> O; autoklaviert	RNA-Isolation, <i>In situ</i> -Hybridisierung
DMSO	100% Dimethyl-Sulfoxid	Lösungsmittel

## 2. Material und Methoden

---

DNA-Extraktionspuffer	20 mM Tris-HCl (pH8), 100 mM EDTA, 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	DNA-Isolation
Elektroporationspuffer	120 mM Trehalose, 20 mM HEPES, 1 mM Myoinositol, 1 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM Gluthation, pH 6,9 ± 0,3; Konduktivität <1,3 mS	Elektroporation adulter <i>S. mansoni</i> ; modifiziert nach Spillotis et al. (2010)
Ethidiumbromid	1 g auf 100 ml dH <sub>2</sub> O	Färbung von Nukleinsäuren
<i>Fast Red</i>	5 mg 4-Chlor-2-methylbenzendiazonium (Sigma Aldrich) in 5 ml Substratpuffer	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Hybridisierungspuffer	2,5 ml deionisiertes Formamid, 1,25 ml 20 × SSC, 5 µl Tween 20 (20%), 4 µl 50 µl 100 × Denhardt's, DEPC-H <sub>2</sub> O ad 5 ml	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Kanada-Balsam	Siehe Herstellerangaben (Sigma Aldrich)	Einbettung mikroskopischer Präparate
Karminrot-Lösung	500 mg Karminrot (Ceristain, Merck), 500 ml konz. HCl, 500 ml dH <sub>2</sub> O, Ethanol (90 %) ad 20 ml	Karminrot-Färbung adulter <i>S. mansoni</i>

---

Maleinsäure-Puffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 in DEPC-dH <sub>2</sub> O	<i>In situ</i> -Hybridisierung
MOPS-Puffer (10 ×)	200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA in DEPC-H <sub>2</sub> O (pH 7,0); autoklaviert	RNA-Elektrophorese
Naphthol-AS-Phosphat	1 mg C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClNO <sub>5</sub> P (Sigma Aldrich) in 20 µl DMSO	<i>In situ</i> -Hybridisierung
PBS (10 ×)	1,37 M NaCl, 27 mM KCl; 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , dH <sub>2</sub> O ad 1 l (pH 7,0 - 7,2); autoklaviert	Waschpuffer
Phenol	Phenol, gesättigt mit gleichem Volumen 0,5 mM Tris/HCl; pH 7,8	Aufreinigung von Nukleinsäuren
Probenpuffer (10 ×)	50% Sucrose; 0,6% Orange G; in 1 × TAE-Puffer	DNA-Elektrophorese
Proteinase K-Lösung	1 µg/ml Enzym in Proteinase K-Puffer	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Proteinase K-Puffer	100 mM Tris (pH 8,0), 50 mM EDTA	<i>In situ</i> -Hybridisierung

## 2. Material und Methoden

---

---

RNA loading dye (2 x)	Siehe Herstellerangabe (Fernemtas)	RNA-Elektrophorese
SSC (20 ×)	3 M NaCl, 0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat·2H <sub>2</sub> O in DEPC-dH <sub>2</sub> O pH 7,0; autoklaviert	<i>In situ</i> -Hybridisierung
Substratpuffer	100 mM Tris-HCl; pH 8,0	<i>In situ</i> -Hybridisierung
TAE-Puffer (50 ×)	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); dH <sub>2</sub> O ad 1 l	DNA-Elektrophorese
TE-Puffer (10 x)	0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5; autoklaviert	DNA-Puffer
TESPA/Aceton-Gemisch	10 ml TESPA (3-Amino-propyltriethoxysilan; Sigma Aldrich) in 500 ml Aceton	Beschichtung von Objektträgern
TFB1-Puffer	12,1 g RbCl, 9,9 g MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 2,9 g Kalium-Acetat, 1,1 g CaCl <sub>2</sub> , 50 ml Glycerol, dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 5,8, steril filtriert	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen
TFB2-Puffer	2,1 g MOPS, 1,2 g RbCl, 8,3 g CaCl <sub>2</sub> , 150 ml Glycerol, dH <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 6,8 (mit KOH einzustellen), steril filtriert	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen

---



TriFast	Trizol-Reagenz; Siehe Hersteller-Angaben (PeqLab)	RNA-Isolation
Trypanblau (0,4 %)	Siehe Hersteller-Angaben (Sigma Aldrich)	Vitalfärbung isolierter Gonaden
TS-Lösung	0,1 g Brij35 (Roth), 0,1 g Nonidet P40-Substrat (Fluka), 0,1 g Tween80 (Sigma Aldrich) 0,1 g TritonX-405 (Sigma Aldrich) in 100 ml PBS	Gonadenisolation
Waschlösung I	2 × SSC, 0,1% Tween 20	<i>In situ</i> -Hybridisierung

### 2.1.2 Medien und Zusätze

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Medien und Zusätze verwendet.

Medium/ Zusatz	Zusammensetzung	Verwendung
ABAM	Antibiotikum/Antimycotikum-Lösung: 10.000 Units/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B, 0,9% NaCl (Sigma Aldrich)	Zusatz zum M199-Medium
Ampicillin	Ampicillin-Trihydrat [D(-)-α-Aminobenzylpenicillin]; Stockkonz.: 100 mg/ml dH <sub>2</sub> O (steril filtriert); Endkonz.: 100 µg/ml	LB-Medium-Zusatz zur Wachstumsselektion von <i>E.coli</i>

## 2. Material und Methoden

Basch-Medium	5 ml Hypoxanthin (1 mM), 1 ml Sertonin (1 mM) 1 ml Hydrocortison (1 mM), 1 ml Triiodothyronin (0,2 mM), 8 mg/ml Insulin, 1 g Lactalbumin Hydrolysat, 1 g Glukose, 1 g HEPES, 2,2 g Natriumbicarbonat, 9,2 g BME, 50 ml Schneider's <i>Drosophila</i> Medium, 5 ml MEM-Vitamins (100 x), ad 1 l dH <sub>2</sub> O, (pH 7,3 - 7,4)	<i>In vitro</i> -Kultur von Schistosomen
HEPES	1 M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethan-Sulfonsäure, pH 7,4, sterilfiltriert	Zusatz zum M199-Medium
IPTG	Isopropylthiogalactosid, 0,1 M in dH <sub>2</sub> O	Blau-Weiß-Selektion
LB-Agar	Angesetzt wie LB-Medium, zusätzlich 18 g/l Bactoagar; autoklaviert	<i>E. coli</i> -Medium
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O (pH 7,5); autoklaviert	<i>E. coli</i> -Medium
M199-Medium	10,43 g M199, 1 g Glucose, 2,2 g NaHCO <sub>3</sub> , 20 ml Tris (1 M; pH 7,4), dH <sub>2</sub> O ad 1 l (pH 7,0); steril filtriert (Gibco)	Kultur-Medium für Schistosomen
M199-Vollmedium	M199, 1% HEPES, 1% ABAM, 10% NCS	<i>In vitro</i> -Kultur von Schistosomen
NCS	Serum von neugeborenen Kälbern	Zusatz zum M199-Medium
Perfusionsmedium	1% M199 Pulvermedium, 2% (v/v) 0,5 M Tris/HCl (pH 7,4), 0,1% Glukose, Heparin (Endkonz.: 10 mg/l)	Hamster-Perfusion

Schneckenwasser	auf 1 l: 3 ml Lösung I (11 g CaCl <sub>2</sub> , 7 g MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, dH <sub>2</sub> O ad 200 ml), 2 ml Lösung II (0,6 g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), 4,6 g NaHCO <sub>3</sub> , dH <sub>2</sub> O ad 200 ml), 0,4 ml Lösung III (0,6 M NaOH)	Kulturmedium für <i>Biomphalaria glabrata</i>
X-Gal	Stock: 2% in Dimethylformamid	Blau-Weiß-Selektion von <i>E. coli</i>

### 2.1.3 Inhibitoren

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Inhibitoren verwendet.

Inhibitor	Firma	CAS-Nr.	Lösungsmittel
BIBF1120 (auch Vargatef, Nintedanib)	SelleckChem	656247-17-5	DMSO
3289-8625 (auch Dvl-PDZ Domain Inhibitor II)	Merck Millipore	294891-81-9	DMSO

### 2.1.4 Enzyme

Folgende Enzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Name	Firma	Anmerkung
AccuPrime	Invitrogen	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
Bio-x-act long	Bioline	<i>Taq</i> DNA-Polymerase
DNase I (RNase-frei)	Fermentas	Desoxyribonuklease
Elastase, Type IV	Sigma Aldrich	Protease; Gonadenisolation

FirePol <i>Taq</i> -Polymerase	Solis Biotec	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
PerfeCTa SYBR Green Super Mix	Quanta	qPCR-Master-Mix
PfuUltra II Fusion HS	Agilent	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase mit <i>proof reading</i> -Aktivität
Proteinase K	Merck	Protease; in situ-Hybridisierung
QuantiScript	Qiagen	Reverse Transkriptase
Restriktionsendonukleasen Typ II	New England Biolabs	Restriktion von DNA
RNase A	Sigma Aldrich	Ribonuklease
RNasin	Promega	RNase-Inhibitor
T4-DNA-Ligase	Fermentas	Ligation von DNA-Fragmenten
T7 - RNA-Polymerase	Roche	DNA-abhängige RNA-Polymerase

---

### 2.1.5 Kommerzielle Kits für molekularbiologische Arbeiten

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>	<b>Anwendung</b>
PCR-Cloning-Kit	Qiagen	Standardklonierung von PCR-Produkten über A-Überhangsklonierung
peqGOLD Gel Extraction Kit	PeqLab	Extraktion von DNA aus Agarosegelen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit	PeqLab	Plasmid-Präparation

QuantiTect reverse Transcription Kit	Qiagen	Reverse Transkription
T7 MEGAscript RNAi Kit	Ambion	Herstellung von dsRNA
T7 mMessage mMachine Kit	Ambion	Herstellung von 5'-Cap-RNA

---

### 2.1.6 Molekulargewichtstandards

Zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese werden Molekulargewichtstandards mit definierten Größen auf den Agarosegelen mitgeführt. Für DNA-Gele werden Hyperladder I und Hyperladder II (Bioline) sowie für RNA-Gele RiboRuler RNA Ladder *high range* und RiboRuler RNA Ladder *low range* (Fermentas) verwendet.

### 2.1.7 Bakterienstämme

In der Doktorarbeit verwendete Bakterienstämme:

NEB 10 $\beta$  Hitzeschock-kompetente *E. coli* – Zellen (New England Biolabs, 2008)  
[*araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *fhuA*, *lacX74*, *galK* ( $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*) M15), *mrcA*,  
*galU*, *recA1*, *endA1*, *nupG*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>),  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)

### 2.1.8 Verwendete Antikörper

Für die *in situ*-Hybridisierung wurde der Antikörper Anti-Digoxygenin (Fab fragment) (Roche; Alkalische Phosphatase-gekoppelt) verwendet.

### 2.1.9 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Biolegio hergestellt. Die Berechnung der T<sub>m</sub>-Werte erfolgte mit dem Software-Tool OligoCalc (Kibbe, 2007) nach der Formel von Howley et al. (1979).

**2.1.9.1 Primer zur Sequenzaufklärung ausgewählter Transmembranrezeptoren**

Zielgen	Primername	Sequenz (5'-3' Orientierung)	T <sub>m</sub> -Wert [°C]
SmFGFR1	5'FGFR1-2	GAATCTTGAAGTACTACTTCTC	59,2
	3'RTK_C-Term	CACTAGTTTCAGTACGACCATC	60,0
SmFGFR2	5'FGFR2	ATGTTTATGCGAATGTCATTTATCG	59,2
	3'FGFR2-1	TGTAAATACTGTGCGGGTTCC	59,5
SmFrz1	5'FrzR2	ATGTGTTTGAGGGCTCTCTTCA	60,1
	3'FrzR2	GTAAGCCTAGACCAGAATTAGC	60,1
SmNPYR1	5'NPYR.fl2	AGAATGTTATTAATACGTGTATTATGTG	59,9
	3'NPYR.fl	CAATTATTAATTAGAATCACATTCATTTCC	61,0
SmPMRC1	5'SmProR1	ATGGGAAAGGATGGCCAAAAC	62,1
	3'SmProR1	TCAAGTTACTTTTTTTCTAAGTGCAC	61,0
SmProgesterinR1	5'Progesterin	ATGCGTCATCATTTCATTTACAAGTG	60,9
	3'Progesterin	ACAATCTTTTGCGTCCTGTGATG	60,9
SmTmMuc1	5'073450-neu	AAGCACGTGGTGTATGTATAGG	60,1
	3'073450-neu_N-Term2	ATTGATTCTGATCTTGTCTTAGACG	60,9
	5'Muc_upstream.4	CATGAAGAATTACTTACAGAGGAC	60,3
	3'Muc.2	ATCACTAGCTAACCGAACTGC	59,5
	5'Muc_upstream.5	CACCAGACACATCCGATGTG	60,5
	3'Muc_upstream.4	GTGTGTTTCTCTTGAAACTGTC	60,9
	5'Muc_gap-3	GTCTAACGTGACAAGCACTTC	59,5
	3'Muc_gap-3	CTCTGTAACCGACTCTCTG	60,5
	Muc-GSP1	TTTGTTGGAGTCTTCGGTGATGAAGGAG	68,5
	Muc-GSP2	ACTAGTTGATGAAGGCTTCGTGAGTTCAG	69,1

**2.1.9.2 Primer für gonadenspezifische RT-PCRs**

<b>Zielgen</b>	<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz (5'-3' Orientierung)</b>	<b>T<sub>m</sub>-Wert [°C]</b>
<i>egg shell precursor</i>	5'esp	GTTCCAATTACCAACCAACGTC	60,1
	3'esp	GTTTCCGTTACCACCATAATTACC	62
SmAdipoR1	5'AdipoR1	GGACTCTACTACAATGGCAAG	59,5
	3'AdipoR1	AGATAGACGGTAATCGGCAAG	59,5
SmAdipoR2	5'AdipoR2	CTGTCTAGGGTTCTCCTGTC	60,5
	3'AdipoR2	AAACATCGTTCAGGTACACGTG	60,1
SmAQP	5'SmAQP_C-Term	GACCAATCCGTCAGCATCTC	60,5
	3'SmAQP	GATGAATAGGCCACCAACTTC	59,5
SmAxDyn	5'AxDyn	TGGAGAAACGCAGGGAGATG	60,5
	3'AxDyn	CAGCGAACTTCCCATACAGG	60,5
SmCNA	5'SmCNA	GTTTCTGGAACATGGACACCG	61,2
	3'SmCNA	AGGGATCACTCGATGTGTTGG	61,2
SmDsh1	5'Dsh1 C-Term	CCAGTTCAACATCTAGCACAAG	60,1
	3'Dsh1.neu	CTAAGGATGACTTGTTCAGTGTG	60,1
SmDsh2	5'Dsh2 C-Term	ATGGATGATACCAAGATTATATACC	59,2
	3'Dsh2	CATCTCTGATTATTGGGAATTCC	59,2
SmFGFR1	5'RTK	GATTTTCGAAGAACACGGAGTTC	60,9
	3'RTK	GGACGACGAGTGACAATAGTG	61,2
SmFGFR2	5'FGFR2_C-Term	ATGCATGTACCCAAGAGGAATC	60,1
	3'FGFR2-1	TGTAAATACTGTGCGGGTTCC	59,2
SmFKBP12	5'FKBP12	ATGGGCGTTACCGTTGATACC	61,2
	3'FKBP12neu	CCCAACCTCGAATTACTTTCCC	61,2
SmFrz1	5'FrzR-C-Term	GTGGTAAAACGCTTGTATCATGG	60,9
	3'FrzR2	GTAAGCCTAGACCAGAATTAGC	60,1
SmFrz2	5'Smp_155340-q2	TGGGTTATATTAGCATTGACATGG	60,3
	3'Smp_155340-q2	ATAATAAGGCTAAGGCTGTTTGAC	60,3
SmFrz3	5'Smp_139180-q	GACATGGTTTTTTAGCAGCAGGA	60,1

## 2. Material und Methoden

	3'Smp_139180-q	ATCCACCAATTGGATCACCATC	60,1
SmFrz4	5'smp_174340-q	AATCGCACGAAACAACGTGAGA	60,1
	3'smp_174340-q	GTCTTTGTGACGATCGAATGCA	60,1
SmHSP 70	5'SmHSP70	TGGTACTCCTCAGATTGAGGT	59,5
	3'SmHSP70-2	ACCTTCTCCAACCTCCTCCC	59,5
SmNPP-5	5'SmNPP-5_C-Term	TGCTCCTAAGAAGTCAGCAGA	59,5
	3'SmNPP-5	ATCTGTTGATATTGGCAAAGCTTC	60,3
SmNPYR1	5'LPA	GCATTAGCATGGTTTGGTGTAC	60,1
	3'LPA	CTAACAATTCCACCAGGAAATGC	60,9
SmOGT1	5'OGT	GTTCCGGCGTGGTCAGGTTG	61,6
	3'OGT	CTCTCCTTATTGGGCTTTGAG	59,5
SmPAR1	5'PAR_C-Term	GTAGTGCTGGTTACAAACATACC	60,9
	3'PAR_C-Term	CTTCCCGCTGTAGGATTTGAC	61,2
SmPDI	5'PDIvs	AAATGATGCCCCGACTTACC	58,4
	3'PDIvs.	TCATCCCAAACCTGGAGCAAG	58,4
SmPMRC1	5'SmProR1	ATGGGAAAGGATGGCCCAAAC	62,1
	3'SmProR1	TCAAGTTACTTTTTTTCTAAGTGCAC	60,1
SmProgesterinR1	5'Progesterin C-Term	CATCATTAGGATGGGAGCATTC	60,1
	3'Progesterin	ACAATCTTTTGCCTGTGATG	60,9
SmRho1	5'Rho1	ATGGCGAGTGCGGTACGTAAG	63,2
	3'Rho1	TCAAATTAAATCACACCTCCTCCTC	62,5
SmRingo A	5'SmRingo-A	CCATTTGTTGGAGGATACCAC	59,5
	3'SmRingo-A	GAAGTCTGTTTCGGCTCCAC	60,5
SmRTP1	5'RTP1-q	CTCAAATTCTTCCGCTCCTATTG	60,9
	3'RTP1-q	CCCCTAAATAAATGAGGTGCGTTG	60,9
SmSGTP4	5'SmSGTP4_C-Term	AACGTGCCGACGTAGAAC	59,5
	3'SmSGTP4	GGACGTTGACAAGCGACAAC	60,5
SmSPRM1hc	5'SPRM1hc_C-Term	CGAGTTTTACCCGTTTGATGAG	60,1



	3'SPRM1hc	TTGACTACCAACTGGCTGATC	59,5
SmTGFβR-1	5'TGFβR1	AAACTCAGATCGTGTGGAACC	60,1
	3'TGFβR1	AGCCGATTGACTAGCATAACC	58,4
SmTK6	5'TK6-SH2	GTCTGAATGATGGACTTCCAAC TAGTTTG	67,4
	3'TK6-SH2	AAATGCACTGGTGGACGGTATGC	64,4
SmTmMuc1	5'MUC1	GATAGTCCTGGGAAATTGCTG	59,5
	3'MUC1	AGTTTGGTCAGAGCTACTATCAC	60,9
SmVgl1	5'Vlg-1	CCAGTGCTCGTTGCAACAG	59,5
	3'Vlg-1	CCACCAGTCTGGAGA ACTC	59,5
SmVKR1	5'VKR1-q1	AGACATTGATATCCACCTGCC	60,1
	3'VKR1-q	AACGCCATTACGCTTCG	56,3

### 2.1.9.3 Primer zur Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Die Berechnung des T<sub>m</sub>-Wertes erfolgte ohne T7-Anhänge (rot).

Zielgen	Primername	Sequenz (5'-3' Orientierung)	T <sub>m</sub> -Wert [°C]
SmFGFR1	5'RTK_C-Term	GAGTATCTGCGTCGTCATCG	60,5
	5'RTK_C-Term+T7	TAATACGACTCACTATAGGGGAGTATCTGCGTCGTCATCG	
	3'RTK_C-Term	CACTAGTTTCAGTACGACCATC	
SmFGFR2	3'RTK_C-Term+T7	TAATACGACTCACTATAGGGCACTAGTTTCAGTACGACCATC	60,1
	5'FGFR2-insitu	GATGATGCAATTAGACAACAAAGAG	
	5'FGFR2-insitu+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGATGCAATTAGACAACAAAGAG	
SmFrz1	3'FGFR2-2	CGATTATCGGGATCTTGTGAC	59,5
	3'FGFR2-2+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATTATCGGGATCTTGTGAC	
	5'Frz-C-Term	GTGGTAAAACGCTTGTATCATGG	
	5'FrzR-C-term+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGGTAAAACGCTTGTATCATGG	60,9

## 2. Material und Methoden

	3'FrzR	GTAAGCCTAGACCAGAATTAGC	
	3'FrzR+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAGCCTAGACCA GAATTAGC	60,1
SmNPYR1	5'LPA	GCATTAGCATGGTTTGGTGTAC	
	5'LPA+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATTAGCATGGTT TGGTGTAC	60,1
	3'LPA_fus1	TGCACTGTGACAACATGTTGAC	
	3'LPA_fus1+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCACTGTGACAAC ATGTTGAC	60,1
SmPAR1	5'PAR_insitu	CTTCAGCAACTAATTCAATAGCATC	
	5'PAR_insitu+T7	TAATACGACTCACTATAGGGCTTCAGCAACTAATTCA ATAGCATC	60,9
	3'PAR_insitu	GCCCTGTCGATTATCTCTTGC	
	3'PAR_insitu+T7	TAATACGACTCACTATAGGGGCCCTGTCGATTATCTC TTGC	61,2
SmTmMuc1	5'Muc.2	CTGATAATAACTGCACATATCTACC	
	5'Muc.2+T7neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGATAATAACTGC ACATATCTACC	60,9
	3'Muc.2	ATCACTAGCTAACCGAACTGC	
	3'Muc.2+T7neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACTCACTAGCTAACC GAACTGC	59,5

### 2.1.9.4 qPCR-Primer

Zielgen	Primername	Sequenz (5'-3' Orientierung)	T <sub>m</sub> -Wert [°C]
Actin	5'Actin-q2	GGAAGTTCAAGCCCTTGTTG	58,4
	3'Actin-q2	TCATCACCGACGTAGCTGTC	60,5
SmFGFR1	5'FGFR1-q3	CACAGAAGGAGATGTGTCTGAA	60,5
	3'FGFR1-q3	TTCCCGTAAGGAGCATATTCCA	60,1
SmFGFR2	5'FGFR2-q	TGCATGTACCCAAGAGGAATCA	60,1
	3'FGFR2-q	GATATGGTGAATTGCCCAAAGT	60,9

SmFrz1	5'Smp_118970-q2	TGCACCGTCTGGAGTAACTG	60,5
	3'Smp_118970-q2	GACCAGAATTAGCGGGTACG	60,5
SmNPYR1	5'NPYR-q2	TGATATGCATGGATTCTGGTC	60,1
	3'NPYR-q2	TAGTCTTTGTGACTGTTTCAAGTG	60,3
SmPMRC1	5'ProR-q2	CCTAAGGGAATGGGAACACTACA	59,5
	3'ProR-q2	ATGGTTGGTTCCAACGTCATCT	60,1
SmProgesterinR1	5'Progesterin-q2	ATTTACATTTTTCGGTGCATTGG	59,2
	3'Progesterin-q2	CACAACCAAACCGAGACAAAAC	60,1
SmTmMuc1	5'MUC_q1	AGGAACAAATCAGCCACC	53,8
	3'MUC_q1	GGCCAAATTAATGGATGG	53,0

### 2.1.9.5 Primer zur Herstellung von dsRNA

Die Berechnung des  $T_m$ -Wertes erfolgte ohne T7-Anhänge (rot).

Zielgen	Primernamen	Sequenz (5'-3' Orientierung)	$T_m$ -Wert [°C]
SmFGFR1	5'RTK_C-Term+T7(neu)	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGTA TCTGCGTCGTCATCG	60,5
	3'RTK_C-Term+T7(neu)	TAATACGACTCACTATAGGGAGACACTA GTTTCAGTACGACCATC	60,1
SmFGFR2	5'FGFR2-insitu+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGA TGCAATTAGACAACAAAGAG	60,9
	3'FGFR2-2+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGATT ATCGGGATCTTGTGAC	59,5
SmFrz1	5'FrzR-C-term+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGGT AAAACGCTTGTATCATGG	60,9
	3'FrzR+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAAG CCTAGACCAGAATTAGC	60,1
SmNPYR1	5'LPA+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATT AGCATGGTTTGGTGTAC	60,1
	3'LPA_fus1+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCAC TGTGACAACATGTTGAC	60,1
SmPMRC1	5'SmProR+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGG AAAGGATGGCCAAAAC	62,1
	3'SmProR+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAG TTACTTTTTTTCTAAGTGCAC	60,1
SmProgesterinR1	5'ProgesterinR_C-Term+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACATCA TTAGGATGGGAGCATTC	60,1
	3'ProgesterinR+T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAT CTTTGCGTCCTGTGATG	60,9

## 2. Material und Methoden

SmTmMuc1	5'Muc+T7neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATAG TCCTGGGAAATTGCTG	59,5
	3'Muc+T7neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTT GGTCAGAGCTACTATCAC	60,9
	5'Muc.2+T7neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTGAT AATAACTGCACATATCTACC	60,9
	3'Muc.2+T7neu	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAC TAGCTAACCGAACTGC	59,5

### 2.1.9.6 Primer mit angehängten Restriktionsschnittstellen

Die an das 5'Ende der Primer angehängten Restriktionsschnittstellen sind blau unterlegt. Grüne Buchstaben kennzeichnen eingefügte Start-Codons. Die Berechnung des  $T_m$ -Wertes erfolgte ohne Anhänge.

Primer	Sequenz (5'-3' Orientierung)	$T_m$ -Wert [°C]
5'FGFR1-TK+BamHI	GGATCCATGAAATGGTATCTTCAGAGAGTCAACAGC	60,1
3'FGFR1-TK+XbaI	TCTAGATTCACTAGTTTCAGTACGACCATC	62,0

### 2.1.9.7 Primer für *in vitro*-Mutagenese

Der  $T_m$ -Wert der *in vitro*-Mutagenese-Primer wurde im Gegensatz zu anderen Primern nach der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarung$$

%GC = GC-Gehalt der Primersequenz in Prozent; N = Primerlänge in Basen; %Fehlpaarung = Menge an Fehlpaarungen in Prozent (QuikChange Site-Directed Mutagenesis-Kit)

Basen zum Einfügen von Punktmutationen sind rot unterlegt.

Primer	Sequenz (5'-3' Orientierung)	T <sub>m</sub> -Wert [°C]
5'FGFR1-TK_active	AGATTTGCTGAAAATTATTATCGT <b>G</b> AAATGAAAAATGGTCGTGTTCC G	75,3
5'FGFR1-TK_active	CGGAACACGACCATTTTTTCATTT <b>C</b> ACGATAATAATTTTCAGCAAATC T	75,3
5'FGFR1-TK_ko	GGTAAACACTATAAAATTTAAAAATTGCTGAT <b>AA</b> TGCACCTTACAAGATT TGCTGAA	75,2
3'FGFR1-TK_ko	TTCAGCAAATCTTGTAAGT <b>GCAT</b> TATCAGCAATTTTTAATTTATAGT GTTTACC	75,2

### 2.1.10 Kommerzielle und rekombinante Plasmide

#### 2.1.10.1 Kommerzielle Plasmide

Kommerziell verwendete Plasmide und ihre Hersteller

Plasmid	Anwendung	Hersteller
pDrive	Klonierungsvektor	Qiagen
pcDNA 3.1/V5-His	Expressionsvektor	Invitrogen

#### 2.1.10.2 Rekombinante Plasmide

Im Rahmen der Arbeit wurden folgende rekombinante Plasmide verwendet bzw. selbst hergestellt. (\*: Glycerin-Stock angelegt und sequenziert)

Plasmid	Beschreibung	Hergestellt von
Muc - GW 4.1	Insert: Fragment von SmTmMuc1 aus GW Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
Muc - Gap3	Insert: Fragment (659 bp) von SmTmMuc1 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*

## 2. Material und Methoden

Muc - TMH	Insert: Fragment (956 bp) von SmTmMuc1 mit TMH Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
Muc - „lang“	Insert: Fragment (1,12 kb) im C-Terminus von SmTmMuc1 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
Muc N-Term.2	Insert: N-Terminus (1,57 kb) von SmTmMuc1 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
SmProR	Insert: Volllänge von SmPMRC Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
ProgesterinR	Insert: Volllänge von SmProgesterinR1 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
Frz Volllänge	Insert: Volllänge von SmFrz1 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
FGFR1 - fl	Insert: Volllänge von SmFGFR1 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
FGFR2 -fl	Insert: Volllänge von SmFGFR2 Vektor: pDrive	selbst hergestellt*
FGFR1-TK_wt	Insert: TK-Domäne von SmFGFR1 (Wildtyp) Vektor: pcDNA 3.1/V5-His B	selbst hergestellt*
FGFR-TK1_active	Insert: konstitutiv aktive TK-Domäne von SmFGFR1 Vektor: pcDNA 3.1/V5-His B	selbst hergestellt*
FGFR1-TK_ko	Insert: inaktive TK-Domäne von SmFGFR1 Vektor: pcDNA 3.1/V5-His B	selbst hergestellt*

### 2.1.10.3 Datenbanken und Software-Tools

Datenbank/Software-Tool	Internetadresse
ClustalW2	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a>
ExpASy – <i>Proteomics Server</i>	<a href="http://www.expasy.ch">www.expasy.ch</a>
GeneDB – <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Genome Project</i>	<a href="http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni">www.genedb.org/Homepage/Smansoni</a>
ImageJ – <i>Image Processing and</i> <i>Analysis in Java</i>	<a href="http://www.rsb.info.nih.gov/ij/">www.rsb.info.nih.gov/ij/</a>

---

Molecluar Toolkit – <i>analysis and manipulation of nucleic acid and proteinsequence data</i>	<a href="http://www.vivo.colostate.edu/molkit/">www.vivo.colostate.edu/molkit/</a>
MultiAlign – <i>Multiple sequence alignment</i>	<a href="http://www.prodes.toulouse.intra.fr/multalin/multalin.html">www.prodes.toulouse.intra.fr/multalin/multalin.html</a>
NCBI – <i>National Center of Biotechnology Information</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NCBI - BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
OligoCalc – <i>Oligonucleotide Properties Calculator</i>	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>
Pfam – <i>protein families database</i>	<a href="http://www.pfam.sanger.ac.uk">www.pfam.sanger.ac.uk</a>
Primer3Plus	<a href="http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/">www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/</a>
PubMed – <i>U.S. National Library of Medicine</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi</a>
RepFind	<a href="http://www.zlab.bu.edu/repfind/form.html">www.zlab.bu.edu/repfind/form.html</a>
S. mansoni-BLAST (SangerDB)	<a href="http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni/omni">www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s_mansoni/omni</a>
SchistoDB – <i>Schistosoma mansoni Database</i>	<a href="http://www.schistodb.net">www.schistodb.net</a>
SMART – <i>simple modular architecture research tool</i>	<a href="http://www.smart.embl-heidelberg.de">www.smart.embl-heidelberg.de</a>
<i>The UniProt Knowledgebase</i>	<a href="http://www.uniprot.org/">www.uniprot.org/</a>
WTSI – <i>Wellcome Trust Sanger Institut</i>	<a href="http://www.sanger.ac.uk/">www.sanger.ac.uk/</a>

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Laborzyklus von *Schistosoma mansoni*

Die im Institut für Parasitologie (JLU Gießen) etablierte Laborzucht geht auf einen liberianischen Stamm von *S. mansoni* zurück (Bayer AG, Mohnheim; Grevelding, 1995). Der vollständige Lebenszyklus beinhaltet Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata* als Zwischenwirte und Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) als Endwirte.

#### 2.2.1.1 Infektion des Endwirtes

Die Infektion der Endwirte erfolgt durch Baden der Hamster in Cercarien-haltigem Wasser (Dettmann, et al., 1989). Um die Penetration der Cercarien durch die Haut der Hamster zu erleichtern, werden die Tiere für 20 min. in angewärmtem Schneckenwasser gebadet (Wasserstand ca. 1 cm), bevor je Individuum 2000 Cercarien hinzu gegeben werden. Die Hamster verbleiben für weitere 30 min. in den Becken bevor sie in Käfige zurück gesetzt werden. Für unisexuelle (*single sex*)-Infektionen zur Zucht von Schistosomen eines einzigen Geschlechtes werden Cercarien einer monomiracidial infizierten Schnecke (siehe 2.2.1.4) verwendet.

#### 2.2.1.2 Perfusion des Endwirtes zur Gewinnung adulter *S. mansoni*

In den folgenden 42-49 Tagen nach der Infektion entwickeln sich im Endwirt die adulten Stadien von *S. mansoni*. Die Gewinnung der Schistosomen erfolgt zum Ende dieses Zeitraumes durch Perfusion infizierter Tiere (Duvall & DeWitt, 1967). Die Hamster werden mit Isofluran (Baxter, Deutschland) betäubt und erhalten durch Injektion ins Peritoneum eine Überdosis eines Sedativumgemischs aus Ketamin und Xylazin. Es folgt eine Öffnung des Brustkorbes zur Freilegung der inneren Organe und ein Anritzen der Pfortader. Das Perfusionsmedium wird mittels einer Kanüle über den linken Herzventrikel in den Blutkreislauf geleitet. Die adulten Schistosomen werden aus dem Gefäßsystem der Hamster gespült und auf einem Nylonnetz aufgefangen. Die so gewonnenen Würmer werden mit einem Pinsel in Kulturschalen mit M199-Medium (inklusive 10 % NCS, 1 % HEPES, 1 % ABAM) überführt. Für die weitere Verwendung können die adulten Schistosomen *in vitro* im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) gehalten werden. Ein Wechsel des Mediums erfolgt zweimal wöchentlich.



### **2.2.1.3 Gewinnung von *S. mansoni* Larvenstadien (Miracidien, Cercarien)**

Die Gewinnung von Miracidien erfolgt aus den Lebern infizierter Endwirte im Anschluss an die Perfusion. Zum Aufschluss wird das Gewebe zunächst mit einer Schere in 1 x PBS zerkleinert und anschließend mit einem Mixer homogenisiert (3 x 1 sec. auf höchster Stufe). Das über Zentrifugation (15 min., 5000 rpm) erhaltene Pellet wird zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in vorgewärmtem Leitungswasser resuspendiert. Die Suspension wird in einen Erlenmeyerkolben mit Steigrohr überführt und abgedunkelt. Aus den im Homogenat enthaltenen Eiern schlüpfen phototaktisch Miracidien, welche sich durch partielle Beleuchtung des Gefäßes am Ende des Steigrohrs ansammeln. Die gewonnenen Larven können direkt zur Infektion von Schnecken verwendet werden (siehe 2.2.1.4). Infizierte Zwischenwirte werden drei Wochen nach der Infektion für ca. 14 Tage dunkel gestellt. Zur Gewinnung von Cercarien werden die Schnecken nach Ablauf dieses Zeitraumes in 12 well-Mikrotiterplatten in je 2 ml Schneckenwasser vereinzelt und auf eine Leuchtplatte gestellt. Der Lichtreiz induziert eine Freisetzung von Cercarien aus der Schnecke. Innerhalb von drei bis vier Stunden können die infektiösen Larven aus dem Schneckenwasser gesammelt werden.

### **2.2.1.4 Haltung und Infektion des Zwischenwirtes**

Die als Zwischenwirte verwendeten Süßwasserschnecken der Art *Biomphalaria glabrata* werden in belüfteten, mit Schneckenwasser gefüllten Aquarien bei einer Raumtemperatur von 26°C gehalten. Die Raumbeleuchtung gewährleistet einen konstanten Tagesrhythmus von 16 Licht- und 8 Dunkelstunden. Für die polymiracidiale (multisexuelle) Infektion werden die Schnecken in 12 well-Mikrotiterplatten vereinzelt und jeweils 10-15 Miracidien in 2 ml Schneckenwasser hinzugegeben. Nach zwölf Stunden werden die Tiere in die Aquarien zurückgesetzt. Bei einer monomiracidialen (monosexuellen) Infektion wird hingegen nur ein einzelnes Miracidium je Schnecke verwendet.

### 2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

#### 2.2.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Zur Anzucht von ü.N.-Kulturen werden einzelne Kolonien von Agarplatten abgestrichen bzw. Zellen aus Glycerin-Stocks entnommen und unter Zugabe eines für die Selektion notwendigen Antibiotikums in flüssiges LB-Medium (6 ml) überführt. Die Inkubation erfolgt bei 37° C und 200 rpm über Nacht im Inkubator (Sambrook et al., 1989).

#### 2.2.2.2 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen werden Bakterien des Stammes 10 β (NEB; New England Biolabs) in einer ü.N.-Kultur mit 10 ml LB-Medium angezogen. Mit dieser Vorkultur wird 100 ml LB-Medium beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Es folgen 5 min. Abkühlen der Kultur auf Eis und eine anschließende Zentrifugation (5 min., 4000 g, 4°C) zur Gewinnung des Zellpellets. Dieses wird in 30 ml 4°C-kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 min. auf Eis belassen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird das Bakterienpellet in TFB2-Puffer (4°C) gelöst. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert (100 µl) und bei -80°C gelagert (Sambrook et al., 1989).

#### 2.2.2.3 Transformation von Hitzeschock-kompetenten Bakterien

Die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgt durch einen Hitzeschock. Hierzu werden 100 µl einer Zellsuspension aus kompetenten Zellen (siehe 2.2.2.2) auf Eis aufgetaut und mit 1 - 10 ng Plasmid-DNA bzw. 1 - 5 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.2.3.2) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min. auf Eis werden die Zellen für 1 min. einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und anschließend 2 min. auf Eis abgekühlt. Es folgt eine Zugabe von 600 µl LB-Medium und eine Inkubationszeit von 1 h bei 37°C und 200 rpm. Im Anschluss werden die Zellen auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert (Sambrook et al., 1989).

#### 2.2.2.4 Anlegen von Glycerin-Stocks

Die langfristige Lagerung von Bakterien-Klonen erfolgt in Form von Glycerin-Stocks. Dazu wird 1 ml einer ü.N.-Kultur mit 500 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

### 2.2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.2.3.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgt über Typ-II-Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs) nach den jeweiligen für die verwendeten Enzyme optimalen Puffer- und Inkubationsbedingungen (Sambrook et al., 1989). Entsprechende Pufferlösungen werden vom Hersteller bereitgestellt.

#### 2.2.3.2 Klonierung von DNA in Plasmid-Vektoren

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgt standardmäßig mit dem „PCR Cloning-Kit“ (Qiagen) mittels einer A-Überhangsklonierung in den Vektor pDrive. Für die gerichtete Insertion von DNA in den Expressionsvektor pcDNA 3.1/V5-His (Invitrogen) werden DNA-Sequenzen mit Primern amplifiziert, die am 5'-Ende Restriktionsschnittstellen enthalten. Nach anschließendem Restriktionsverdau können PCR-Produkt und linearisierter Vektor über einen T4-Ligationsansatz (Fermentas) zusammengeführt werden. Standardmäßig werden 25 - 50 ng Vektor-DNA und die entsprechende Menge Insert über folgende vereinfachte Formel berechnet (Qiagen PCR Cloning Handbook):

$$\text{ng Insert-DNA} = \frac{(\text{ng Vektor - DNA} \times \text{Insertgröße (bp)}) \times \text{molares Verhältnis}}{\text{Vektorgröße (bp)}}$$

Nach Inkubation der Ligationsansätze für mindestens eine Stunde bei 16°C werden diese direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt (siehe 2.2.2.3).

#### 2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

In der vorliegenden Arbeit werden zur Auftrennung von DNA horizontale Gele mit einer Agarosekonzentration von 1 - 1,5 % verwendet. Die Agarose (1 - 1,5 % w/v) wird in 1 x TAE gelöst und Ethidiumbromid vor dem Aushärten des Gels in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben. Vor dem Gelauftrag werden die Proben mit Probenpuffer versetzt, um die Dichte der Lösung zu erhöhen und ein Absinken in die Geltaschen zu erleichtern. Als Laufpuffer für die Gele wird ebenfalls 1 x TAE mit gleicher Konzentration an

Ethidiumbromid verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgt abhängig von Gelgröße und Agarosekonzentration für 30 bis 60 min. bei einer Spannung von 120 bis 150 V. Nach ihrer Auftrennung können die Nukleinsäuren durch das zugesetzte Ethidiumbromid unter UV-Licht (320 nm) sichtbar gemacht werden (Sambrook et al., 1989).

### **2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese von RNA**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA werden denaturierende 1,2 % Formaldehyd-gel verwendet. Zur Herstellung von Formaldehyd-Gelen wird Agarose (1,2 % w/v) in 1 x MOPS-Puffer und Formaldehyd (37 %; 16 % v/v eingesetzt) gelöst. Vor dem Gelauftrag werden die Proben mit RNA *loading dye* (Fermentas) versetzt und für 5 min. bei 95°C inkubiert (Sambrook et al., 1989).

### **2.2.3.5 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA aus Agarosegelen wird das „peqGOLD Gel Extraction Kit“ (PeqLab) gemäß Herstellerprotokoll angewendet.

### **2.2.3.6 Plasmid-Präparation aus transformierten *E. coli*-Zellen**

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien werden 6 ml ü.N.-Kulturen der entsprechenden Klone angezogen (siehe 2.2.2.1). Die eigentliche Präparation erfolgt mit dem „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit“ (PeqLab) entsprechend den Herstellervorgaben.

### **2.2.3.7 DNA-Extraktion aus adulten *S. mansoni***

Für die Isolation genomischer DNA aus adulten Schistosomen (Grevelding, 1995) werden 50 Würmer in 300 µl DNA-Extraktionspuffer aufgenommen und 3 x 15 Sekunden mit einem sterilen Pistill homogenisiert. Es schließt sich eine Proteinase K-Behandlung (Endkonz. 500 µg/ml) bei 37°C über Nacht an. Anschließend wird das Homogenat einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung unterzogen. Hierfür wird diesem zunächst ½ Vol. Phenol zugesetzt, gemischt und die Probe für 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Oberphase wird langsam abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit ½ Vol. Chloroform versetzt. Es wird erneut gemischt und für 3 min. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Reinigungsschritt wird einmal wiederholt, bevor die genomische DNA durch die Zugabe von

½ Vol. Ammoniumacetat (7,5 M) und 2,5 x Vol. eiskalten Ethanol (96 %) ü.N. bei -20°C ausgefällt wird. Durch eine Zentrifugation (30 min., 13.000 rpm, 4°C) wird die DNA pelletiert. Das Pellet wird zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und die genomische DNA in dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung kann die DNA mit RNase A behandelt werden (Endkonz. 20 µg/ml).

#### **2.2.3.8 RNA-Extraktion aus adulten *S. mansoni***

Die Gewinnung von RNA aus adulten Schistosomen erfolgt mit dem Trizol-Reagenz TriFast der Firma Peqlab nach Herstellerangaben. Das Ausgangsmaterial wird im Anschluss an die Perfusion zweimal in Perfusionsmedium sowie einmal in PBS gewaschen. Zur RNA-Extraktion aus paarungserfahrenen Schistosomen werden Pärchen verwendet, welche mit der Pinzette unter dem Binokular getrennt werden. Die Würmer können bis zur eigentlichen Extraktion bei -80°C oder zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Für die RNA-Extraktion selbst, werden 20-50 Würmer eingesetzt. Diese werden in 1 ml TriFast aufgenommen und mit einem Pistill homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min. bei RT werden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben für weitere 3 - 10 min. bei RT belassen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min. bei 12.000 g wird die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgt durch Zugabe von 500 µl Isopropanol für 15 min. auf Eis. Anschließend wird die RNA in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 12.000 g für 10 min. pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml Ethanol (75%) und einer weiteren Zentrifugation (10 min., 12.000 g, 4 °C) wird das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst. Für die vollständige Resuspension der RNA kann die Lösung für 10 min. bei 60°C inkubiert werden. Zur Qualitätskontrolle wird ein Aliquot von 2 µg RNA auf ein 1,2 % Formaldehyd-Gel aufgetragen bzw. 1 µl der Lösung mit dem BioAnalyzer (Agilent) analysiert (siehe 2.2.3.10). Bis zur weiteren Verwendung wird die extrahierte RNA bei -80°C gelagert.

#### **2.2.3.9 RNA-Extraktion aus isolierten Testes und Ovarien**

Zur Extraktion von RNA aus isolierten Testes und Ovarien wird ebenfalls das Trizol-Reagenz TriFast der Firma Peqlab genutzt. Im Vergleich zur Gewinnung von RNA aus den Adultstadien (siehe 2.2.3.8) kommt es aufgrund der geringen Menge an Ausgangsmaterial zu Abweichungen in der Durchführung. Die bei -80°C eingefrorenen Organe werden mit 500 µl

Trizol versetzt und dreimal im Wechsel in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei RT aufgetaut, um das Gewebe aufzuschließen. Es wird weiter gemäß Protokoll (siehe 2.2.3.8) verfahren, allerdings werden die Volumina der eingesetzten Reagenzien halbiert. Des Weiteren wird der Lösung nach Zugabe von 250 µl Isopropanol 1 µl Glykogen (Konz. 35 µg/µl) (peqLab, RNase-frei) zur Unterstützung der RNA-Fällung hinzugefügt. Die Präzipitation erfolgt ü.N. bei -20°C. Die hieran anschließenden Zentrifugations- und Waschschriffe entsprechen obigem Protokoll. Das RNA-Pellet wird an der Luft getrocknet und in DEPC-dH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wird 1 µl Organ-RNA mittels BioAnalyzer ausgewertet und die verbleibende RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.3.10 Bestimmung der RNA-Qualität mittels BioAnalyzer**

Zur Qualitätskontrolle kleiner RNA-Mengen (25 ng/µl - 500 ng/µl) wird der 2100 BioAnalyzer der Firma Agilent verwendet. Hierzu wird 1 µl je Probe auf einen „RNA 6000 Nano Chip“ (Agilent) entsprechend den Herstellerangaben aufgetragen und mit der Geräteeinstellung „Eukaryote Total RNA Nano Assay“ ausgewertet.

## **2.2.4 PCR-Methoden**

### **2.2.4.1 Standard-PCRs**

Alle PCR-Reaktionen zur *in vitro*-Amplifikation von DNA erfolgen soweit nicht anders vermerkt, mit den Thermocyclern der Firmen Eppendorf („MasterCycler“) und G-Storm („GS482“). Die als Primer verwendeten Oligonucleotide werden standardmäßig mit dem Software-Tool „OligoCalc“ (Kibbe, 2007) entsprechend der Formel von Howley et al. (1979) mit einem T<sub>m</sub>-Wert von 60°C konzipiert. Nach einem initialen Denaturierungsschritt erfolgt die Amplifikation in einem dreistufigen Prozess aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Gegenstrangsynthese mit insgesamt 25 - 35 Wiederholungen. Zeit- und Temperaturprofil richten sich nach den eingesetzten Primern, der verwendeten Polymerase sowie der Länge der Zielsequenz. Die „FirePol“ Taq-Polymerase (Solis BioDyne) erlaubt eine Denaturierung der DNA bei 95°C und benötigt zur Polymerisation von ca. 1 kb DNA 1 min. bei 72°C.

Pipettierschema einer 25 µl PCR-Reaktion:

DNA-template	10 - 100 ng
10 x Reaktionspuffer B	2.5 µl
[25mM] MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
[10 µM] 5'-Primer	2 µl
[10 µM] 3'-Primer	2 µl
[10 mM] dNTP-Mix	0,5 µl
(5 U/µl) FirePol Taq-Polymerase	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O ad	25 µl

Zusätzlich werden die Taq-Polymerasen „Bio-x-act long“ (Bioline) und AccuPrime (Invitrogen) sowie die Pfu-Polymerase „PfuUltra II Fusion HS“ (Agilent) entsprechend den Herstellerangaben genutzt. Im Folgenden werden weitere PCR-Methoden erläutert.

#### 2.2.4.2 Colony-PCR

Die Überprüfung eines Klonierungserfolges kann neben dem Restriktionsverdau über eine PCR erfolgen (Zon et al., 1989). Hierzu werden Bakterienkolonien zunächst mit einer Pipettenspitze auf eine Replika-Platte überführt und der Rest der Kolonie direkt in einem 25 µl PCR-Ansatz resuspendiert. Als Primer werden solche verwendet, die gegen die Insert-DNA oder gegen insertflankierende Plasmid-Sequenzen gerichtet sind. Um einen effizienten Aufschluss der Zellen zu gewährleisten, ist der eigentlichen Amplifikation ein initialer Denaturierungsschritt von 5 min. bei 95°C vorangestellt.

#### 2.2.4.3 *In vitro*-Mutagenese von Plasmid-DNA

Die PCR kann aufgrund der zyklischen Neusynthese von DNA genutzt werden, um gezielt Mutationen in DNA-Moleküle einzuführen (Lottspeich & Engels, 2006). In der vorliegenden Arbeit wird die sogenannte *in vitro*-Mutagenese verwendet, um Insertsequenzen von Expressionsvektoren durch Punktmutationen zu verändern und so den Austausch von

Aminosäuren auf Proteinebene herbeizuführen. Hierzu werden Primer mit einer Länge von 25-50 bp eingesetzt, die über einen entsprechenden Basenaustausch im Vergleich zur Ursprungssequenz verfügen. Die Primer sollten ein  $T_m$  von  $\geq 78^\circ\text{C}$  besitzen („QuickChange Site-Directed Mutagenesis“-Protokoll). Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{GC}) - 675/N - \% \text{ Fehlpaarung}$$

%GC = GC-Gehalt der Primersequenz in Prozent; N = Primerlänge in Basen; %Fehlpaarung = Menge an Fehlpaarungen in Prozent (QuickChange Site-Directed Mutagenesis-Protokoll)

Als Template für die Mutagenese-PCR wird 25 ng Plasmid-DNA des Wildtyp-Konstrukts als Insert eingesetzt. Als Enzym wird die Pfu-Polymerase „PfuUltra II Fusio HS“ (Agilent) mit *proof reading*-Aktivität verwendet, um Fehler bei der Replikation zu minimieren. Für einen 50  $\mu\text{l}$  Ansatz ergibt sich folgendes Pipettierschema:

Wildtyp-Plasmid-DNA	25 ng
10 x pfu-Reaktionspuffer	5 $\mu\text{l}$
[10 $\mu\text{M}$ ] 5'-Mutagenese-Primer	2,5 $\mu\text{l}$
[10 $\mu\text{M}$ ] 3'-Mutagenese-Primer	2,5 $\mu\text{l}$
[10 mM] dNTP-Mix	1 $\mu\text{l}$
(2,5 U/ $\mu\text{l}$ ) PfuUltra II Fusio HS	1 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O ad	50 $\mu\text{l}$

Im Anschluss an die PCR wird der Mutagenese-Ansatz einem *DpnI*-Verdau unterzogen, um das als Template eingesetzte Wildtyp-Plasmid abzubauen (McClelland & Nelson, 1992). Zur Kontrolle von PCR und *DpnI*-Verdau wird ein Aliquot der mutagenisierten Plasmid-DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen.



#### **2.2.4.4 Genome Walking**

Das *Genome Walking* (GW) ermöglicht die PCR-basierte Identifizierung unbekannter DNA-Sequenzen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Restriktionsverdau genomischer DNA mit anschließender Ligation von Adapter-Sequenzen an die erhaltenen DNA-Fragmente. In einem *nested*-PCR Ansatz können mit einer Kombination aus genspezifischen und gegen die Adapter-Sequenz gerichteten Primern unbekannte Bereiche, ausgehend von einem bekannten Sequenzabschnitt amplifiziert werden. Das „GenomeWalker Universal Kit“ (Clontech) bietet die Möglichkeit durch Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme vier Banken mit einer 5'-Adapter-Sequenz herzustellen. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise findet sich bei El-Bahay (2003), auf dessen Arbeit die hier verwendeten GW-Banken zurückgehen.

#### **2.2.4.5 RT-PCR**

In der vorliegenden Arbeit wird die RT-PCR genutzt, um spezifische Transkripte in den Adultstadien und Reproduktionsorganen von *S. mansoni* nachzuweisen. Die reverse Transkription (RT) erfolgt mit dem „QuantiTect reverse Transcription Kit“ (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers. In die Reaktion werden 200 ng - 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Vor der eigentlichen RT-Reaktion erfolgt ein „gDNA WipeOut“-Schritt zum Abbau genomischer DNA. Die anschließende RT läuft für 30 min. bei 42°C mit der reversen Transcriptase „QuantiScript“ (Qiagen) und einem Primergemisch aus *random*-Hexanucleotiden und Oligo-(dT)-Primern ab. Das Enzym wird für 3 min. bei 95°C inaktiviert und die cDNA bis zu ihrer Verwendung als PCR-Template bei -80°C gelagert. Nachfolgende PCR-Reaktionen entsprechen in ihrer Durchführung der unter 2.2.4.1 beschriebenen Methodik. Für organspezifische RT-PCRs werden 1:40 Verdünnungen von cDNAs aus Testes und Ovarien eingesetzt. cDNAs aus Pärchen dienen als Positivkontrollen.

#### **2.2.4.6 Quantitative *real time*-PCR**

Die quantitative *real time*-PCR (qPCR) ermöglicht eine Fluoreszenz-basierte Quantifizierung spezifischer DNA-Sequenzen und findet in dieser Arbeit eine Anwendung bei der Detektion transkriptioneller Differenzen zwischen verschiedenen cDNA-Populationen. Dies beinhaltet den Nachweis von Transkriptionsreduktionen nach RNAi-Experimenten sowie Untersuchungen zur stadien- und organspezifischen Expression ausgewählter Gene. Für alle

Analysen wird der Ansatz der relativen Quantifizierung gewählt, bei der die Transkription eines Gens mit der eines endogenen Referenzgens verglichen wird.

Alle in der qPCR verwendeten Primer werden mittels der Software-Tools „Primer 3Plus“ und „OligoCalc“ ausgewählt und mit einem  $T_m$ -Wert von 60°C konzipiert. Die Länge des gewählten Amplikons sollte zwischen 140 und 180 bp liegen. Zunächst wird die Effizienz der Primer über Standardkurven bestimmt, indem Verdünnungen des eluierten PCR-Produkts als Template eingesetzt werden. Der ermittelte Wert sollte zwischen 90 % und 100 % liegen und nicht mehr als 10 % von der des Referenzgens abweichen. Zusätzlich wird über eine Schmelzkurvenanalyse die Amplifikation von Nebenprodukten ausgeschlossen.

Geeignete Primer können auf cDNA-Templates verwendet werden, um die Amplifikation des Zielgens mit der Referenz SmActin (Smp\_161930) zu vergleichen. Zusätzlich wird eine Standardkurve für Actin mitgeführt, um den *threshold* der Reaktion und die  $C_t$ -Werte der einzelnen qPCR-Ansätze festzulegen. Der *threshold* definiert hierbei die Höhe der Hintergrundfluoreszenz, während der  $C_t$ -Wert den Zyklus beschreibt, an dem eine Reaktion erstmals signifikant diese Schwelle überschreitet. Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgt über die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode nach entsprechender Formel (Dorak, 2008):

$$\Delta C_t = C_t \text{ Ziel-Gen} - C_t \text{ endogene Kontrolle (Referenz)}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Probe} - \Delta C_t \text{ Kalibrator}$$

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Als „Probe“ werden in obiger Formel solche Ansätze definiert, bei denen cDNA aus dsRNA-behandelten Würmern bzw. aus paarungserfahrenen Würmern eingesetzt wird. Hingegen dienen cDNAs aus Kontrollgruppen sowie aus paarungsunerfahrenen Schistosomen als Kalibrator.

Alle qPCRs werden mit dem „PerfeCTa SYBR Green Super Mix“ von Quanta entsprechend nachfolgendem Schema durchgeführt:

cDNA-template	5 µl
2 x PerfeCTa SYBR Green Super Mix	2.5 µl
[4 µM] 5'-Primer	2 µl
[4 µM] 3'-Primer	2 µl
dH <sub>2</sub> O ad	20 µl

Organ-cDNAs werden als 1:20 Verdünnungen eingesetzt, cDNAs aus vollständigen Würmern hingegen 1:40 verdünnt. Das Reaktionsprofil beinhaltet einen initialen Denaturierungsschritt für 3 min. bei 95°C gefolgt von 45 Zyklen aus jeweils drei Temperaturschritten: 95°C (10 sec.), 60°C (15 sec.) und 72°C (20°C).

#### 2.2.4.7 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA erfolgt durch den externen Anbieter LGC Genomics (Berlin, Germany).

#### 2.2.5 *In situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung ist eine Methode zum Nachweis von gewebespezifischer Transkription durch komplementäre RNA-Sonden und wird im Folgenden in ihrer Anwendung auf Gewebeschnitte adulter *S. mansoni* beschrieben (Köster et al., 1988).

##### 2.2.5.1 Herstellung von Gewebeschnitten adulter *S. mansoni*

Adulte Schistosomen werden im Anschluss an die Perfusion für 90 min. bei RT in einem Bouin-Fixativ eingelegt. Anschließend folgt eine Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol) für jeweils 45 min. und eine Färbung mit Chromotrop R2 (2 Tropfen in 96% Ethanol). Nach einer Inkubation ü.N. in Methylbenzoat werden die dehydrierten Würmer in Benzol gewaschen (2 x 5 min.) und für 1 - 2 h in flüssiges Paraplast (60°C) gegeben. Dann werden die Würmer portionsweise in kleinen rechteckigen Formen mit neuem Paraplast ü.N. bei 60°C inkubiert. Bei 4°C härten die Paraffinblöcke aus und können mit Hilfe eines Microtoms (Leica, Histoslide 2000 R) in 5 µm

Schnitte geschnitten werden. Diese werden mit einem Pinsel zunächst in ein Wasserbad (40°C) und anschließend auf Objektträger überführt. Die Präparate werden zur Fixierung für 1 h bei 60°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

### 2.2.5.2 *In vitro*-Transkription zur Synthese von RNA-Sonden

Der Nachweis der Transkripte auf den Gewebeschnitten erfolgt über spezifische RNA-Sonden. Zu ihrer Herstellung wird zunächst eine DNA-Sequenz (400-600 bp) des zu detektierenden Transkripts in den Vektor pDrive kloniert. Das Template für die *in vitro*-Transkription (T7 RNA-Polymerase, Roche) wird mit spezifischen Primern mittels PCR synthetisiert. Um später neben der komplementären *antisense*-Sonde auch eine *sense*-Sonde zu erhalten, sind zwei PCR-Reaktionen nötig, bei denen jeweils ein Primer des verwendeten Primerpaares am 5'-Ende die T7-Promotorsequenz als Anhang enthält. Zum späteren Nachweis der Sonden werden DIG-markierte UTPs („10 x DIG-UTP-labeling Mix“; Roche) in den Transkriptionsansatz gegeben. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

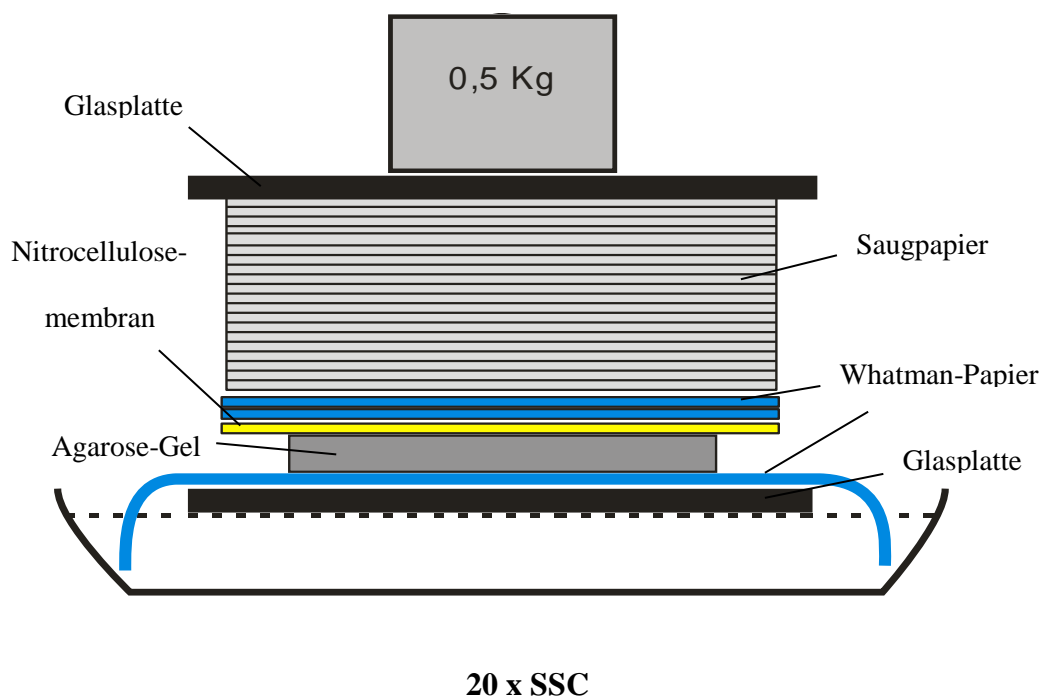
DNA-Template	1 µg
10 x Transkriptionspuffer	2 µl
(40 U/µl) RNasin	0,5 µl
10 x DIG-UTP-labeling Mix	2 µl
(20 U/µl) T7 RNA-Polymerase	1 µl
ad DEPC-dH <sub>2</sub> O	20 µl

Es folgt eine Inkubation der Transkriptionsansätze für 2 h bei 37°C. Zur Entfernung des DNA-Templates wird 1 µl RNase-freie DNase I (20 U/µl, Fermentas) hinzugegeben und die Transkriptionsansätze für weitere 10 min. bei 37°C belassen. Zum Abstoppen der DNase-Reaktion werden 2 µl EDTA (0,5 M) hinzugefügt und die RNA in 1/10Vol. Lithiumchlorid (4 M) und 2,5 x Vol. Ethanol (96 %) für mindestens 2 h bei -80°C gefällt. Die gefällte RNA wird in der Kühlzentrifuge bei 13.000 rpm und 4°C für 30 min. pelletiert. Nach einem anschließenden Waschschrift (70 % Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O) und erneuter Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 5 min.) kann das Pellet an der Luft getrocknet und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

resuspendiert werden. Bis zum Gebrauch der RNA-Sonden ist eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  möglich.

### 2.2.5.3 Transkript-Blot

Die Qualität der RNA-Sonden wird mittels Transkript-Blot überprüft. Hierzu werden jeweils  $2\ \mu\text{l}$  der Sonden-Ansätze auf einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgt ein dreimaliges Waschen des Gels in DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  und einmal mit  $10 \times \text{SSC}$  (10 min.). Zur Überführung der Transkripte auf eine Nitrocellulosemembran wird ein Northern-Blot mit  $20 \times \text{SSC}$  als Transferpuffer angewendet. Der Northern-Blot erfolgt über Nacht nach dem Prinzip des Kapillartransfers, mit dem in Abbildung 2.1 gezeigten Aufbau.



**Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines Kapillartransfer-Blots**

Zur Überführung der RNA-Sonden von einem Agarosegel auf eine Nitrocellulosemembran wird ein Kapillartransfer-Blot verwendet. Hierzu wird Whatman-Filterpapier (blau) über eine Glasplatte gelegt, so dass beide Enden des Filterpapiers in  $20 \times \text{SSC}$  liegen. Das RNA-Gel (dunkelgrau) und die Nitrocellulosemembran (gelb) werden auf den Filter gelegt. Es folgen eine weitere Lage Filterpapier (blau), ein Saugpapierstapel (hellgrau) sowie ein Gewicht von mindestens  $0,5\ \text{kg}$ .

Nach erfolgreichem Transfer wird die Membran getrocknet und einem UV-Crosslinking zur Fixierung der Nukleinsäuren unterzogen. Der Nachweis der mit Digoxigenin markierten Transkripte erfolgt über einen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-DIG-Antikörper (Roche). Die Nitrocellulosemembran wird zunächst für 30 min. in 2 % Blockierungslösung inkubiert, bevor der Antikörper (1:2500 verdünnt in 2 % Blockierungslösung) für 30 min. bei RT hinzu gegeben wird. Einmaliges Waschen mit 1 x Maleinsäure/0,3 % Tween 20 entfernt ungebundene Antikörper von der Membran. Nach einem weiteren Waschschrift in Substratpuffer (5 min.) kann die Farbumsetzung erfolgen. Hierzu werden Naphthol-AS-Phosphat (Serva; 10 mg gelöst in 200 µl DMSO) und Fast Red TR (Sigma Aldrich; 50 mg gelöst in 50 ml Substratpuffer I) gemischt, filtriert und auf die Membran gegeben. Zum Stoppen der Reaktion wird die Membran in dH<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend getrocknet.

### 2.2.5.4 Hybridisierung der Sonden und Farbreaktion

Zur Vorbereitung der Gewebeschnitte für die Sondenhybridisierung werden die Objektträger zunächst für 2 x 5 min. mit Xylol behandelt, um das Paraffin zu entfernen. Es folgt eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 2 x 5 min. 100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol) und 5 min. in DEPC-H<sub>2</sub>O zur Hydrierung des Gewebes. Um Gewebe und Nukleinsäuren für die Sonden zugänglicher zu machen, werden die Schnitte für 20 min. in 0,2 N HCl inkubiert und nachfolgend einer Proteinase K-Behandlung (20 min. bei 37°C) unterzogen. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion werden die Schnitte für 5 min. in 0,2 % Glycin-Lösung gegeben. Es folgen Waschschriffe für 15 sec. in 4°C kalter 20 % Essigsäure, 5 min. in 1 x PBS und 15 min. in 20 % Glycerol. Die Schnitte werden kurz in 2 x SSC getaucht, für 10-12 min. auf eine Heizplatte (70°C) gelegt und dann auf einem Kühlakku abgeschreckt. Die Sonden werden zwischenzeitlich mit tRNA und Heringsperma-DNA im folgenden Verhältnis gemischt:

RNA-Sonde	4 - 6 µl
(10 mg/ml) Heringsperma-DNA	4 µl
(33 mg/ml) tRNA	8 µl
ad DEPC-dH <sub>2</sub> O	20 µl

Das Sondengemisch wird für 10 min. auf 70°C erhitzt und anschließend in Eiswasser abgeschreckt. Je 20 µl Sondengemisch werden mit 180 µl Hybridisierungspuffer gemischt und auf die Schnitte gegeben (je Objektträger 200 µl). Die Hybridisierung erfolgt in einer feuchten Kammer über Nacht bei 42°C.

Am Folgetag werden die Objektträger einer Reihe von Waschschrritten unterzogen, beginnend mit Waschlösung I (15 min., 42°C). Es folgen bei RT je 15 min. 1 x SSC und 0.5 x SSC sowie 5 min. 1 x Maleinsäure-Puffer. Vor der Zugabe der Anti-DIG-Antikörper (1:2500 verdünnt in 2 x Blockierungslösung) werden die Schnitte für 30 min. in 4 % Blockierungslösung inkubiert. Die gelösten Antikörper selbst verbleiben für 2 - 3 h auf den Schnitten (feuchte Kammer). Es folgt ein zweimaliges Waschen mit Maleinsäure-Puffer und 5 min. in Substratpuffer. Dann kann mit der Farbumsetzung begonnen werden (siehe 2.2.5.3). Je Objektträger wird ca. 200 µl Substrat aufgetragen und die Farbentwicklung regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Zum Abstoppen der Farbreaktion werden *sense* und *antisense* Schnitte in dH<sub>2</sub>O getaucht und anschließend mit Aquatex (Merck) fixiert.

### **2.2.6 Isolation von Testes und Ovarien aus adulten *S. mansoni***

Zur Isolation von Testes und Ovarien werden adulte *S. mansoni* direkt im Anschluss an die Perfusion nach Geschlecht getrennt, zu je 50 Individuen in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und zweimal mit 2 ml M199-Medium (ohne Zusätze) bei RT gewaschen. Um vollständig entwickelte Organe zu erhalten, sollten Würmer aus Paarungen verwendet werden. Es folgt eine Behandlung der Schistosomen mit jeweils 500 µl *tegument stripping*-(TS-)Lösung bei 37°C und 1.200 rpm im Thermoschüttler (TS-100, Biosan), um das Tegument aufzulösen. Die Inkubation mit TS-Lösung wird bei Weibchen einmal und bei Männchen 2 x wiederholt. Im Anschluss werden die Detergenzien durch mehrfaches Waschen (3 x) mit jeweils 2 ml M199-Medium (ohne Zusätze) entfernt. Die nun freigelegte subtegumentale Muskulatur kann über einen Proteaseverdau mit Elastase (Sigma Aldrich) abgebaut werden. Hierzu wird das Enzym frisch in einer finalen Konzentration von 5 U/ml M199-Medium (ohne Zusätze) gelöst und die Proben in 500 µl Lösung für 30 bis maximal 40 min. bei 37°C im Thermoschüttler (TS-100, Biosan) inkubiert. Während dieses Zeitraums werden die Proben alle 5 bis 10 min. durch leichtes Schütteln der Reaktionsgefäße von Hand vorsichtig aufgewirbelt. Das Voranschreiten des enzymatischen Aufschlusses kann anhand einer zunehmenden Trübung des Mediums beobachtet werden. Die Männchen

verlieren bei fortschreitender Behandlung ihre Struktur und erschlaffen zunehmend. Durch das kontinuierliche Schütteln der Proben bilden sie zum Ende der Inkubationszeit ein deutlich zu erkennendes Konglomerat im Reaktionsgefäß aus. Die Weibchen hingegen beginnen mit der Zeit immer stärker zu fragmentieren. Um den geeigneten Endpunkt der Reaktion zu bestimmen, werden in regelmäßigen Abständen 20 µl Aliquots entnommen und unter dem Lichtmikroskop auf freiliegende Organe untersucht.

Die Ansätze werden in Petrischalen mit 6 cm Durchmesser überführt und die Reaktionsgefäße 4 x mit M199-Medium (ohne Zusätze) ausgespült, um das Material vollständig zu überführen. Unter einem inversen Mikroskop können freiliegende Organe mittels einer 10 µl Pipette eingesammelt und zum Waschen in kleinere Petrischalen (30 mm Durchmesser) mit frischem Medium transferiert werden. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis Testes und Ovarien frei von anderen Zellen und Geweberesten vorliegen. Die in den Wurmleichen verbliebenen Organe können durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Lösung mit einer 200 µl Pipette aus dem Gewebe herausgelöst und ebenfalls eingesammelt werden. Um einen hohen Anteil an vitalen Zellen in Testes und Ovarien zu gewährleisten, empfiehlt sich ein zügiges Arbeiten. Die isolierten Organe werden in 2 ml Reaktionsgefäße mit Reservoir (Biozym) überführt. Im Anschluss daran werden Testes für 5 min. bei 1000 g und Ovarien für 1 min. bei 8000 g in der Tischzentrifuge pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C. Das vorliegende Protokoll findet ebenfalls Anwendung für die Isolation der Gonaden von Würmern aus *single sex* Infektionen (Hahnel et al., 2013).

Zur Überprüfung der Vitalität von Zellen isolierter Testes und Ovarien können Organe direkt im Anschluss an die Aufreinigung mit Trypanblau (0,4 %, Sigma Aldrich) gefärbt werden. Hierzu werden Gonaden in 50 µl Farbstoff resuspendiert und 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wird die Resuspension auf einen Objektträger überführt und unter dem Lichtmikroskop (CX21, Olympus) analysiert. Bilder können über eine Digitalkamera (SC30, Olympus) angefertigt und mit der „CellSense Dimension“ Software (Olympus) ausgewertet werden.



### **2.2.7 RNA-Interferenz-Versuche bei adulten *S. mansoni***

In der vorliegenden Arbeit werden RNA-Interferenz-(RNAi)-Experimente an adulten *S. mansoni* mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) durchgeführt. Das Ziel der Versuche ist eine Reduktion von Transkriptionsraten spezifischer Gene mit anschließender Charakterisierung behandelter Schistosomen auf molekularbiologischer und morphologischer Ebene. Das Einbringen der dsRNAs in die Würmer erfolgt über Elektroporation (Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2010a).

#### **2.2.7.1 Synthese von dsRNA**

Die Synthese von dsRNA für RNAi-Versuche an adulten Schistosomen erfolgt mit dem „T7 MEGAscript RNAi Kit“ (Ambion) nach Anleitung des Herstellers. Als Template für die *in vitro*-Transkription dienen PCR-Produkte, welche durch entsprechende Primerkonzeptionen an 5'- und 3'-Enden über T7-Promoter-Sequenzen verfügen. Im Anschluss an Synthese und Säulenaufreinigung wird die dsRNA ü.N. bei -20°C gefällt (1:10 Vol. 4 M LiCl, 2,5 x Vol. 100 % Ethanol). Es folgt eine Zentrifugation für 10 min. (12.000 rpm, 4°C) und ein anschließendes Waschen des Pellets mit 75% Ethanol (verdünnt in DEPC-H<sub>2</sub>O). Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 10 min. (12.000 rpm, 4°C) wird das Pellet getrocknet und in Elektroporationspuffer (Spillotis et al., 2010) resuspendiert. Die dsRNA wird anschließend zur Qualitätskontrolle auf einem Agarosegel aufgetrennt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.7.2 Elektroporation adulter *S. mansoni***

Das Einbringen von dsRNA in adulte Schistosomen erfolgt durch Elektroporation mit dem Pulser XCell von Bio-Rad. Hierzu werden jeweils acht Pärchen in eine 4 mm Küvette (Bio-Rad) mit 50 µl Elektroporationspuffer überführt. Die dsRNA-Konzentration des Puffers beträgt 500 ng/µl. Der eigentliche Elektroporationsschritt erfolgt durch Anlegen eines *single square wave*-Impulses von 125 V für 20 ms bei Raumtemperatur (Ndegwa et al., 2007; Krautz-Peterson et al., 2010a). Im Anschluss werden die Würmer zusammen mit dem dsRNA-haltigen Puffer in 3 ml M199-Vollmedium überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Nach 48 h wird das Medium gewechselt und nach fünf bis sechs Tagen werden die Würmer zur RNA-Isolation verwendet bzw. für morphologische Analysen in AFA fixiert.

### **2.2.8 *In vitro*-Behandlungen adulter *S. mansoni* mit Inhibitoren bzw. Antagonisten**

Jeweils sechs bis acht *S. mansoni*-Pärchen werden 24 h nach Perfusion in Schalen mit 3 ml frischem M199-Vollmedium überführt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Inhibitoren (BIBF1120, SelleckChem; 3289-8625, Merck Millipore) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wird täglich unter Zugabe neuen Inhibitors gewechselt und nach fünf bis sechs Tagen werden die behandelten Würmer für morphologische Analysen in AFA fixiert. Als Kontrolle dienen Pärchen die ausschließlich mit dem Lösungsmittel (DMSO) der verwendeten Inhibitoren inkubiert werden. Die Behandlung adulter von *S. mansoni*-Pärchen mit Progesteron erfolgt nach gleichem Prinzip, allerdings wird hier Basch-Medium für die *in vitro*-Kultur verwendet.

### **2.2.9 Karminrot-Färbung adulter *S. mansoni***

Adulte *S. mansoni* werden zunächst für mindestens 24 h in AFA-Fixativ bei RT fixiert, bevor sie zur Färbung für 30 min. in eine Karminrot-Lösung überführt werden. Die Entfärbung erfolgt in saurem Ethanol (70 % Ethanol mit 2,5 % konzentrierter HCl) unter mehrfachem Wechseln der Lösung, bis die Würmer nur noch geringe Mengen Farbstoff abgeben. Hieran schließt sich eine Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 %, 100 %; jeweils 5 min.) an, an deren Ende die Würmer schließlich auf vorbereiteten Objektträgern mit Kanadabalsam (Sigma Aldrich) fixiert werden (modifiziert nach Machado-Silva et al., 1998).

### **2.2.10 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (KLSM)**

Die morphologische Betrachtung Karminrot-gefärbter Schistosomen erfolgt an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (TSC SP2) der Firma Leica im Reflektionsmodus mit einer He/Ne-Laseranregung von 50 % bei 488 nm und einem 470 nm *long pass* Filter zur Detektion.

### **2.2.11 *Germinal vesicle breakdown*-Assays**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten *Germinal Vesicle Breakdown*-(GVBD)-Assays zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Tyrosinkinasedomänen und deren Inhibition mittels kommerzieller Wirkstoffe erfolgen in Kooperation mit Dr. Colette Dissous und Mathieu Vanderstraete (CIIL - Center for Infection and Immunity der Universität Lille, Frankreich). Hierzu werden Kinasedomänen-kodierenden Sequenzbereiche in den Vektor pcDNA 3.1/V5-His (Invitrogen) kloniert und entsprechende Konstrukte nach Linearisierung zur *in vitro*-Transkription von 5'-Cap-RNA mit dem „T7 mMessage mMachine Kit“ (Ambion) verwendet. Die *in vitro* synthetisierten RNAs (je 60 ng) werden anschließend in *Xenopus laevis* stage VI Oocyten injiziert (Browaeys-Poly et. al., 2000; Long et al., 2010) und diese nach einer Inkubation von 18 h bei 19°C in ND96-Medium bezüglich des Auftretens eines GVBDs untersucht (Haccard et al., 1995). Als Positivkontrollen werden mit Progesteron behandelte Oocyten verwendet und als Negativkontrollen dienen unbehandelte Oocyten. Inhibitoren können dem ND96-Medium in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt werden (Beckmann et al., 2011).

### **3. Ergebnisse**

Der Ergebnisteil der hier vorliegenden Dissertation gliedert sich in drei Abschnitte. Der Abschnitt 3.1 beinhaltet die Etablierung einer Methode zur Isolation von Testes und Ovarien aus adulten *S. mansoni* (siehe 3.1) sowie erste Transkriptionsanalysen ausgewählter Gene auf Ebene der Gonaden. Der zweite Teil enthält Lokalisations- und Transkriptionsstudien zu Transmembranrezeptoren aus adulten Schistosomen (siehe 3.2). Den Abschluss der Ergebnisse bilden initiale Funktionsanalysen ausgewählter Rezeptoren mittels RNAi-Experimenten und Inhibitorstudien (siehe 3.3).

#### **3.1 Etablierung einer Methode zur Isolation von Gonaden aus adulten *S. mansoni* und erste Transkriptionsanalysen**

Mit dem Beginn des Genomprojekts (Berriman et al., 2009; Protasio et al., 2012) wurde eine wichtige Grundlage für weiterführende Untersuchungen verschiedener Aspekte der *S. mansoni*-Biologie geschaffen. Hierzu zählen sowohl funktionelle Analysen einzelner Gene als auch Transkriptom- und Proteomstudien mit Fokus auf unterschiedliche Entwicklungsstadien des Parasiten, wie z.B. Analysen zur geschlechts- und paarungsabhängigen Expression von Genen in adulten *S. mansoni* (Hoffmann et al., 2002; Fitzpatrick et al., 2005; Fitzpatrick & Hoffmann, 2006; Waisberg et al. 2007; Verjovski-Almeida et al., 2007; Ojopi et al., 2007). Die Mehrzahl dieser Studien erfolgte aufgrund des eingeschränkten Zugriffs auf innere Organe und Gewebe des Parasiten auf der Ebene ganzer Organismen und konnte so gewebespezifischen Fragestellungen nicht gerecht werden. Einen ersten Fortschritt in dieser Hinsicht stellte die Publikation von Nawaratna et al. (2011) dar, in der erstmals Transkriptionsprofile einzelner Organe und Gewebe adulter *S. mansoni*, wie Testis, Ovar, Vitellarium und Gastrodermis mittels einer Kombination aus Lasermikrodissektion und Microarrays untersucht und mit denen vollständiger Würmer verglichen wurde. Allerdings stehen spezifische Analysen innerer Organe und Gewebe von adulten *S. mansoni* damit immer noch am Anfang und sind mit großem Aufwand verbunden sowie erheblichen Einschränkungen unterworfen.

Das erste Teilprojekt dieser Arbeit zielte daher auf die Etablierung einer Methode zur Isolation vollständiger Testes und Ovarien adulter Schistosomen. Die Konzeption der hier

angewendeten Technik geht auf meinen Kollegen Dr. Thomas Quack aus der Arbeitsgruppe von Prof. Grevelding zurück. Ihm gelang es, über eine Kombination aus Detergenzienbehandlung und Proteaseverdau erstmals Ovarien aus maturen Schistosomenweibchen zu isolieren. Im Rahmen meines Projekts wurde sein Ausgangsprotokoll hinsichtlich Detergenzienkonzentrationen sowie den verwendeten Proteasen modifiziert und auf männliche Würmer sowie paarungsunerfahrene Weibchen übertragen (siehe 3.1.1).

Um Hinweise auf die Qualität der isolierten Gonaden zu erhalten, wurden Testes und Ovarien im Folgenden mittels Vitalfärbungen lichtmikroskopisch analysiert (siehe 3.1.2). Hieran anschließend wurden Trizol-Extraktionen durchgeführt und Quantität sowie Qualität der erhaltenen Gesamt-RNA bestimmt (siehe 3.1.3). Den Abschluss des ersten Teilprojekts bildeten organspezifische RT-PCRs mit dem Ziel, die Anwendbarkeit der Methode hinsichtlich Fragestellungen zur Genexpression in den Gonaden zu untersuchen (siehe 3.1.4).

### **3.1.1 Isolation von Testes und Ovarien aus adulten *S. mansoni***

Um Zugang zu inneren Geweben und Zellen aus adulten Schistosomen zu erhalten, sind zwei grundsätzliche Schritte notwendig. Als erstes muss das Tegument als äußere Schicht der Würmer aufgelöst und zweitens die subtegumentalen Muskelschichten entfernt werden.

Bei dem Tegument handelt es sich um eine syncytiale Schicht, welche die gesamte Oberfläche des Parasiten überzieht. Es bildet eine physiologisch aktive und widerstandsfähige Barriere gegen das Immunsystem des Wirts (van Hellemond et al. 2006). Nach außen hin wird es durch die sogenannte Membranocalyx abgeschlossen, die aus mehreren Lipidschichten besteht. Nach innen folgt dem Tegument eine Basallamina, welche das Syncytium von der Muskulatur abgrenzt.

Für die Entfernung des Teguments wurde die TS-Lösung, eine Kombination aus vier nicht-ionischen und nichtdenaturierenden Detergenzien (Brij35, Nonidet P40, Tween 80 und TritonX-405) verwendet. Diese ermöglicht eine vollständige Auflösung des Teguments, ohne die weitere Struktur des Wurms anzugreifen (siehe Abb. 3.1, **B**), wie über konfokale *laser scanning*-Mikroskopie (KLSM) (Quack et al, 2012) und elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden konnte (Hahnel et al., 2013). Um eine möglichst sensitive Behandlung der Würmer zu gewährleisten, wurden Detergenzienkonzentrationen und Inkubationsdauer variiert und Bedingungen gewählt, bei denen die Würmer unter lichtmikroskopischer Betrachtung noch Vitalzeichen wie z.B. Darmperistaltik zeigten. Zum

enzymatischen Abbau der unterhalb des Teguments befindlichen Quer- und Längsmuskulatur wurden unterschiedliche Proteasen wie eine Collagenase-Dispase-Mixtur (Col/Dis.; Roche), Papain, Trypsin (beides Sigma Aldrich) und Proteinase K (Merck; Quack, persönliche Mitteilung) auf ihre Wirksamkeit getestet. Das beste Ergebnis aus effizientem Muskelabbau und Schonung submuskulärer Strukturen wurde allerdings durch den Einsatz von Elastase erzielt, einem Enzym, welches spezifisch Elastin hydrolysiert (Shotton, 1970). Diese Protease zeigte darüber hinaus bei beiden Geschlechtern eine ähnliche Effizienz, wohingegen Col/Dis. nur für die Behandlung von Weibchen geeignet war.

Nach ausreichender Inkubation mit Elastase bei 37°C und mechanischer Beanspruchung (600 rpm, Thermoschüttler) kam es zum Aufschluss der Wurmkrankassen und zur Freisetzung von inneren Organen, Organfragmenten und Zellen ins Medium (siehe Abb. 3.1, C-E). Männliche Karkassen brachen dabei häufig nahe der Kopffregion auf, was das Herauslösen der Testes aus dem umliegenden Gewebe begünstigte. Vollständig isolierte Testes bestanden aus sechs bis neun Loben, welche über den *vas deferens* miteinander verbunden und meist ringförmig angeordnet waren. Der Durchmesser einzelner Loben betrug 90 bis 100 µm und ihr Inhalt erschien unter dem Lichtmikroskop homogen (siehe Abb. 3.1, F). Zwischen Testes aus paarungserfahrenen und paarungsunerfahrenen Männchen ließen sich keine morphologischen Unterschiede erkennen (nicht gezeigt).

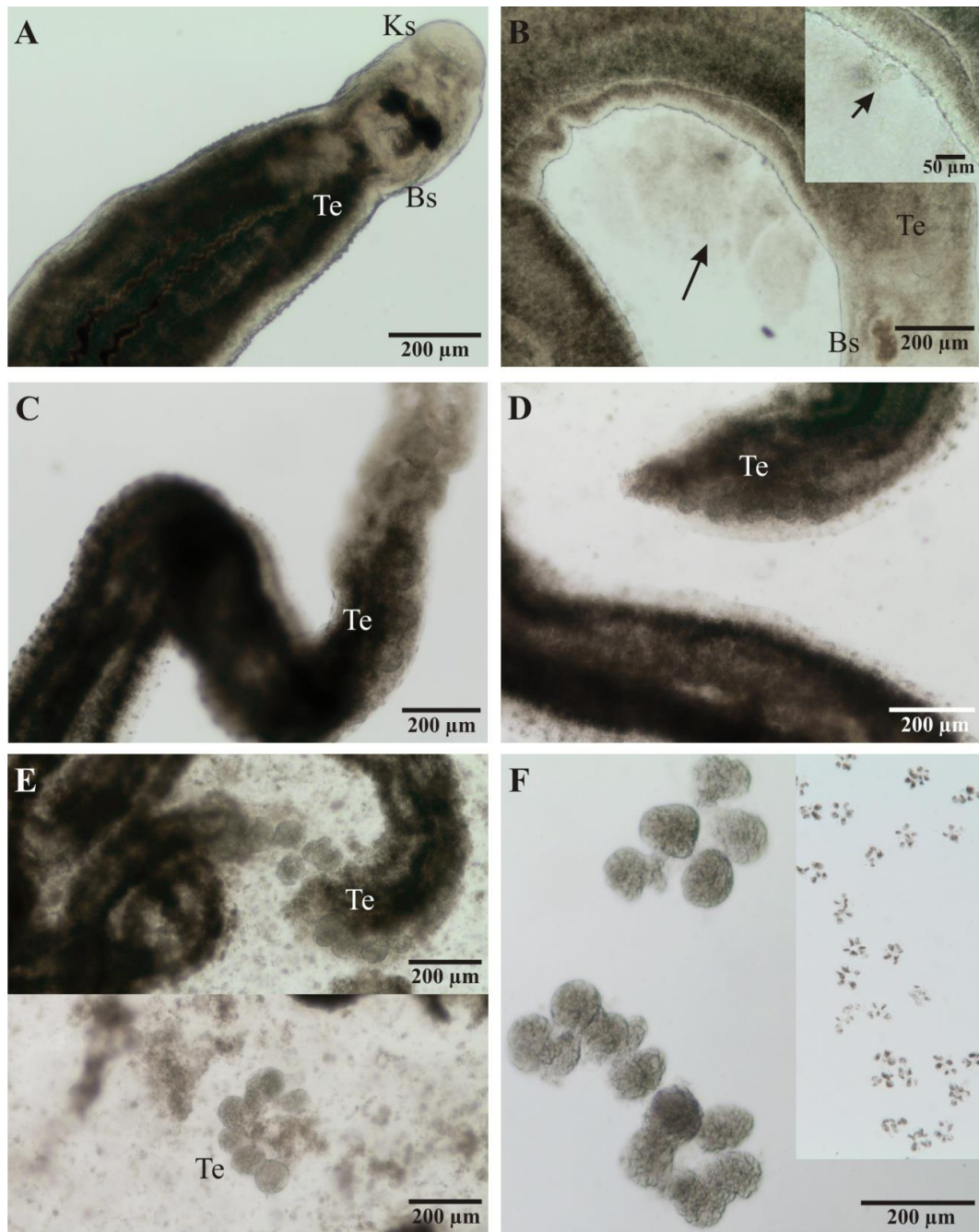
Die durch die Fragmentierung paarungserfahrener Weibchen freigesetzten, maturen Ovarien besaßen eine birnenförmige Struktur mit einer Länge von ca. 400 µm und einer maximalen Breite von ca. 120 µm (siehe Abb. 3.2, F). Ihr Inhalt teilte sich auf in den anterioren Bereich mit immaturren Oocyten und den posterioren Bereich mit reifen, primären Oocyten. Im Vergleich hierzu waren Ovarien aus paarungsunerfahrenen Weibchen wesentlich kleiner mit einer Länge von ca. 200 µm und einer Breite von ca. 50 µm (siehe Abb. 3.2, F). Ihr Inhalt bestand ausschließlich aus immaturren Oocyten (Shaw & Erasmus, 1981).

Die freigesetzten Reproduktionsorgane waren unempfindlich gegenüber leichter mechanischer Beanspruchung und konnten durch vorsichtiges Pipettieren angereichert und gereinigt werden. Die Effizienz der Isolation lag für Testes und mature Ovarien bei ca. 70 % der eingesetzten Würmer. Für immaturre Ovarien konnten Ausbeuten von bis zu 90 % erreicht werden.

Neben der Isolation von Testes und Ovarien wurde durch den enzymatischen Aufschluss der Wurmkrankassen auch der Zugriff auf andere Gewebe ermöglicht. Im Lysat maturer Weibchen befanden sich z. B. Fragmente des Vitellariums, welche allerdings häufig noch mit anderen

Gewebe wie Darm und Parenchym assoziiert waren (siehe Abb. 3.2 E). Darüber hinaus konnten aus paarungsunerfahrenen Weibchen Ootypen isoliert werden (Hahnel et al., 2013). Bei Männchen hingegen fanden sich vereinzelt Pseudoovarien im Medium (nicht gezeigt). Aus Würmern beider Geschlechter wurden zudem Darmfragmente unterschiedlicher Länge herausgelöst (nicht gezeigt).

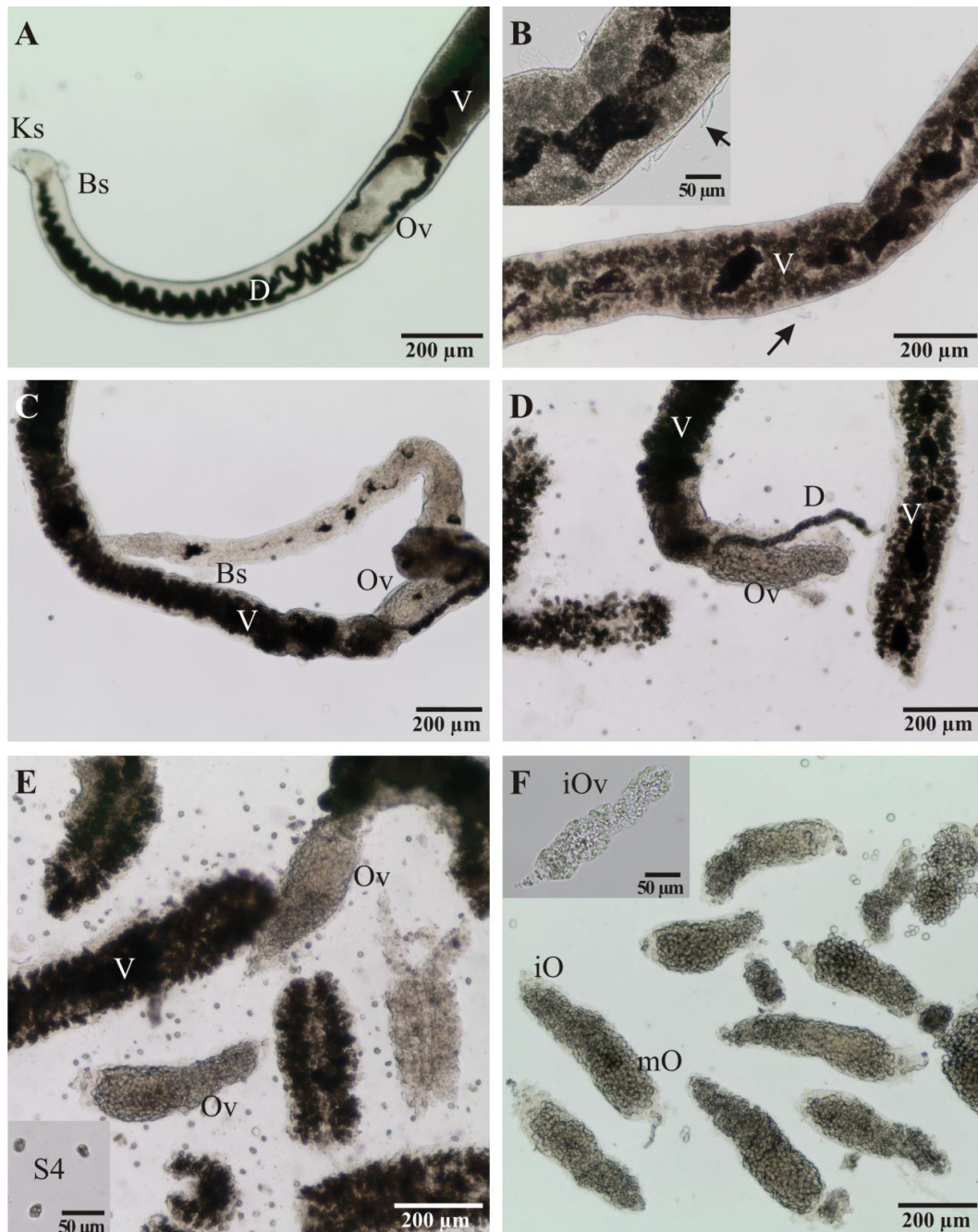
Neben vollständigen Organen bzw. Organfragmenten erhielt man durch den Aufschluss der Würmer auch Zugang zu unterschiedlichen Zelltypen wie Vitellinzellen (siehe Abb. 3.2 E). Mit Ausnahme von Testes und Ovarien wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings keine der oben erwähnten Strukturen, Gewebe, oder Zellen angereichert und weiterführend analysiert.



**Abb. 3.1: Testesisolation aus adulten *S. mansoni*-Männchen**

Adulte Männchen wurden mit einer Kombination aus Detergenzien- und Proteasebehandlung aufgeschlossen und die freigelegten Testes angereichert (**A-F**). Zunächst wurden die Würmer mit TS-Lösung inkubiert, was zu einer Ablösung des Teguments (**Pfeil**) führte (**A** unbehandeltes Männchen; **B** Männchen nach Detergenzienbehandlung). Hierauf folgte eine Inkubation der Männchen mit dem Enzym Elastase. Mit Fortschreiten der Behandlung begannen die Würmer ihre Form zu verlieren (**C**, 10 min.) und brachen häufig zwischen Kopf- und Nackenregion auf (**D**, 15 min.). Letztlich kam es durch die enzymatische und mechanische Wirkung zur Freisetzung der Testes ins Medium (**E**, 20 min.). Diese wurden mittels Pipette gesammelt und durch mehrmaliges Überführen in frisches Medium gereinigt (**F**, 25 min.). Nach gleichem Protokoll war auch eine Isolation von Testes aus paarungsunerfahrenen Männchen möglich. [**Te**: Testes; **Ks**: Kopfsaugnapf; **Bs**: Bauchsaugnapf].

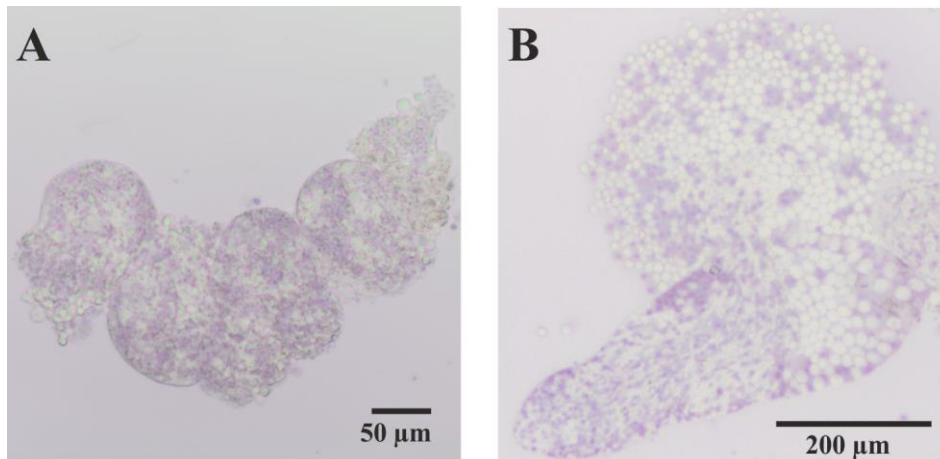




**Abb. 3.2: Ovariolation aus adulten *S. mansoni*-Weibchen**

Adulte, paarungserfahrene Weibchen wurden mit einer Kombination aus Detergenzien- und Proteasebehandlung aufgeschlossen und die freigelegten Ovarien angereichert (A-F). Zunächst wurden die Würmer mit TS-Lösung inkubiert, was zu einer Ablösung des Teguments (Pfeil) führte (A, unbehandeltes Weibchen; B, Weibchen nach Detergenzienbehandlung). Hierauf folgte eine Inkubation der Weibchen mit dem Enzym Elastase. Mit Fortschreiten der Behandlung begannen die Würmer ihre Form zu verlieren (C, 10 min.) und zu fragmentieren (D, 15 min.). Letztlich kam es durch die enzymatische und mechanische Wirkung zur Freisetzung der Ovarien ins Medium (E, 20 min.). Diese wurden mittels Pipette gesammelt und durch mehrmaliges Überführen in frisches Medium gereinigt (F, 25 min.). Nach gleichem Protokoll war auch eine Isolation von Ovarien aus immaturren, paarungsunerfahrenen Weibchen möglich (F). [Ov: Ovar; iOv: immatures Ovar; iO: immature Oocyten; mO: mature Oocyten; V: Vitellarium; S4: S4-Zellen; Ks: Kopfsaugnapf; Bs: Bauchsaugnapf; D: Darm]

Um Hinweise auf den Zustand der Zellen aus Testes und Ovarien zu erhalten, wurden Gonaden direkt nach der Isolation mit Trypanblau (Sigma Aldrich) gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Organe enthielten eine Mischung lebender und toter Zellen, wobei der Anteil letzterer bei ca. 30 % bis 50 % lag. Die lebenden Zellen waren homogen über die Organe verteilt ohne eine Präferenz für einen bestimmten Organbereich zu zeigen (siehe Abb. 3.3).



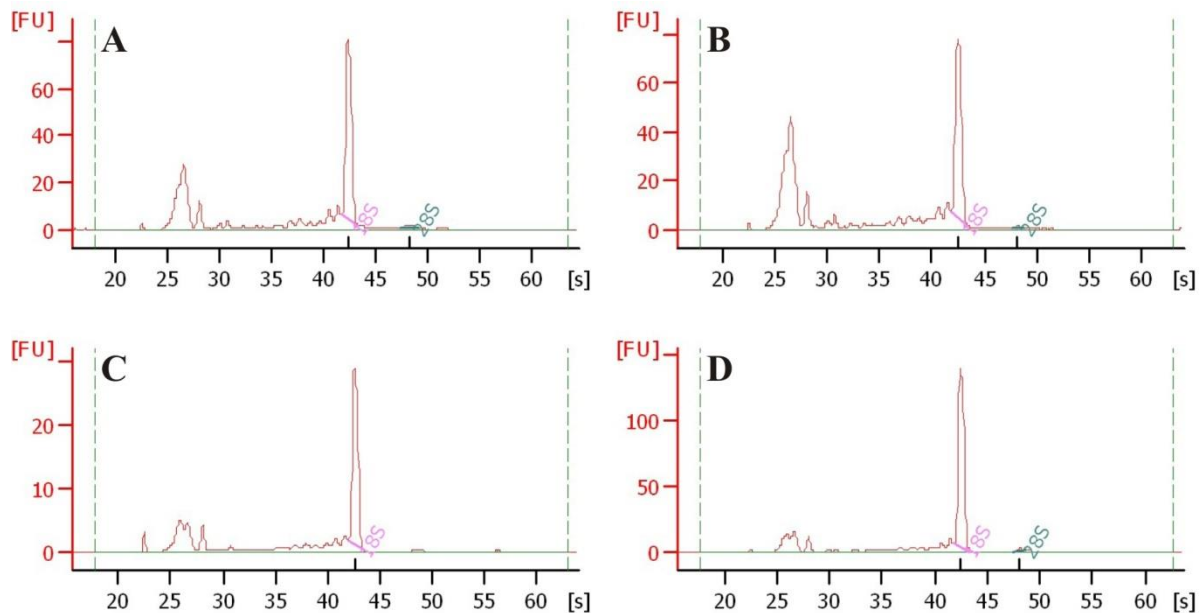
**Abb. 3.3: Vitalitätsfärbung isolierter Gonaden aus adulten *S. mansoni***

Testis (A) und Ovar (B) paarungserfahrener *S. mansoni* wurden im Anschluss an die Isolation mit Trypanblau gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht, um Hinweise auf die Vitalität der Zellen zu erhalten.

#### 3.1.2 RNA-Isolation aus isolierten Testes und Ovarien

Nachdem über Trypanblau-Färbung gezeigt werden konnte, dass ein Anteil von über 50 % der Zellen isolierter Testes und Ovarien vital waren, wurde Gesamt-RNA aus den Reproduktionsorganen extrahiert. Zur Kontrolle der Qualität und Bestimmung der Quantität wurde Gesamt-RNA aus Organen mit dem Agilent BioAnalyzer überprüft und mit Gesamt-RNA aus adulten Männchen und Weibchen verglichen. In allen Fällen zeigten die erhaltenen Elektropherogramme ein charakteristisches Muster im Laufbereich der 18S rRNA (siehe Abb. 3.4). Die 28S rRNA konnte aufgrund der für *S. mansoni* beschriebenen Prozessierung (van Keulen et al. 1985; van Keulen et al. 1991) weder in Gesamt-RNA aus Organen noch aus Adulten detektiert werden. Daher konnten auch keine RIN-Werte (RNA-Integritätsnummer) als weitere Indikatoren für die Qualität der RNA-Proben ermittelt werden (Mueller et al., 2004). Quantitativ konnten aus Testes paarungserfahrener und -unerfahrener Männchen 8 ng

bzw. 7 ng RNA je Organ extrahiert werden. Bei Weibchen kommt es abhängig vom Paarungsstatus zu größeren Unterschieden. Ein matures Ovar enthält ca. 26 ng RNA, während der RNA-Gehalt eines Ovars aus immaturren Weibchen bei ca. 0,8 ng liegt. Im Vergleich hierzu liegen die Gesamtausbeuten für RNA aus Männchen bei ca. 750 ng und bei Weibchen zwischen ca. 140 ng und ca. 700 ng abhängig vom Paarungsstatus. Insgesamt zeigten die BioAnalyzer-Daten, dass RNA aus Organen und Adulten qualitativ vergleichbar ist sowie in ausreichender Menge für molekularbiologische Anwendungen aus Testes und Ovarien extrahiert werden kann (siehe Tab. 3.1).



**Abb. 3.4: Qualitative Analyse extrahierter Gesamt-RNA aus Adulten und Gonaden**

Um Hinweise auf die RNA-Qualität und den RNA-Gehalt isolierter Gonaden zu erhalten, wurde Gesamt-RNA aus Testes und Ovarien mit Hilfe des BioAnalyzers kapillarelektrophoretisch analysiert und mit extrahierter Gesamt-RNA aus Adulten verglichen. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Elektropherogramme von RNA-Präparationen paarungserfahrener Männchen (A) und Weibchen (B) sowie Testes (C) und Ovarien (D). In allen Fällen ist die 18S rRNA als dominanter Ausschlag zu erkennen. [FU: Fluoreszenz-Einheit; s: Laufzeit in sec.]

**Tab. 3.1: Qualitative Analyse extrahierter Gesamt-RNA aus Adulten und Gonaden**

Paarungsunerfahren				Paarungserfahren			
Te	Ov	♂	♀	Te	Ov	♂	♀
7 ng	0,8 ng	~750 ng	140 ng	8 ng	26 ng	~750 ng	700 ng

Um Hinweise auf die RNA-Qualität und den RNA-Gehalt isolierter Gonaden zu erhalten, wurde Gesamt-RNA aus Testes und Ovarien mit Hilfe des BioAnalyzers kapillarelektrophoretisch analysiert und mit extrahierter Gesamt-RNA aus Adulten verglichen. Die Tabelle 3.1 enthält den gemittelten RNA-Gehalt (ng) je Organ (Testis: **Te**; Ovar: **Ov**) aus **paarungserfahrenen** und **-unerfahrenen** Adulten beider Geschlechter als auch den RNA-Gehalt einzelner adulter Würmer (Männchen: ♂; Weibchen: ♀) des jeweiligen Paarungsstatus.

### 3.1.3 Gonadenspezifische RT-PCRs

RNA aus Testes und Ovarien paarungserfahrener Würmer wurde zur cDNA-Synthese verwendet und in nachfolgenden RT-PCRs auf die Transkription ausgewählter Gene untersucht (siehe Tab. 3.2). Hierzu wurden Gene ausgewählt, deren Expression in den Gonaden adulter Schistosomen bereits bekannt war, aber auch solche für die bisher keine Lokalisierungsdaten vorlagen.

Mittels RT-PCR konnten Transkripte der kleinen GTPase SmRho1 und der zellulären Tyrosinkinase SmTK6 in Testes und Ovarien detektiert werden, was sich mit den Ergebnissen bereits publizierter *in situ*-Hybridisierungen deckt (Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2010a). Zu den Genen, deren Transkription in Testes und Ovarien nachgewiesen werden konnten, gehören weiterhin die Proteindisulfidisomerase SmpDI (Finken et al., 1994) und die katalytische Untereinheit der Calcium-abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin SmCNA (Mecozzi et al., 2000; Knobloch et al., 2004). In früheren Studien wurden über *in situ*-Hybridisierungen und Immunlokalisationen unter anderem die Testes nicht aber das Ovar als Expressionsort beider Gene identifiziert. Im Gegensatz dazu war für die Rezeptortyrosinkinase SmVKR1 (Vicogne et al., 2003), das Immunophilin FKBP12 (Rossi et al., 2002; Knobloch et al., 2004), den TGFβ-Rezeptor SmTβR-1 (Knobloch et al., 2004) und das VASA-like Gen SmVgl 1 (Skinner et al., 2012) bereits eine Expression im Ovar bekannt. Über organspezifische RT-PCRs konnten zusätzlich Transkripte in den Testes nachgewiesen werden. Eine Transkription in beiden Gonaden wurde außerdem für die Permease Untereinheit SmSPRM1hc (Krautz-Peterson et al., 2007), das *heat shock* Protein SmHSP 70

(Neumann et al., 1992, Wippersteg et al., 2002) sowie eine potentielle Glykosyltransferase SmOGT1 (Smp\_046930) gezeigt. Über eine Aktivität dieser Gene in den Reproduktionsorganen von *S. mansoni* war bisher nichts bekannt.

Als testesspezifisch transkribiert in Bezug auf die Gonaden stellten sich ferner das Aquaporin SmAQP (Faghiri et al., 2010), ein potentielles axonemales Dynein SmAxDyn (Smp\_167040) sowie ein Speedy/Ringo Homolog SmRingo A (Smp\_170320) heraus. SmAQP war bisher über Immunlokalisation ausschließlich im Tegument nachgewiesen worden (Faghiri et al. 2010). Zu SmAxDyn sowie SmRingo A gab es in Schistosomen bislang noch keine Untersuchungen. Allerdings ist aus anderen Organismen bekannt, dass axonemale Dyneine als Bestandteile von Cillien und Speedy/Ringo Proteine als Regulatoren des Zellzyklus u.a. in die Spermatogenese involviert sind (Fatima, 2011; Cheng et al., 2005).

Ausschließlich im Ovar konnten hingegen Transkripte eines Gens detektiert werden, welches ein potentielles *egg shell precursor* Protein (Smp\_000430) kodiert. Dies deckt sich mit Lokalisationsstudien, bei denen Transkripte des Gens über *in situ*-Hybridisierungen neben dem Vitellarium auch im Ovar nachgewiesen wurden (Buro et al., 2013).

Nicht in den Gonaden transkribiert werden den durchgeführten RT-PCRs zufolge der Glucose-Transporter SmSGTP4 (Krautz-Peterson et al., 2010b) und die Phosphodiesterase SmNPP-5 (Bhardwaj et al., 2011). Beide Proteine sind über Immunlokalisationen im Tegument detektiert worden.

Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit der Studie von Nawaratna et al. (2011) zeigte für die Gene SmTK6, SmVKR1, SmCNA, SmFKBP12, SmVlg1 und SmHSP70 Übereinstimmungen bezüglich einer Transkription im Ovar. Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs befindet sich in Tab. 3.2. Darüber hinaus ist in Abbildung 3.5 ein repräsentatives Agarosegel der hier durchgeführten gonadenspezifischen RT-PCRs dargestellt.

Tab. 3.2: Zusammenfassung der gonadenspezifischen RT-PCRs

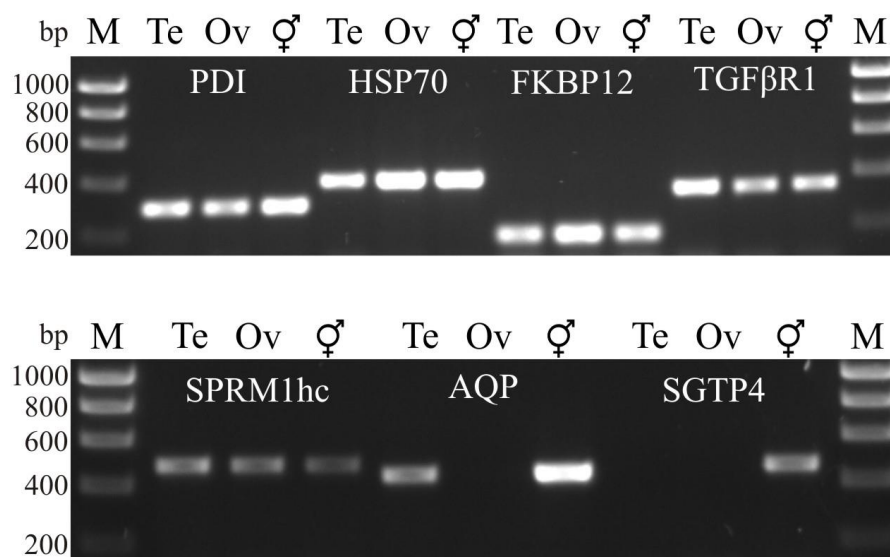
Gen	RT-PCRs		Bisherige Studien in adulten <i>S. mansoni</i>	
	Te	Ov	Lokalisation	Referenz
SmRho1	+	+	ISH: Te, Ov, V, P	Quack et al., (2009)
SmTK6	+	+	ISH/LMD: Te, Ov, V, P	Beckmann et al., (2010)
SmPDI	+	+	ISH/IL: Te, P, G	Finken et al., (1994)
SmCNA	+	+	IL/LMD: Te, Ov, P, T	Knobloch et al., (2004)
SmVKR1	+	+	ISH/LMD: Ov, P	Vicogne et al., (2003)
SmFKBP12	+	+	ISH/ IL/LMD: Ov, V, P, T	Knobloch et al., (2004)
SmTGFβR-1	+	+	ISH: Ov, V, P	Knobloch et al., (2004)
SmVgl1	+	+	WISH/LMD: Ov	Skinner et al., (2012)
SmSPRM1hc	+	+	IL: T, P	Krautz-Peterson et al., (2007)
SmOGT1	+	+	-	-
SmHSP 70	+	+	LMD: Ov, P, T	Wippersteg et al., (2002)*
SmAQP	+	-	IL: T	Faghiri et al., (2010)
SmAxDyn	+	-	-	-
SmRingo A	+	-	-	-
<i>egg shell precursor</i>	-	+	ISH: Ov, V	Buro et al., (2013)
SmSGTP4	-	-	IL: T	Krautz-Peterson et al., (2010)
SmNPP-5	-	-	IL: T	Bhardwaj et al., (2011)

Ergebnisse zur Untersuchung der Expression ausgewählter Gene in Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni* über gonadenspezifische RT-PCRs. Für 11 der 17 der untersuchten Gene konnten Transkripte in beiden Organen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden vier Gene identifiziert, die in Bezug auf die Gonaden eine testes- bzw. ovarspezifische Transkription aufwiesen. Zwei weitere Gene zeigen keine transkriptionelle Aktivität in den untersuchten Reproduktionsorganen. Die vorliegenden Resultate bestätigen und/oder erweitern bisherige, über *in situ*-Hybridisierungen (ISH), *whole mount in situ*-Hybridisierungen (WISH), Immunlokalisationen (IL) und Lasermikrodissektion (LMD; Nawaratna et al., 2011\*\*) erzielte Ergebnisse früherer Lokalisationsstudien. [Te: Testes; Ov: Ovar; V: Vitellarium; P: Parenchym; T: Tegment ; G: Gastrodermis].

- Fortsetzung nächste Seite -

\* Die hier aufgeführte Lokalisation der SmHSP70-Expression von Wippersteg et al. (2002) beruht auf einer transienten Transformation adulter *S. mansoni*-Männchen mit GFP-Reportergenkonstrukten unter der Kontrolle des SmHSP70-Promoters.

\*\* Die hier aufgeführten Ergebnisse der Studie von Nawaratna et al. (2011) beruhen auf quantitativen Erhebungen zum Transkriptionsprofil verschiedener Organe im Vergleich zum Gesamtwurm mittels Microarrays (siehe 4.1).



**Abb. 3.5: Gonadenspezifische RT-PCRs zu ausgewählten Genen**

Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Agarosegel der durchgeführten gonadenspezifischen RT-PCRs. Gesamt-RNA aus Testes (**Te**) und Ovarien (**Ov**) paarungserfahrener *S. mansoni* wurde isoliert und zur cDNA-Synthese verwendet. Als Positivkontrolle diente cDNA aus Pärchen (♂♀). Die nachfolgenden PCR-Reaktionen zur Amplifikation von Sm**PDI**, Sm**HSP70**, Sm**FKBP12**, Sm**TGFβR1**, Sm**SPRM1hc**, Sm**AQP** und Sm**SGTP4** erfolgten mit 1:40 Verdünnungen der eingesetzten cDNAs. Je 16 µl Reaktionsansatz wurden auf das 1%ige Agarosegel (Ethidiumbromidfärbung) aufgetragen. Größenstandard (**M**): HyperLadderI (Bioline).

## **3.2 Lokalisationsstudien und initiale Transkriptionsanalysen zu Transmembranrezeptoren adulter *S. mansoni***

Auf der Suche nach alternativen Ansatzpunkten zur Bekämpfung der Schistosomiasis ist ein detailliertes Wissen der Entwicklungsbiologie des Parasiten notwendig. Aus diesem Grunde ist u.a. die einzigartige Reproduktionsbiologie adulter *S. mansoni* in den Fokus der Grundlagenforschung gerückt. Eine molekularbiologische Betrachtung der paarungsinduzierten Reifung des Weibchens offenbarte die Beteiligung verschiedener Signalwege an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen in den Reproduktionsorganen adulter *S. mansoni*. Trotz stetiger Fortschritte sind diese gonadenspezifischen Signaltransduktionsprozesse derzeit noch nicht in ihrer Gänze verstanden, da wichtige Komponenten noch unbekannt sind. Hierzu zählen u.a. Transmembranrezeptoren, die aufgrund ihrer Rolle als Vermittler zwischen inter- und intrazellulärer Kommunikation Schlüsselfunktionen in Signalprozessen einnehmen. Ein wichtiges Ziel ist es daher, aus dem breiten Repertoire an Transmembranrezeptoren aus *S. mansoni* (Berriman et al., 2009; Hahnel, 2010; Andrade et al., 2011; Avelar et al., 2011; Zamanian, et al., 2011) Kandidaten zu finden, die möglicherweise von reproduktionsbiologischer Relevanz für den Parasiten sind.

Aus diesem Grunde wurde die im ersten Teil der Arbeit vorgestellte Isolationsmethode (siehe 3.1) im Folgenden dazu genutzt, die Transkription ausgewählter Transmembranrezeptoren in Testes und Ovarien adulter *S. mansoni* über gonadenspezifische RT-PCRs zu untersuchen (siehe 3.2.1). Hieran schlossen sich für einige der unter 3.2.1 untersuchten Rezeptoren *in situ*-Hybridisierungen an, um die Ergebnisse der RT-PCRs zu verifizieren und weitere transkriptionell aktive Gewebe zu identifizieren (siehe 3.2.2). Darüber hinaus folgten erste Untersuchungen zur paarungsabhängigen Transkription in adulten Schistosomen sowie in Testes und Ovarien mittels qPCR (siehe 3.2.3).

### **3.2.1 Lokalisation von Rezeptoren über Organ-spezifische RT-PCRs**

Die in dieser Arbeit etablierte gonadenspezifische RT-PCR (siehe 3.1) wurde im Folgenden angewendet, um die Transkription von insgesamt 15 Transmembranrezeptoren unterschiedlicher Familien in den Testes und Ovarien adulter *S. mansoni* nachzuweisen. Die Kandidaten wurden dabei nach unterschiedlichen Kriterien ausgewählt. Zunächst wurden solche Gene betrachtet, für die bereits erste Hinweise auf eine Expression in den Reproduktionsorganen von Schistosomen vorlagen. Hierzu zählen das transmembrane Mucin SmTmMuc1, ein Interaktionspartner von SmTK6 (Beckmann et al., 2011) und der potentielle

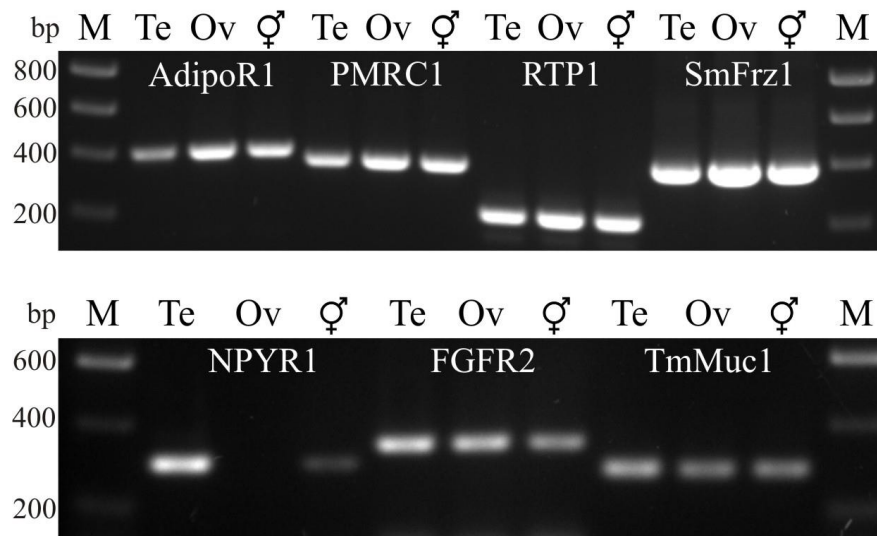


Allatostatin-Rezeptor SmPAR1. Transkripte beider Gene wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit (Hahnel, 2010) über erste *in situ*-Hybridisierungen im Ovar maturer Weibchen lokalisiert. Dies konnte über gonadenspezifische RT-PCRs bestätigt und zusätzlich für die Testes erweitert werden.

Weiterhin war der Focus auf Rezeptoren gerichtet, die aufgrund ihrer Homologie zu entwicklungs- und reproduktionsrelevanten Genen anderer Organismen möglicherweise auch in Schistosomen eine vergleichbare Bedeutung einnehmen. Als aussichtsreiche Kandidaten wurden unter anderem vier Vertreter der *Frizzled*-Familie und zwei FGFR-Homologe untersucht. Hierbei konnten Transkripte von SmFrz1 (Smp\_118970/173940) sowie SmFGFR1 und SmFGFR2 in beiden Gonaden detektiert werden. Für letzteren war bereits eine Lokalisation in den Testes adulter Männchen bekannt (Collins et al., 2013). Die weiteren *Frizzled*-Rezeptoren, SmFrz2 (Smp\_155340), SmFrz3 (Smp\_139180) und SmFrz4 (Smp\_174350) werden hingegen den vorliegenden RT-PCR Ergebnissen zufolge nicht in den Gonaden transkribiert.

Weitere Rezeptoren, deren Transkription in Testes und Ovarien nachgewiesen wurde, waren zwei potentielle Adiponektin-Rezeptoren AdipoR1 (Smp\_045410) und AdipoR2 (Smp\_045420), eine Rezeptortyrosinphosphatase SmRTP1 (Smp\_152750) sowie zwei Rezeptoren mit Homologie zu Progesteron-bindenden Molekülen, dem *membrane progestin receptor* SmProgestinR1 (Smp\_086190) und dem *progesterone membrane receptor component* SmPMRC1 (Smp\_093700). Transkripte des potentiellen Neuropeptid Y Rezeptors SmNPYR1 (Smp\_132220/080820) wurden hingegen nur in den Testes detektiert.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit der Studie von Nawaratna et al. (2011) zeigte für die Gene SmFrz1 und SmAdipoR1 Übereinstimmungen bezüglich einer Transkription im Ovar. SmFGFR2 und SmNPYR1 erscheinen in den Daten von Nawaratna et al. in den Testes als transkriptionell hochreguliert im Vergleich zum restlichen Männchengewebe. SmRTP1 wird den Nawaratna et al.-Daten zufolge ebenfalls in beiden Organen transkribiert. Die Ergebnisse dieses Versuchsteils sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Darüber hinaus ist in Abbildung 3.6 ein repräsentatives Agarosegel der hier durchgeführten gonadenspezifischen RT-PCRs zu Rezeptorgenen dargestellt.



**Abb. 3.6: Gonadenspezifische RT-PCRs zu ausgewählten Transmembranrezeptoren**

Abbildung 3.5 zeigt ein repräsentatives Agarosegel der durchgeführten gonadenspezifischen RT-PCRs. Gesamt-RNA aus Testes (**Te**) und Ovarien (**Ov**) paarungserfahrener *S. mansoni* wurde isoliert und zur cDNA-Synthese verwendet. Als Positivkontrolle diente cDNA aus Pärchen (♂♀). Die nachfolgenden PCR-Reaktionen zur Amplifikation von Sm**AdipoR1**, Sm**PMRC1**, Sm**RTP1**, Sm**Frz1**, Sm**NPYR1**, Sm**FGFR2** und Sm**TmMuc1** erfolgten mit 1:40 Verdünnungen der eingesetzten cDNAs. Je 16 µl Reaktionsansatz wurden auf das 1%ige Agarosegel (Ethidiumbromidfärbung) aufgetragen. Größenstandard (**M**): HyperLadderI (Bioline).

**Tab. 3.3: Zusammenfassung der Lokalisationsstudien zu ausgewählten Rezeptoren**

Gen	RT-PCRs (s. 3.2.1)		<i>In situ</i> - Hybridisierungen (s. 3.2.2)	Bisherige Studien in adulten <i>S. mansoni</i>	
	Te	Ov		Lokalisation	Referenz
SmTmMuc1	+	+	Te, Ov, V, P	ISH: Ov	Hahnel, (2010)
SmPAR1	+	+	Te, Ov, V	ISH: Ov	Hahnel, (2010)
SmFrz1	+	+	Te, Ov	LMD: Ov	Nawaratna et al., (2011)*
SmFrz2	-	-	n.d.	-	-
SmFrz3	-	-	n.d.	-	-
SmFrz4	-	-	n.d.	-	-
SmFGFR1	+	+	kein Ergebnis	-	-
SmFGFR2	+	+	Te, Ov	WISH/LM: Te, P	Collins et al. (2013); Nawaratna et al., (2011)*
SmAdipoR1	+	+	n.d.	LMD: Ov	Nawaratna et al., (2011)*
SmAdipoR2	+	+	n.d.	-	-
SmRTP1	+	+	n.d.	LMD: Te, Ov	Nawaratna et al., (2011)*
SmProgesterinR1	+	+	n.d.	-	-
SmPMRC1	+	+	n.d.	-	-
SmNPYR1	+	-	Te	LMD: Te	Nawaratna et al., (2011)*

Aufgeführt sind die Ergebnisse aus gonadenspezifischen RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen zur Expression ausgewählter Rezeptorgene in adulten *S. mansoni*. Für 10 der 14 untersuchten Rezeptoren konnten über RT-PCRs Transkripte in Testes und Ovarien nachgewiesen werden. Ein weiterer Rezeptor, SmNPYR1 wurde im Hinblick auf die Gonaden nur in Testes transkribiert. SmFrz2-, SmFrz3- und SmFrz4-Transkripte wurden hingegen in keinem der beiden Reproduktionsorgane detektiert. Die für sechs Rezeptorgene durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen bestätigten in fünf Fällen die Ergebnisse der RT-PCRs bezüglich einer Transkription in den Gonaden (SmTmMuc1, SmPAR1, SmFrz1, SmFGFR2, SmNPYR1). Lokalisationsstudien zu SmFGFR1 führten zu keinen Ergebnissen.

- Fortsetzung nächste Seite -

Die vorliegenden Resultate bestätigen und/oder erweitern bisherige, über *in situ*-Hybridisierungen (**ISH**), *whole mount in situ*-Hybridisierungen (**WISH**) und Lasermikrodissektion (**LMD**) erzielte Ergebnisse früherer Lokalisationsstudien. [**Te**: Testes; **Ov**: Ovar; **V**: Vitellarium; **P**: Parenchym; **n.d.**: nicht durchgeführt].

\* Die hier aufgeführten Ergebnisse der Studie von Nawaratna et al. (2011) beruhen auf quantitativen Erhebungen zum Transkriptionsprofil verschiedener Organe im Vergleich zum Gesamtwurm mittels Microarrays (siehe 4.1).

#### **3.2.2 Verifizierung der Lokalisation ausgewählter Rezeptoren über *in situ*-Hybridisierung**

Nachdem über gonadenspezifische RT-PCRs eine Transkription verschiedener Transmembranrezeptoren in Testes und Ovarien adulter Schistosomen nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2.1), wurden für sechs ausgewählte Kandidaten *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Ziel war es die Ergebnisse der RT-PCR zu verifizieren und weitere Gewebe in adulten Schistosomen zu identifizieren, in denen die Rezeptoren transkribiert werden.

Hierzu wurden gegen Transkripte von SmTmMuc1, SmPAR1, SmFGFR1, SmFGFR2, SmFrz1 und SmNPYR1 gerichtete *antisense*-Sonden auf Gewebeschnitte gepaarter Schistosomen hybridisiert. Für SmTmMuc1 (siehe Abb. 3.7, **A-C**) und SmPAR1 (siehe Abb. 3.7, **D, E**) konnten Transkripte in den Testes von Männchen, dem Ovar und dem Vitellarium von Weibchen und im Falle des Mucins im Parenchym beider Geschlechter nachgewiesen werden. Eine Transkription von SmFrz1 (siehe Abb. 3.7, **F-H**) und SmFGFR2 (siehe Abb. 3.7, **I-K**) wurde in Testes und Ovar lokalisiert. Eine Lokalisation von SmNPYR1-Transkripten (siehe Abb. 3.7, **L-N**) beschränkte sich auf die Testes. Die als Kontrolle verwendeten *sense*-Sonden lieferten in keinem Fall Signale (siehe Abb. 3.7, **O-Q**). *In situ*-Hybridisierungen zu SmFGFR1 führten trotz mehrfacher Wiederholung zu keinen Ergebnissen (nicht gezeigt). Hiervon abgesehen stimmten die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen mit den durchgeführten RT-PCRs bezüglich der Transkription untersuchter Rezeptoren in den Gonaden überein (siehe Tab. 3.3).

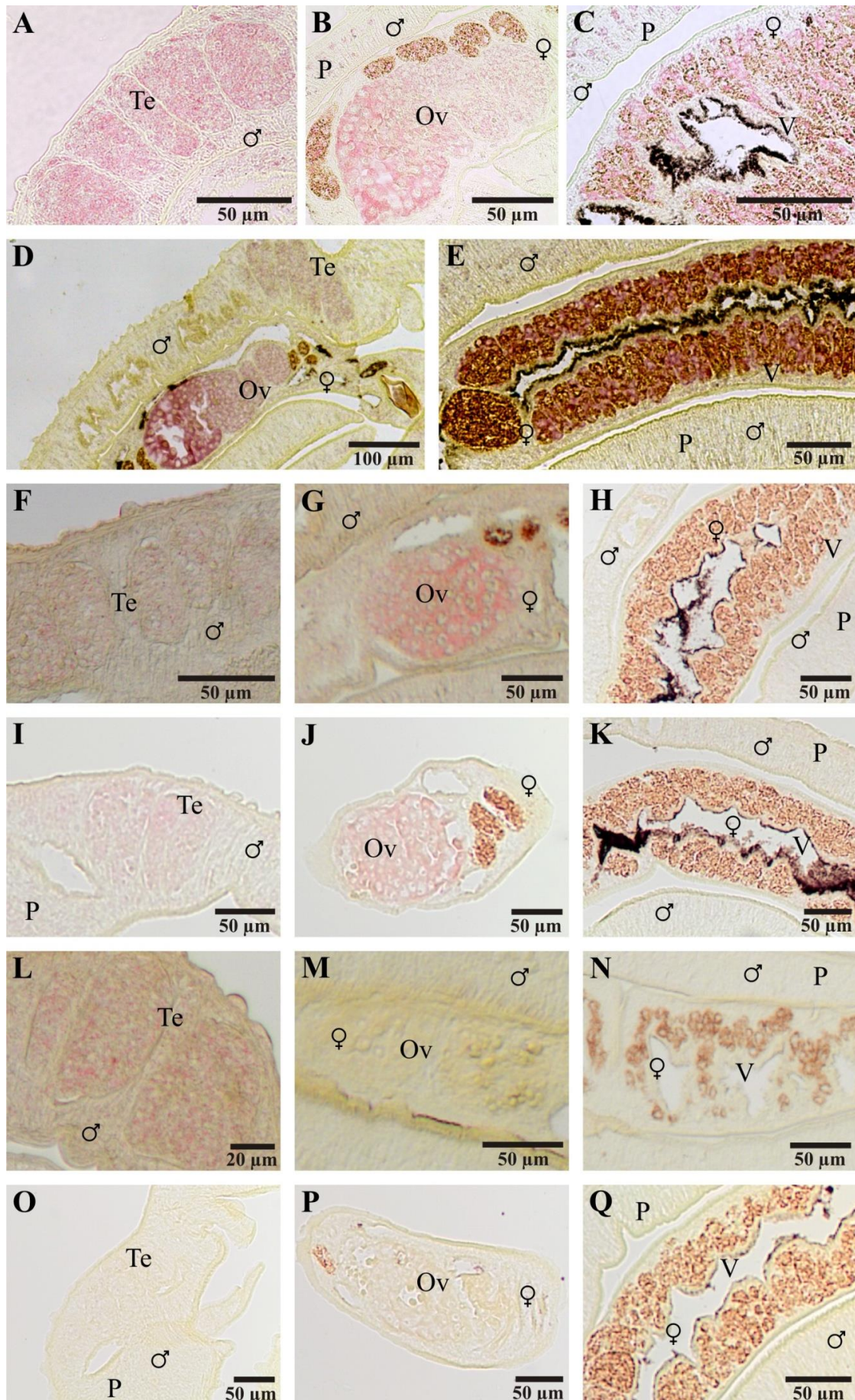


Abb. 3.7: *In situ*-Lokalisation ausgewählter Rezeptoren auf Gewebeschnitten adulter *S. mansoni*

#### **Erläuterung zu Abb. 3.7:**

Der Nachweis der Transkriptionsorte ausgewählter Rezeptoren erfolgte über *in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen *antisense*-Sonden auf Gewebeschnitte adulter *S. mansoni* Pärchen. Transkripte von SmTmMuc1 (**A-C**) und SmPAR1 (**D, E**) wurden in Testes, Ovarien und Vitellarium detektiert. Darüber hinaus waren für SmTmMuc1 auch positive Signale im Parenchym beider Geschlechter zu erkennen. Transkripte von SmFrz1 (**F-H**) und SmFGFR2 (**I-K**) konnten in Testes und Ovarien detektiert werden. Für SmNPYR1 beschränkte sich eine Lokalisation auf die Testes (**L-M**). Die *sense*-Kontrollen (**O-Q**) zeigten keine Farbreaktionen. Die Aufnahmen erfolgten an einem Olympus-CX-21 Mikroskop unter Verwendung einer SC30 Kamera (Olympus) und der *cellSens Dimension* Software (Olympus). [**Te**: Testes; **Ov**: Ovar; **V**: Vitellarium; **P**: Parenchym; ♂: Männchen; ♀: Weibchen]

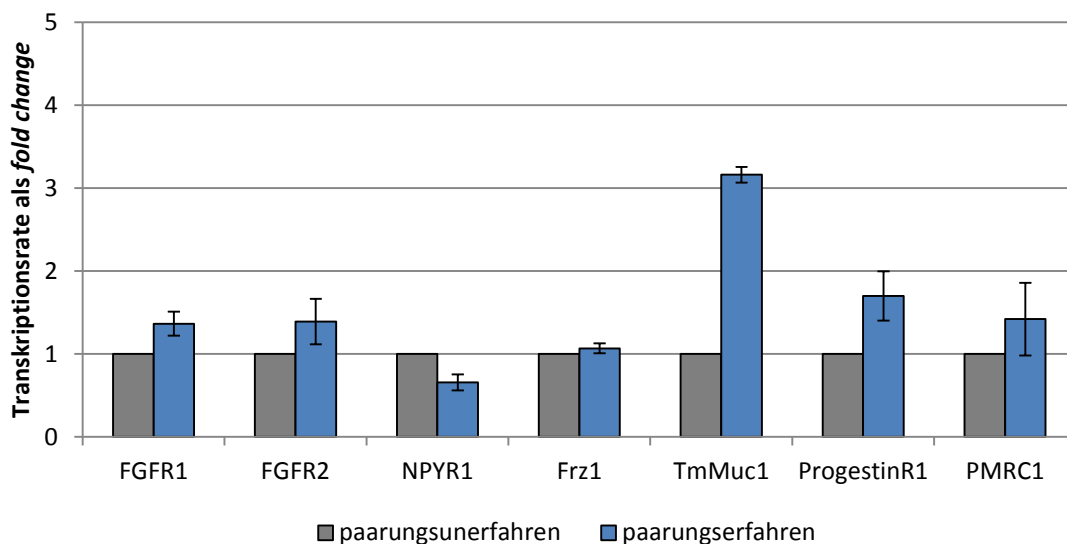
#### **3.2.3 Quantifizierung der Transkription ausgewählter Rezeptoren über qPCR**

Um erste Hinweise auf die Transkriptionsmuster sieben ausgewählter Rezeptoren in adulten Schistosomen zu erhalten, wurden qPCRs mit cDNAs aus paarungsunerfahrenen und -erfahrenen *S. mansoni* sowie deren Gonaden durchgeführt. Eine Betrachtung der Transkriptionsraten in Männchen zeigte für die meisten Rezeptoren eine erhöhte Transkription in paarungserfahrenen Männchen im Vergleich zu -unerfahrenen Männchen. Die größten Differenzen konnten hierbei für SmTmMuc1 detektiert werden, gefolgt von SmProgesterinR1, SmPMRC1 sowie beiden FGFRs. SmFrz1 offenbarte keine transkriptionellen Unterschiede wohingegen SmNPYR1 auf ganze Männchen bezogen tendenziell in paarungsunerfahrenen *S. mansoni* stärker transkribiert wurde (siehe Abb. 3.8). Auf Organebene zeigte sich, dass alle ausgewählten Rezeptoren in Testes aus paarungserfahrenen Männchen stärker transkribiert wurden. Die beiden Rezeptoren SmNPYR1 und SmFrz1 wiesen hierbei die stärksten und SmFGFR1 die schwächsten Differenzen im Vergleich zu Testes aus paarungsunerfahrenen Männchen auf (siehe Abb. 3.9).

Bei einem Vergleich der Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptorgene in paarungsunerfahrenen und -erfahrenen Weibchen ließen sich ähnliche Tendenzen wie bei den Männchen erkennen. Fünf der Rezeptoren, SmTmMuc1, SmFGFR2, SmFGFR1, SmProgesterinR1 und SmPMRC1 wurden in aufsteigender Reihenfolge in paarungserfahrenen Weibchen stärker transkribiert als in solchen ohne Paarungserfahrung. SmFrz1 und SmNPYR1 erfuhren hingegen eine stärkere Transkription in paarungsunerfahrenen Weibchen (siehe Abb. 3.10). Die stärksten paarungsinduzierten Transkriptionsunterschiede konnten bei einem Vergleich von maturen und immaturen Ovarien detektiert werden. Transkripte der potentiellen Progesteron-bindenden Rezeptoren SmProgesterinR1 und SmPMRC1 waren in

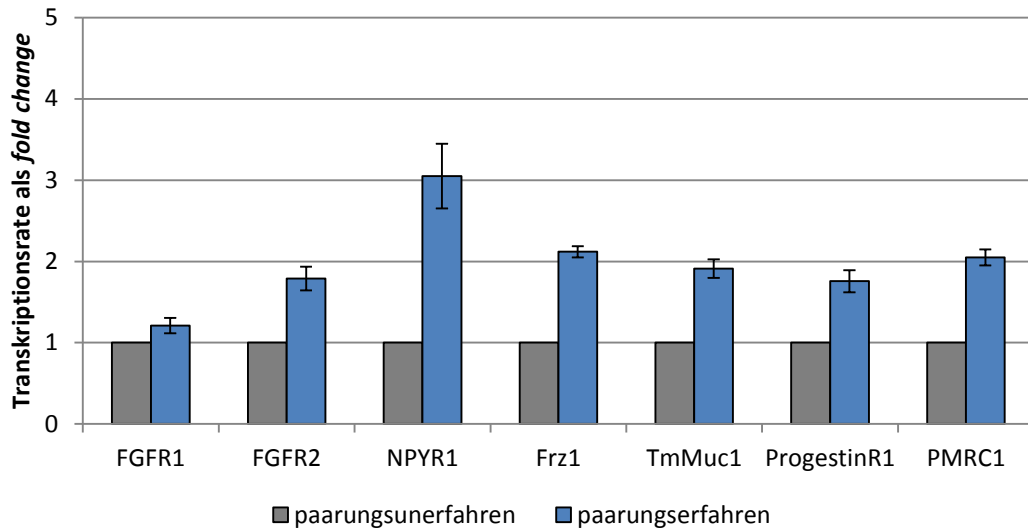
maturen Ovarien um das 4- bis 9-fache hochreguliert. Eine ähnliche Tendenz traf für den Rezeptor SmFrz1 zu, welcher in den untersuchten maturen Ovarien fast 6-fach stärker transkribiert wurde. Keine bzw. nur geringe Unterschiede bezüglich ihrer Transkriptionsraten in maturen und immaturen Ovarien zeigten hingegen SmFGFR1, SmFGFR2 sowie SmTmMuc1. SmNPYR1 konnte, wie bereits über RT-PCRs gezeigt, nicht im Ovar detektiert werden (siehe Abb. 3.11).

Zusammenfassend liefern die hier durchgeführten qPCRs erste Hinweise auf paarungsabhängige Transkriptionen einiger der hier untersuchten Rezeptoren sowohl bei Betrachtung ganzer Individuen als auch im Bezug auf die Gonaden. Weiterhin wird deutlich, dass Vergleiche von Transkriptionsraten auf Organebene in einigen Fällen Aussagen über paarungsabhängige Regulationsprozesse in Testes und Ovarien zulassen, die bei der Analyse ganzer Individuen verborgen bleiben würden (SmNPYR1, SmFrz1: vgl. Abb. 3.8 - 3.11).



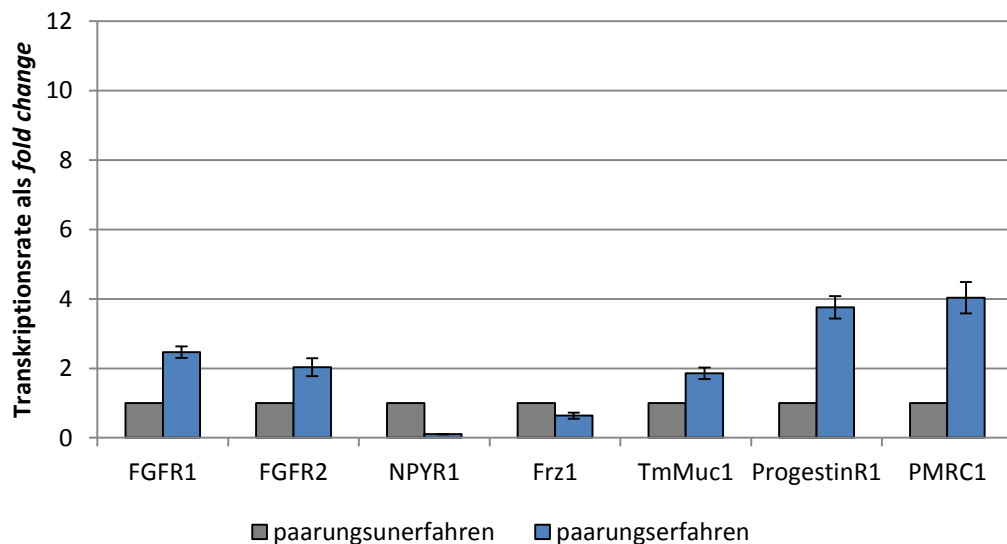
**Abb. 3.8: Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in adulten Männchen**

Bestimmung der Transkriptionsraten ausgewählter Transmembranrezeptoren in paarungsunserfahrenen (**grau**) und -erfahrenen (**blau**) *S. mansoni*-Männchen mittels qPCR. Angeführt von SmTmMuc1 zeigte die Mehrzahl untersuchter Rezeptoren (SmProgesterinR1, SmPMRC1, SmFGFR1, SmFGFR2) eine paarungsabhängige Zunahme der Transkription in adulten Männchen. SmFrz1 schien hingegen nicht durch die Paarung beeinflusst zu werden. SmNPYR1 Transkripte wurden hingegen stärker in paarungsunserfahrenen Männchen detektiert. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über eine relative Quantifizierung ( $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). Die Transkriptionsraten in paarungsunserfahrenen Männchen wurden auf einen *fold change*-Wert von 1 gesetzt. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ ).



**Abb. 3.9: Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in den Testes adulter Männchen**

Bestimmung der Transkriptionsraten ausgewählter Transmembranrezeptoren in den Testes paarungsun erfahrenen (**grau**) und -erfahrenen (**blau**) *S. mansoni*-Männchen mittels qPCR. Alle untersuchten Rezeptoren zeigten eine stärkere Transkription in Testes aus paarungserfahrenen Männchen (SmFrz1, SmPMRC1, SmTmMuc1, SmFGFR2, SmProgesterinR1, SmFGFR1), wobei SmNPYR1 am stärksten durch den Paarungskontakt beeinflusst wurde. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über eine relative Quantifizierung ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode). Die Transkriptionsraten in Testes paarungsun erfahrener Männchen wurden auf einen *fold change*-Wert von 1 gesetzt. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ ).

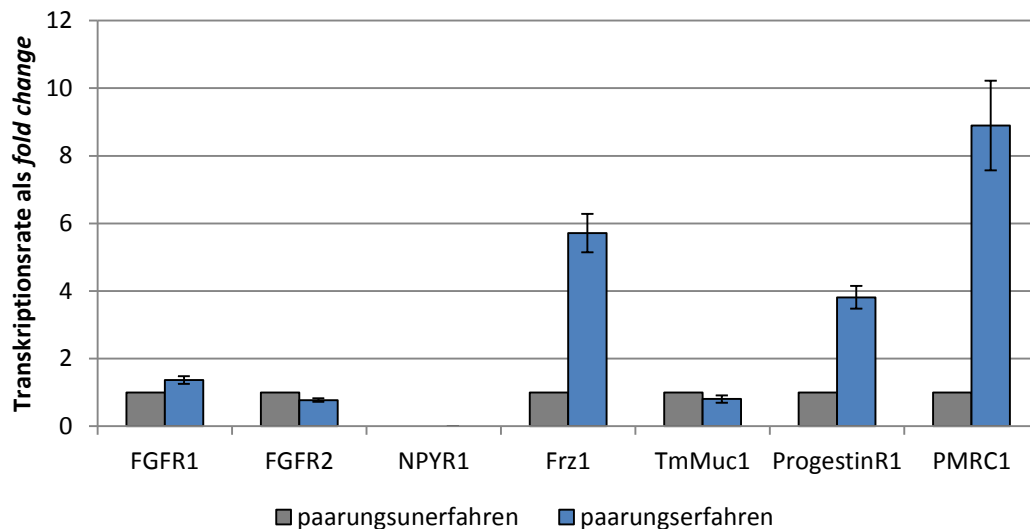


**Abb. 3.10: Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in adulten Weibchen**



**Erläuterung zu Abb. 3.10:**

Bestimmung der Transkriptionsraten ausgewählter Transmembranrezeptoren in paarungsunerfahrenen (**grau**) und -erfahrenen (**blau**) *S. mansoni*-Weibchen mittels qPCR. Die untersuchten Rezeptoren zeigten mehrheitlich eine stärkere Transkription in maturaen, paarungserfahrenen Weibchen (**SmPMRC1**, **SmProgestinR1**, **SmFGFR2**, **SmFGFR1**, **SmTmMuc1**). Die Transkriptionsraten von **SmNPYR1** und **SmFrz1** schienen hingegen negativ durch den Paarungskontakt beeinflusst zu werden. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über eine relative Quantifizierung ( $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). Die Transkriptionsraten in paarungsunerfahrenen Weibchen wurden auf einen *fold change*-Wert von 1 gesetzt. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ ).



**Abb. 3.11: Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in Ovarien adulter Weibchen**

Bestimmung der Transkriptionsraten ausgewählter Transmembranrezeptoren in Ovarien paarungsunerfahrener (**grau**) und -erfahrener (**blau**) *S. mansoni*-Weibchen mittels qPCR. Die Rezeptoren **SmPMRC1**, **SmFrz1** und **SmProgestinR1**, zeigten eine starke, paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptmenge in maturaen Ovarien. **SmFGFR1**, **SmFGFR2** und **SmTmMuc1** erschienen in ihrer Transkription unbeeinflusst durch die Paarung. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über eine relative Quantifizierung ( $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). Die Transkriptionsraten in paarungsunerfahrenen Weibchen wurden auf einen *fold change*-Wert von 1 gesetzt. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ ).

### 3.3 Weiterführende Charakterisierung ausgewählter Rezeptoren

Nachdem über gonadenspezifische RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen die Transkription verschiedener Transmembranrezeptoren in Reproduktionsorganen adulter *S. mansoni* nachgewiesen werden konnten, sowie erste qPCR-Analysen zum Einfluss der Paarung auf die Transkriptionsraten von Rezeptoren in paarungsunerfahrenen und -erfahrenen Würmern sowie deren Gonaden vorlagen (siehe 3.2), wurden sieben ausgewählte Kandidaten eingehender untersucht, um erste Hinweise auf deren mögliche Funktionen in adulten *S. mansoni* zu erhalten. Neben Sequenzanalysen wurden erste RNAi-Experimente und *in vitro*-Kulturversuche mit Inhibitoren oder Agonisten zur funktionellen Charakterisierung dieser Rezeptoren durchgeführt. Zu den ausgewählten Kandidaten gehörten das potentielle transmembrane Mucin SmTmMuc1 (siehe 3.3.1), der Neuropeptidrezeptor SmNPYR1 (siehe 3.3.2), das *Frizzled*-Homolog SmFrz1 (siehe 3.3.3), zwei FGF-Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 (siehe 3.3.4), sowie zwei potentielle Progesteron-bindende Rezeptoren SmProgestinR1 und SmPMRC1 (siehe 3.3.5).

#### 3.3.1 Charakterisierung des transmembranen Mucins SmTmMuc1 aus *S. mansoni*

Mucine sind langkettige und stark glykosylierte Proteine die sich aufgrund ihrer Struktur in sezernierte und transmembrane Mucine einteilen lassen. Letztere sind neben ihrer Beteiligung am Schutz von Epithelgeweben wichtige Komponenten verschiedener Signaltransduktionsprozesse. Hierbei nehmen sie ein breites Spektrum vielfältiger Funktionen ein. Diese reichen von der Detektion biochemischer Parameter in der zellulären Umgebung, der Interaktion mit RTKs und CTKs als (Co-)Rezeptoren und *scaffold*-Proteine, bis hin zu einer Beteiligung an der Regulation von Transkriptionsprozessen (Singh & Hollingsworth, 2006). Während einige Mitglieder dieser Proteinfamilie wie die humanen Transmembran-Mucine MUC-1 und MUC-4 aufgrund ihrer Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Tumore bereits detailliert charakterisiert wurden (Singh & Hollingsworth, 2006), ist die Funktion von transmembranen Mucinen als Signalmoleküle in vielzelligen Invertebraten weitgehend unbekannt.

In Schistosomen konnte bisher neben einigen sekretierten Mucinen (Mentrath et al., 1995; Roger et al., 2008) nur ein einziges transmembranes Mucin nachgewiesen werden. Das als SmTmMuc1 bezeichnete Mucin wurde über ein Y2H-Screening als *upstream*-Interaktionspartner der Src-Kinase SmTK6 identifiziert (Beckmann 2008, Beckmann et al.,

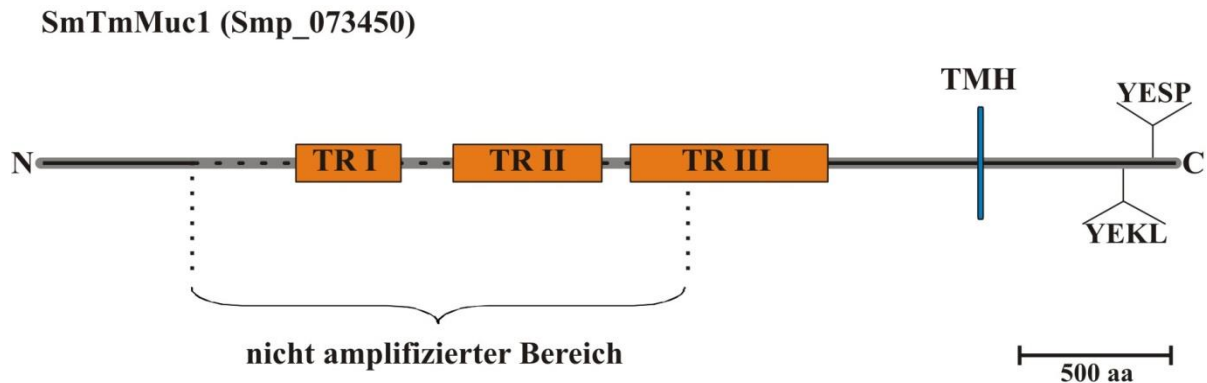
2011). Direkte Protein-Interaktionsstudien im Y2H-System zeigten, dass eine Bindung beider Proteine über die SH2-Domäne von SmTK6 und einem konservierten Src-Bindungsmotiv im intrazellulären Bereich des Mucins erfolgt (Hahnel, 2010). Nachdem in der vorliegenden Arbeit eine Co-Lokalisation von SmTmMuc1 mit SmTK6 in den Reproduktionsorganen adulter *S. mansoni* über gonadenspezifische RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen (siehe 3.2.1 und 3.2.2) bestätigt werden konnte und erste Untersuchungen zur paarungsabhängigen Transkription durchgeführt wurden, (siehe 3.2.3) folgten weiterführende Sequenzanalysen (siehe 3.3.1.1) und RNAi-Experimente (siehe 3.3.1.2), um erste Hinweise auf mögliche biologische Funktionen von SmTmMuc1 zu erhalten.

### 3.3.1.1 Aufklärung der SmTmMuc1-Sequenz

Die im Y2H-Screening von Svenja Beckmann gefundene, 1,5 kb große Partialsequenz von SmTmMuc1 (Beckmann, 2008; Beckmann et al., 2011) wurde mit den aktuell überarbeiteten Daten des Genomprojekts von *S. mansoni* (Protasio et al., 2012) verglichen und konnte dem neu annotierten Gen Smp\_073450 zugeordnet werden. Die CDS von Smp\_073450 hat eine Länge von insgesamt 11.250 bp, wobei die Partialsequenz des Y2H-Screenings am 3'-Ende des Gens liegt. Insgesamt besteht der *open reading frame* (ORF) aus 13 Exons, von denen die ersten zwölf innerhalb der ersten 1.367 bp ausgehend vom Startcodon liegen. Über RT-PCRs und *Genome Walking* ließen sich 1.622 bp des 5'- und 4.857 bp des 3'-Endes amplifizieren und sequenzieren. Eine Amplifikation des vollständigen ORF schlug fehl (siehe 6.1). Als Template für die PCR-Reaktionen dienten cDNA und genomische DNA aus Pärchen.

Um Hinweise auf mögliche Eigenschaften des potentiellen Mucins zu erhalten, wurde die Mucin-Sequenz *in silico* weiter analysiert. Die vorhergesagte Proteinsequenz von SmTmMuc1 hat eine Gesamtlänge von 3.750 Aminosäuren. Hiervon entfallen 3.096 Aminosäuren ausgehend vom N-Terminus auf den extrazellulären Bereich. Die durch das Programm TMpred (Hofmann & Stoffel, 1993) vorhergesagte Transmembranhelix (TMH) befindet sich zwischen den Aminosäuren D<sup>3.097</sup> bis V<sup>3.113</sup>. Innerhalb des extrazellulären Bereichs sind weiterhin drei *tandem repeat*-Regionen (TR) lokalisiert. Hierbei handelt es sich um Abschnitte, welche aus sich mehrfach wiederholenden Aminosäuresequenzen bestehen. *Tandem repeat*-Regionen sind typische Merkmale von Mucinen und liegen *in vivo* häufig stark glykosyliert vor (Cullen et al., 2011). Innerhalb des intrazellulären C-Terminus liegt das potentielle Src-Bindungsmotiv mit Aminosäure-Abfolge Y<sup>3.577</sup>EKL, welches für die Bindung der SH2-Domäne von SmTK6 essentiell ist (Beckmann, 2008; Hahnel, 2010) sowie ein

weiteres, potentiell Abl-Bindungsmotiv (Y<sup>3679</sup>ESP). Zusätzlich durchgeführte Blast-Analysen der Proteinsequenz bestätigten eine Sequenzähnlichkeit von SmTmMuc1 zu verschiedenen Mucinen anderer Organismen (siehe Tab. 3.4). Die Ergebnisse der Sequenzanalyse von SmTmMuc1 sind in Abbildung 3.12 zusammengefasst.



**Abb. 3.12: Sequenzanalyse des transmembranen Mucins SmTmMuc1**

Die Proteinsequenz von SmTmMuc1 hat eine Gesamtlänge von 3.750 Aminosäuren, wobei der N-terminale, extrazelluläre Bereich des Proteins 3.096 Aminosäuren umfasst. Extrazellulär lokalisiert sind drei *tandem repeat*-Regionen (TR I - TR III). Die TMH befindet sich an Position D<sup>3.097</sup> bis V<sup>3.113</sup>. Im N-terminal gelegenen aus 636 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Bereich, sind weiterhin zwei SH2-Bindungsmotive lokalisiert, von denen die Sequenzabfolge YEKL für die Interaktion des Mucins mit SmTK6 notwendig ist. Amplifizierte und sequenzierte Bereiche sind mit einer durchgängigen schwarzen Linie dargestellt, der nicht amplifizierte Bereich mit einer gepunkteten Linie. [N: N-Terminus; C: C-Terminus].

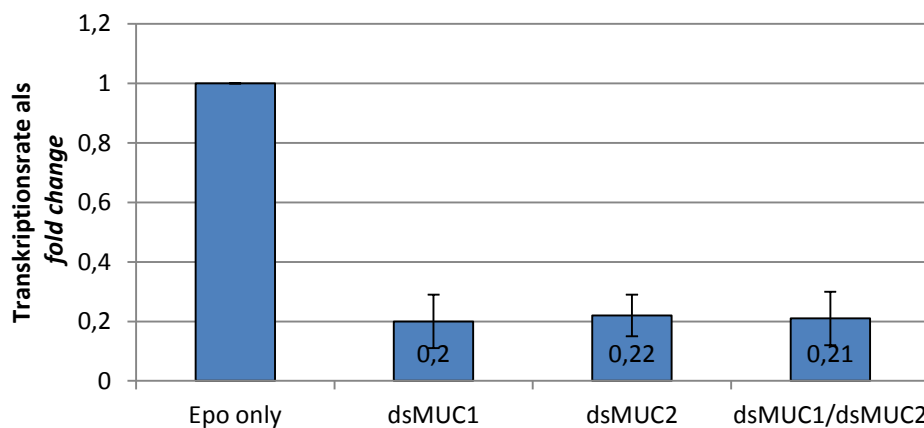
Tab. 3.4: BLAST-Analyse zum transmembranen Mucin SmTmMuc1

Nr.	Entry	Gen	Art	E-value
1	G4VSW4	Smp_073450	<i>Schistosoma mansoni</i>	0.0
2	G7YKJ4	Uncharacterized protein CLF_110325	<i>Clonorchis sinensis</i>	0.0
3	Q5C4C5	SJCHGC05365 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	1.0×10 <sup>-159</sup>
4	Q5DAE5	SJCHGC09295 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	4.0×10 <sup>-145</sup>
5	Q5C148	SJCHGC07255 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	4.0×10 <sup>-92</sup>
6	Q5C7T3	SJCHGC07425 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	8.0×10 <sup>-68</sup>
7	E7EZG1	Uncharacterized protein CR926130.2	<i>Danio rerio</i>	2.0×10 <sup>-47</sup>
8	F6YKY7	Uncharacterized protein	<i>Xenopus tropicalis</i>	9.0×10 <sup>-46</sup>
9	Q5C5J7	SJCHGC03771 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	2.0×10 <sup>-49</sup>
10	K7J0L4	Uncharacterized protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	9.0×10 <sup>-43</sup>
11	F8W399	Uncharacterized protein	<i>Danio rerio</i>	1.0×10 <sup>-42</sup>
12	G4ZZ67	Putative uncharacterized protein	<i>Phytophthora sojae</i>	3.0×10 <sup>-40</sup>
13	F1QS31	Uncharacterized protein	<i>Danio rerio</i>	3.0×10 <sup>-38</sup>
14	E7F681	Uncharacterized protein	<i>Danio rerio</i>	1.0×10 <sup>-37</sup>
15	E3LJY3	Putative uncharacterized protein	<i>Caenorhabditis remanei</i>	5.0×10 <sup>-35</sup>
16	L5KN89	<b>Mucin-2</b>	<b><i>Pteropus alecto</i></b>	<b>5.0×10<sup>-34</sup></b>
...				
38	E9Q7Q0	<b>Mucin-4</b>	<b><i>Mus musculus</i></b>	<b>3.0×10<sup>-21</sup></b>
...				
40	Q02817	<b>Mucin-2</b>	<b><i>Homo sapiens</i></b>	<b>8.0×10<sup>-21</sup></b>
...				
55	Q7KTF6	<b>Mucin 30E</b>	<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>2.0×10<sup>-18</sup></b>

Tabelle 3.4 enthält die ersten 55 Ergebnisse zur BLAST-Analyse der postulierten SmTmMuc1 Proteinsequenz mit der Protein-Datenbank UniProt. An erster Position befindet sich das identifizierte Gen SmTmMuc1 (Smp\_073450). Neben Sequenzähnlichkeiten zu Mucinen verschiedener Organismen (farblich hervorgehoben) handelt es sich bei allen weiteren Treffern ausschließlich um Sequenzen mit der Annotation *uncharacterized protein*. Diese wurden zur aus Gründen der Übersichtlichkeit teilweise aus der Tabelle entfernt.

### 3.3.1.2 RNAi-Experimente zur funktionalen Analyse der Rolle von SmTmMuc1 in adulten *S. mansoni*

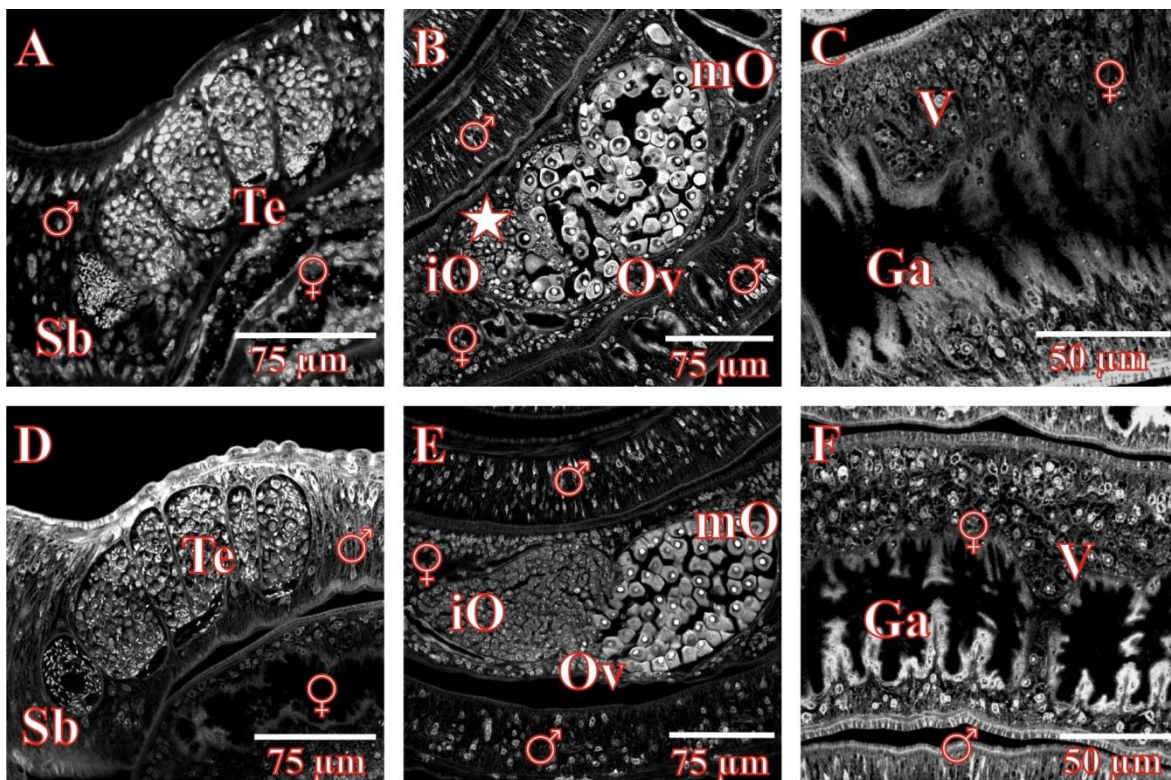
Zur Reduktion der SmTmMuc1-Transkription über RNAi wurden zwei unterschiedliche dsRNAs (dsMUC1, dsMUC2) synthetisiert, welche spezifisch gegen das 3'-Ende der Mucin-mRNA gerichtet sind. Die Länge der beiden dsRNAs beträgt 492 bp für dsMUC1 (Primer: 5'Muc./3'Muc.) und 403 bp für dsMUC2. (Primer: 5'Muc.2/3'Muc.2) Das Einbringen der dsRNAs in *S. mansoni*-Pärchen erfolgte über Elektroporation. Je Ansatz wurden acht Pärchen mit 25 µg einer dsRNA bzw. einer Kombination beider dsRNAs behandelt und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) wurden Pärchen ohne dsRNAs elektroporiert. Anschließend folgten molekularbiologische und mikroskopische Analysen behandelter Würmer. Zum Nachweis einer Transkriptreduktion als Folge der dsRNA-Behandlung wurde Gesamt-RNA aus Pärchen extrahiert und im Anschluss an die cDNA-Synthese mittels qPCR untersucht. Zur Amplifikation von SmTmMuc1 cDNA wurden die Primer 5'Muc\_q1 und 3'Muc\_q1 verwendet. Als Referenzgen diente SmActin (5'Actin-q2/3'Actin-q2). Sowohl eine Behandlung mit dsMUC1 als auch mit dsMUC2 führte zu einer Reduktion der Transkriptmenge von SmTmMuc1 auf ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine Kombination beider dsRNAs konnte diesen Effekt nicht verstärken (siehe Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Transkriptionsraten von SmTmMuc1 nach dsRNA-Behandlung adulter *S. mansoni***

Bestimmung der Transkriptionsrate von SmTmMuc1 in adulten *S. mansoni* nach RNAi-Experimenten mittels qPCR. Pärchen wurden mit zwei unterschiedlichen, gegen SmTmMuc1 gerichteten dsRNAs (**dsMUC1**, **dsMUC2**) bzw. einer Kombination beider dsRNAs (**dsMUC1/dsMUC2**) elektroporiert und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) dienen Würmer, welche ohne dsRNA elektroporiert wurden. Die Bestimmung der Transkriptmengen von SmTmMuc1 erfolgte über eine relative Quantifizierung im Vergleich zum Referenzgen SmActin ( $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). In allen drei Ansätzen konnte eine Reduktion der Transkriptmenge auf ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ )

Nachdem eine Reduktion der Transkriptmenge von SmTmMuc1 über qPCR nachgewiesen werden konnte, wurden behandelte Pärchen mit Karminrot gefärbt und mit dem KLSM auf morphologische Veränderungen in den Reproduktionsorganen untersucht. Hierbei konnte ein deutlicher Effekt in Ovar behandelter Weibchen beobachtet werden. Im Gegensatz zur Kontrolle zeigte sich ein deutlich verschobenes Verhältnis zugunsten maturer Oocyten im Vergleich zu immaturren Oocyten. Weiterhin kam es zu einer „Verschiebung“ reifer Oocyten in den anterioren Bereich des Ovars. Morphologische Veränderungen in Testes, Vitellarium und anderen Geweben konnten hingegen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 3.14). Die RNAi-Versuche zu SmTmMuc1 wurden dreimal in voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.



**Abb. 3.14:** Morphologische Untersuchungen von *S. mansoni*-Pärchen nach *in vitro*-Behandlung mit SmTmMuc1-spezifischen dsRNAs

KLSM-Aufnahmen adulter *S. mansoni* nach Elektroporation mit SmTmMuc1-spezifischen dsRNAs und anschließender *in vitro*-Kultur (A-C). Als Kontrollen dienten Pärchen, die ohne dsRNAs elektroporiert wurden (D-F). Behandelte Pärchen und Kontrollen wurden insgesamt fünf Tage in Kultur gehalten bevor eine Fixierung in AFA mit anschließender Karminrotfärbung erfolgte. In Ovarien behandelter Weibchen war eine deutliche Zunahme an murenen Oocyten im Vergleich zu immaturren Oocyten zu erkennen (B, Stern). Testes und Vitellarium (A, C) zeigten keine morphologischen Veränderungen zur Kontrolle (D, F). [Te: Testes; Sb: Samenblase; Ov: Ovar; iO: immature Oocyten; mO: mature Oocyten V: Vitellarium; Ga: Gastrodermis; ♂: Männchen; ♀: Weibchen]

### **3.3.2 Weiterführende Charakterisierung des potentiellen Neuropeptidrezeptors SmNPYR1 aus *S. mansoni***

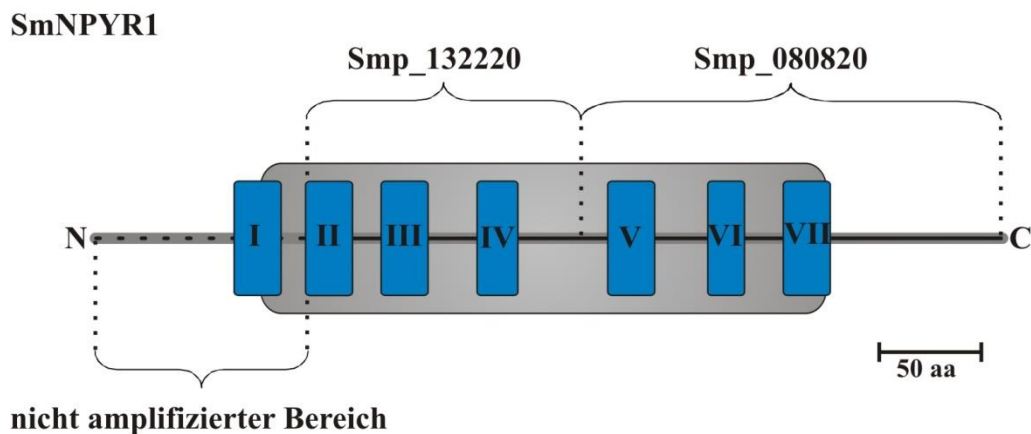
Neuropeptide und ihre Rezeptoren haben sich evolutionär früh entwickelt und sind in nahezu allen Stämmen der *Metazoa* vertreten (Grimmelikhuijzen & Hauser, 2012). Auch bei der Gruppe der Plathelminthen konnte ein breites Spektrum unterschiedlicher Neuropeptidfamilien identifiziert werden, wobei eine Mehrzahl von Studien Neuropeptide bislang hauptsächlich mit einer Modulation der Muskeltätigkeit dieser Tiere in Verbindung gebracht hat (Graham et al., 1997; Moneypenny et al., 2001; McVeigh et al., 2005; Novozhilova et al., 2010; McVeigh et al., 2011). Aktuelle Ergebnisse offenbaren zudem eine herausragende Bedeutung von Neuropeptiden der NPF/Y-Familie bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen Reproduktionsorgane in *Schmidtea mediterranea* (Collins et al., 2010). In dieser Arbeit konnten Transkripte eines potentiellen Rezeptors für Neuropeptide der NPF/Y-Familie, SmNPYR1, über gonadenspezifische RT-PCRs (siehe 3.2.1) und *in situ*-Hybridisierungen (siehe 3.2.2) in den Testes adulter Männchen nachgewiesen werden. Anschließende qPCRs zeigten weiterhin, dass die Transkriptionsrate des Rezeptorgens in den Testes in Abhängigkeit des Paarungsstatus reguliert wird (siehe 3.2.3). Zur weiteren Charakterisierung von SmNPYR1 wurden Sequenzanalysen (siehe 3.3.2.1) sowie erste RNAi-Experimente mit dem Ziel durchgeführt, Hinweise auf eine biologische Funktion des Rezeptors in den Testes adulter *S. mansoni* zu erhalten (siehe 3.3.2.2).

#### **3.3.2.1 Aufklärung der SmNPYR1-Sequenz**

Zwei Teilsequenzen des potentiellen Neuropeptid-Rezeptors SmNPYR1 wurden ursprünglich bei einer Datenbankrecherche zu GPCRs aus *S. mansoni* identifiziert (Hahnel, 2010) und den Genen Smp\_132220 und Smp\_080820 zugeordnet. Beide Gene werden in der GeneDB als *G protein-coupled receptor fragment* annotiert und ihre Proteinsequenzen stellen keine vollständigen GPCRs dar. Da die Gene aus der GeneDB mittels Algorithmen automatisch annotiert werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit über RT-PCRs untersucht werden, ob beide Teilsequenzen möglicherweise zu einem einzigen Gen gehören. Die Verwendung von Primern am 5'-Ende von Smp\_132220 und am 3'-Ende von Smp\_080820 führte zur Amplifikation eines 1.005 bp großen PCR-Produktes, dessen Sequenzierung die obige Annahme bestätigte (siehe 6.2).



Die entsprechende Proteinsequenz mit einer Länge von 334 Aminosäuren besitzt SMART-Analysen (Leutnic et al., 2012) zufolge insgesamt sechs TMHs. Eine *in silico*-Betrachtung des 5'-UTRs von Smp\_132220 zeigte allerdings, dass der ORF in 5'-Richtung um 309 bp bis zum nächsten möglichen Start-Codon erweitert werden kann. Eine um diesen Bereich entsprechend ergänzte CDS weist eine siebte TMH auf und stellt somit möglicherweise die vollständige Sequenz von SmNPYR1 dar (siehe Abb. 3.15). Die Möglichkeit, diese Annahme über RT-PCRs zu bestätigen, war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gegeben. Blast-Analysen der postulierten Sequenz offenbarten eine Homologie von SmNPYR1 zu Neuropeptid F und Neuropeptid Y Rezeptoren anderer Organismen (siehe Tab. 3.5).



**Abb. 3.15: Sequenzanalyse des Neuropeptidrezeptors SmNPYR1**

Die postulierte Proteinsequenz von SmNPYR1 hat eine Gesamtlänge von 437 Aminosäuren. Der über RT-PCR und Sequenzierung belegte Abschnitt (schwarze Linie) enthält sechs potentielle TMHs (II-VII). Eine weitere siebte THM (I) befindet sich im nicht amplifizierten Bereich (gepunktete Linie). Zusammengefasst bilden beide Teilsequenzen eine vollständige 7TM-Domäne (graue Box). [N: N-Terminus; C: C-Terminus].

Tab. 3.5: BLAST-Analyse zum Neuropeptidrezeptor SmNPYR1

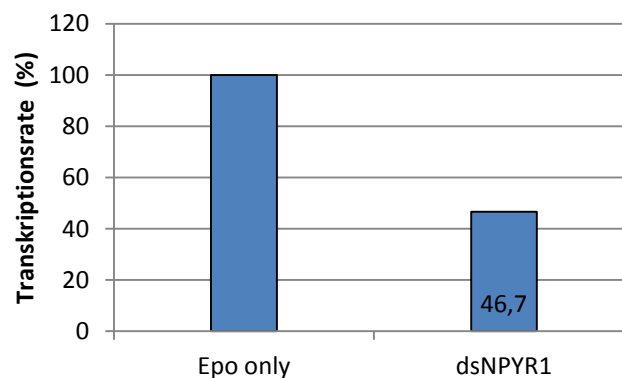
Nr.	Entry	Gen	Art	E-value
1	G4VRB8	Putative g-protein coupled receptor Smp_080820	<i>Schistosoma mansoni</i>	5.0×10 <sup>-138</sup>
2	G4VRB7	Putative g-protein coupled receptor Smp_132220	<i>Schistosoma mansoni</i>	5.0×10 <sup>-87</sup>
3	H2KSQ5	G-protein coupled receptor	<i>Clonorchis sinensis</i>	2.0×10 <sup>-62</sup>
4	G7YJZ2	G-protein coupled receptor	<i>Clonorchis sinensis</i>	1.0×10 <sup>-58</sup>
...				
7	K1RE65	Neuropeptide FF receptor 2	<i>Crassostrea gigas</i>	2.0×10 <sup>-17</sup>
8	L5KCR3	Neuropeptide Y receptor type 4	<i>Pteropus alecto</i>	5.0×10 <sup>-17</sup>
...				
12	E1G6B2	Neuropeptide F receptor	<i>Loa loa</i>	1.0×10 <sup>-15</sup>
13	K1QZG6	Orexin receptor type 2	<i>Crassostrea gigas</i>	1.0×10 <sup>-15</sup>
...				
18	Q9VNM1-6	Isoform 6 of Neuropeptide F receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.0×10 <sup>-15</sup>
...				
20	Q9VNM1	Neuropeptide F receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.0×10 <sup>-15</sup>
21	Q9VNM1-4	Isoform D of Neuropeptide F receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.0×10 <sup>-15</sup>
...				
25	A2AV71	similar to vertebrate neuroept...	<i>Danio rerio</i>	3.0×10 <sup>-15</sup>
26	Q9VNM1-2	Isoform 2 of Neuropeptide F receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.0×10 <sup>-15</sup>
27	Q9VNM1-5	Isoform C of Neuropeptide F receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.0×10 <sup>-15</sup>
28	Q9VNM1-3	Isoform B of Neuropeptide F receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.0×10 <sup>-15</sup>
...				
30	B3DIJ2	Neuropeptide Y receptor Y4	<i>Danio rerio</i>	7.0×10 <sup>-15</sup>

Tabelle 3.5 enthält die ersten 30 Ergebnisse zur BLAST-Analyse der postulierten SmNPYR1 Proteinsequenz mit der Proteindatenbank UniProt. Ergebnisse die auf Sequenzähnlichkeiten zu Neuropeptid-F- und Neuropeptid-Y-Rezeptoren verschiedener Organismen verweisen, wurden farblich hervorgehoben. Weitere Treffer mit der Annotation *uncharacterized protein* wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus der Tabelle entfernt.

### 3.3.2.2 RNAi-Experimente zur funktionalen Analyse der Rolle von SmNPYR1 in adulten *S. mansoni*

Um erste Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion von SmNPYR1 in adulten *S. mansoni* zu erhalten, wurde ein erstes RNAi-Experiment mit SmNPYR1-spezifischer dsRNA durchgeführt. Zur Herstellung der dsRNA wurde ein Sequenzbereich gewählt, der durch das Primerpaar 5'LPA+T7/3'LPA\_fus1+T7 flankiert wird. Das Einbringen der dsRNAs in *S. mansoni*-Pärchen erfolgte über Elektroporation. Je Elektroporationsansatz wurden acht Pärchen mit 25 µg dsRNA behandelt und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) wurden Pärchen ohne dsRNAs elektroporiert. Anschließend folgten molekularbiologische und mikroskopische Analysen behandelter Würmer.

Zum Nachweis einer Transkriptionreduktion als Folge der dsRNA-Behandlung wurde Gesamt-RNA aus Pärchen extrahiert und im Anschluss an die cDNA-Synthese mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Zur Amplifikation von SmNPYR1 cDNA wurden die Primer 5'LPA und 3'LPA verwendet. Als Referenz-Gen diente SmPDI (Primer: 5'PDI<sub>vs</sub>/3'PDI<sub>vs</sub>). Den PCR-Ergebnissen zufolge führte eine Behandlung mit SmNPYR1-spezifischer dsRNA zu einer Reduktion der Transkriptmenge von SmNPYR1 auf ca. 47 % im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3.16).

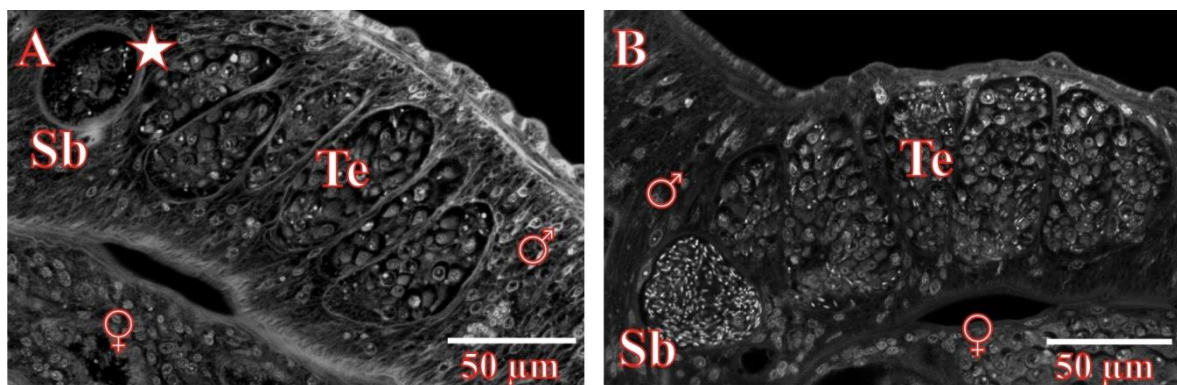


**Abb. 3.16: Transkriptionsraten von SmNPYR1 nach dsRNA-Behandlung adulter *S. mansoni***

Bestimmung der Transkriptionsrate von SmNPYR1 in adulten *S. mansoni* nach Behandlung mit spezifischer dsRNA mittels semiquantitativer RT-PCR. Behandelte Pärchen (**dsNPYR1**) und Kontrollen (***Epo only***) wurden im Anschluss an die Elektroporation für fünf Tage kultiviert. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über einen semiquantitativen Ansatz im Vergleich zum Referenzgen SmPDI. Hierzu wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und densitometrisch analysiert (ImageJ). Der dsRNA-Ansatz zeigte eine auf ca. 47 % verringerte Transkriptmenge von SmNPYR1 im Vergleich zur Kontrolle. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 1).

Nachdem eine Reduktion der Transkriptmenge von SmNPYR1 über semiquantitative RT-PCR nachgewiesen werden konnte, wurden behandelte Pärchen mit Karminrot gefärbt und mit dem KLSM auf morphologische Veränderungen untersucht. In Übereinstimmung mit den durchgeführten Lokalisationsstudien wurden Effekte der dsRNA-Behandlung in den Reproduktionsorganen der Männchen nachgewiesen. Im Vergleich zur Kontrolle enthielten Samenblasen und Testes-Loben behandelter Männchen wesentlich geringere Mengen reifer Spermien. Weiterhin erschienen die Testesloben im Durchmesser deutlich reduziert und weniger stark mit Zellen ausgefüllt (siehe Abb. 3.17).

Morphologische Veränderungen in anderen Geweben konnten hingegen nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Die RNAi-Versuche zu SmNPYR1 wurden im Rahmen dieser Arbeit einmal durchgeführt.



**Abb. 3.17: Morphologische Untersuchungen von *S. mansoni*-Pärchen nach *in vitro*-Behandlung mit SmNPYR1-spezifischer dsRNA**

KLSM-Aufnahmen adulter *S. mansoni* nach Elektroporation mit SmNPYR1-spezifischer dsRNA und anschließender *in vitro*-Kultur (A). Als Kontrollen dienten Pärchen, die ohne dsRNA elektroporiert wurden (B). Behandelte Pärchen und Kontrollen wurden insgesamt fünf Tage in Kultur gehalten, bevor eine Fixierung in AFA mit anschließender Karminrot-Färbung folgte. Testesloben behandelter Männchen enthielten keine oder nur geringe Mengen reifer Spermien und schienen nicht vollständig mit Zellen ausgefüllt. Die Samenblasen waren kaum gefüllt (A, Stern) und enthielten neben vereinzelt reifen Spermien (kleine, stark fluoreszierende, kommaähnliche Strukturen) hauptsächlich unreife Vorläuferzellen (größere, schwach fluoreszierende, rundliche Strukturen). [Te: Testes; Sb: Samenblase; ♂: Männchen; ♀: Weibchen]

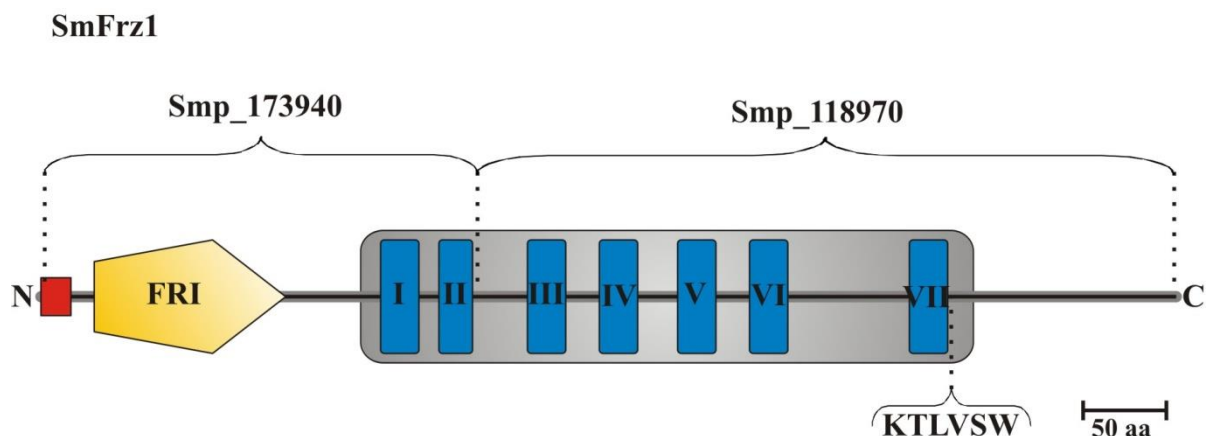
### 3.3.3 Charakterisierung des *Frizzled*-Rezeptors SmFrz1 aus *S. mansoni*

Bei den Mitgliedern der *Frizzled*-Familie handelt es sich um Rezeptoren für sekretierte Wnt-Proteine mit einer 7-TMH-Struktur. Vertreter dieser Rezeptorfamilie sind in nahezu allen Stämmen des Tierreichs von den *Spongifera* bis zu den Säugetieren vertreten und an der Kontrolle sowie Regulation verschiedener Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse sowohl im Embryo als auch im adulten Organismus beteiligt (Huang & Klein, 2004). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei der Steuerung und Aufrechterhaltung des Stammzellstatus (Nusse, 2008). In *S. mansoni* konnten bisher vier Mitglieder der *Frizzled*-Familie sowie ein *Smoothened-like* Rezeptor über Datenbankanalysen des Genomprojekts *in silico* identifiziert werden (Hahnel, 2010; Zamanian et al., 2011). Aufgrund ihrer entwicklungsbiologischen Bedeutung wurden in der vorliegenden Arbeit die vier *Frizzled*-Rezeptoren SmFrz1, SmFrz2, SmFrz3 und SmFrz4 über gonadenspezifische RT-PCRs auf ihre Transkription in Testes und Ovarien adulter *S. mansoni* untersucht. Im Falle von SmFrz1 konnten Transkripte in beiden Gonaden nachgewiesen und diese Ergebnisse zusätzlich über *in situ*-Hybridisierungen bestätigt werden (siehe 3.2.1 und 3.2.2). Zusätzlich durchgeführte qPCRs ergaben weiterhin eine paarungsabhängige Regulation der SmFrz1-Transkription in beiden Reproduktionsorganen (siehe 3.2.3). Aufgrund dieser Befunde wurde SmFrz1 für eine weiterführende Charakterisierung ausgewählt. Neben einer Sequenzanalyse (siehe 3.3.3.1) wurden Inhibitor- (siehe 3.3.3.2) und RNAi-Experimente (siehe 3.3.3.3) durchgeführt, um erste Hinweise auf eine biologische Funktion von *Frizzled*-Rezeptoren in adulten *S. mansoni* zu erhalten.

#### 3.3.3.1 Aufklärung der SmFrz1-Sequenz

Wie bereits für den potentiellen Neuropeptidrezeptor SmNPYR1 beschrieben (siehe 3.3.2.1) setzt sich die SmFrz1-Sequenz aus zwei Datenbankeinträgen Smp\_173940 und Smp\_118970 zusammen. Beide automatisch erstellten Gene sind als *Frizzled* annotiert, ohne dass ihre entsprechenden Proteinsequenzen alle Eigenschaften vollständiger *Frizzled*-Rezeptoren aufweisen. Durch die Verwendung von Primern am 5'-Ende von Smp\_173940 (Primer: 5'FrzR.2) und am 3'-Ende von Smp\_118970 (Primer: 3'FrzR.3) konnte ein 2.091 bp großes PCR-Produkt amplifiziert werden, welches einer anschließenden Sequenzierung zufolge den vollständigen ORF von SmFrz1 darstellt und aus beiden Teilsequenzen der Datenbank besteht (siehe 6.3). Die entsprechende Proteinsequenz weist eine Länge von 696 Aminosäuren auf und enthält nach einer *in silico*-Analyse mit SMART (Leutnic et al.,

2012) die wichtigsten, für *Frizzled*-Rezeptoren charakteristischen Domänen (Huang & Klein, 2004; Schulte, 2010). Innerhalb der ersten 18 Aminosäuren, ausgehend vom N-Terminus befindet sich eine konservierte Signalpeptid-Sequenz (M<sup>1</sup> bis C<sup>18</sup>) zur Translokation des Rezeptors an die Plasmamembran (Schulte, 2010; Petersen et al., 2011). Weiterhin findet sich im extrazellulären Bereich des Proteins eine FRI-Domäne (K<sup>33</sup> bis K<sup>147</sup>) (SMART Acc: SM000063). Diese Domäne wird aufgrund ihrer zehn konservierten Cystein-Reste auch als *cysteine-rich domain* (CRD) bezeichnet und ist an der Bindung von Wnt-Wachstumsfaktoren beteiligt (Dann et al., 2001). Die *Frizzled*-TM-Domäne (PFAM Acc: PF01534) reicht von L<sup>193</sup> bis R<sup>560</sup> und enthält sieben TMHs. Direkt an die letzte TMH schließt sich das Aminosäuremotiv K<sup>545</sup>TLVSW an. Dieses stimmt sowohl von seiner Lage als auch von seiner Sequenzabfolge mit der Konsensus-Sequenz des, in *Frizzled*-Rezeptoren konservierten Dvl-(*Dishevelled*)-Bindungsmotivs KTXXXW überein (Wong et al., 2003). Insgesamt entfallen auf den intrazellulären C-Terminus des Rezeptors 152 Aminosäuren (siehe Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Sequenzanalyse des *Frizzled*-Rezeptors SmFrz1**

Die vollständige Sequenz des *Frizzled*-Rezeptors SmFrz1 wird in der GeneDB durch die beiden Datenbankeinträge Smp\_173940 und Smp\_118970 vertreten. Die Gesamtlänge des Rezeptors umfasst insgesamt 696 Aminosäuren von denen 192 auf den extrazellulären N-Terminus entfallen. In diesem Bereich sind eine Signalpeptid-Sequenz (**rot**) sowie eine FRI-Domäne lokalisiert. Letztere ist an der Bindung von Wnt Wachstumsfaktoren beteiligt. Die *Frizzled*-TM Domäne (**graue Box**) enthält sieben TMHs (I - VII). Hieran schließt sich das konservierte Dvl-Bindungsmotiv KTLVSW an. [N: N-Terminus; C: C-Terminus].

### 3.3.3.2 Inhibitorbehandlung von *S. mansoni*-Pärchen

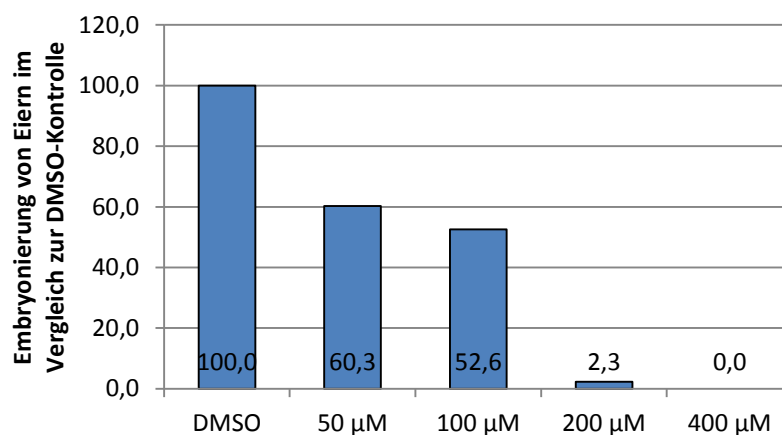
Um Hinweise auf die Funktion von *Frizzled*-Rezeptoren in adulten *S. mansoni* zu erhalten, wurden Pärchen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors 3289-8625 (auch *Dvl-PDZ Domain Inhibitor II*; Merck Millipore) *in vitro* behandelt. Der verwendete Inhibitor blockiert die Interaktion zwischen *Frizzled*-Rezeptoren und dem *downstream*-Interaktionspartner Dvl durch Bindung an dessen PDZ-Domäne (Grandy et al., 2009; Gao & Chen, 2010; Voronkov & Krauss, 2013). Zellkulturexperimente zeigten, dass 3289-8625 u.a. das Wnt-abhängige Wachstum der Krebszelllinie PC-3 unterdrückt ( $IC_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ ) (Grandy et al., 2009). Ebenso konnte ein negativer Effekt des Inhibitors auf die Wnt3A-induzierte Deformation von *Xenopus*-Embryonen bei einer Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die nach Wnt3A-Behandlung hervorgerufene Ausbildung einer zweiten Körperachse durch Zugabe von 3289-8625 unterdrückt wurde (Grandy et al., 2009).

Da der Inhibitor gezielt gegen die *Frizzled*-Dvl Interaktion gerichtet ist, wurde zunächst über Datenbankrecherchen nach Dvl-Homologen gesucht. Hierbei konnten zwei Vertreter dieser Protein-Familie im Genom von *S. mansoni* identifiziert werden. Durchgeführte gonadenspezifische RT-PCRs zeigten eine Transkription von SmDvl1 (Smp\_162410) und SmDvl2 (Smp\_020300) in Testes und Ovarien (nicht gezeigt).

Nachdem entsprechende Hinweise auf die Existenz von *Frizzled*-Dvl Signalwegen in den Gonaden adulter Schistosomen vorlagen, wurden erste *in vitro*-Kulturexperimente durchgeführt. Diese Vorversuche hatten zum Ziel, die maximale 3289-8625-Konzentration zu definieren, bei der die behandelten *S. mansoni* noch eine stabile Paarung aufwiesen, um später die Eiproduktion unter Inhibitoreinfluss bestimmen zu können. Diese lag bei ungefähr  $400 \mu\text{M}$ . In den eigentlichen Experimenten wurden adulte *S. mansoni*-Pärchen für 96 h mit dem Inhibitor 3289-8625 (gelöst in DMSO) behandelt. Hierzu wurden schließlich die folgenden Inhibitorkonzentrationen gewählt:  $50 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$  und  $400 \mu\text{M}$ . Als Kontrolle dienten Pärchen, die ausschließlich mit DMSO inkubiert wurden. Medium und Inhibitor wurden täglich gewechselt, und die Zahl gelegter Eier in allen Ansätzen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass der Inhibitor in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Eiproduktion der behandelten Pärchen besaß (Daten nicht gezeigt).

Als zusätzlicher Parameter wurde außerdem der Einfluss der Inhibitor-Behandlung auf die Embryogenese der gelegten Eier untersucht. Hierzu wurden die Eier aller Ansätze zusammen mit dem Medium nach den ersten 24 h in neue Schalen überführt und für eine Woche bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich unter

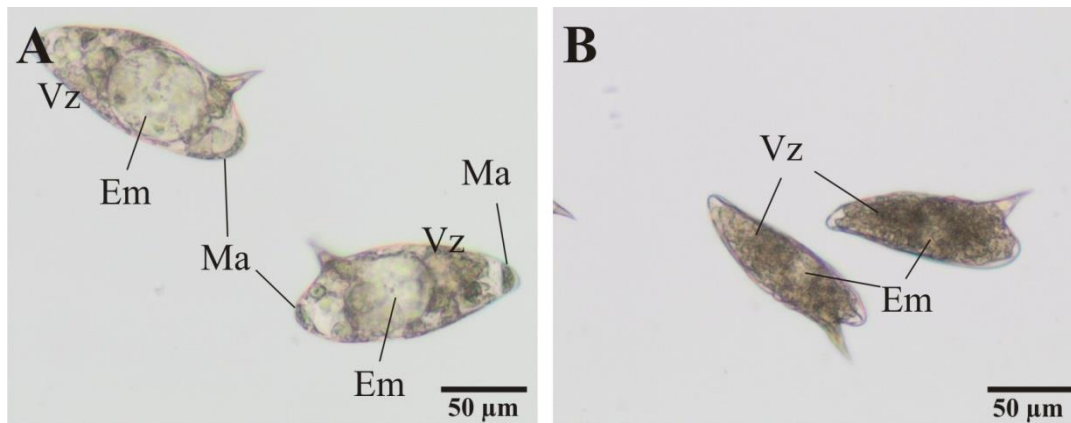
Anwesenheit von 3289-8625 weniger Eier entwickelten als im Vergleich zur Kontrolle. Im DMSO-Ansatz konnten die sich entwickelnden Eier den Stufen II und III der Embryogenese nach Jurberg et al. (2009) zugeordnet werden. Sowohl das Ei, als auch der Embryo nehmen in dieser Phase an Größe zu. Letzterer erscheint als klare Masse und füllt 50 - 70 % des Eis aus. An der Innenseite der Eischalen befindet sich darüber hinaus an den Polen jeweils eine Schicht aus Macromeren, welche später den äußeren Mantel des Miracidiums bilden (Jurberg et al., 2009). Mit zunehmender Inhibitorkonzentration konnten weniger Eier der zweiten und dritten Entwicklungsstufe gefunden werden. In den Ansätzen 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  zeigten im Vergleich zur Kontrolle nur ca. 60 % bzw. 50 % der Eier eine fortschreitende Embryogenese. Ab 200  $\mu\text{M}$  war nahezu keine Entwicklung zu erkennen, stattdessen verblieben die Eier in einem immaturren Zustand (siehe Abb. 3.19). Sie waren kleiner und der Embryo war lichtmikroskopisch nicht oder kaum sichtbar. Die Vitellinzellen erschienen in diesem Zustand noch als homogene Masse (Abb. 3.20).



**Abb. 3.19: Einfluss der 3289-8625-Behandlung auf die Embryogenese von *S. mansoni*-Eiern**

Eier behandelter *S. mansoni*-Pärchen wurden 24 h nach Zugabe des Inhibitors 3289-8625 in neue Schalen überführt und für eine Woche bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Lichtmikroskopische Analysen der Ansätze zeigten eine, in Abhängigkeit zur Inhibitorkonzentration stehende Reduktion sich entwickelnder Eier im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 1).

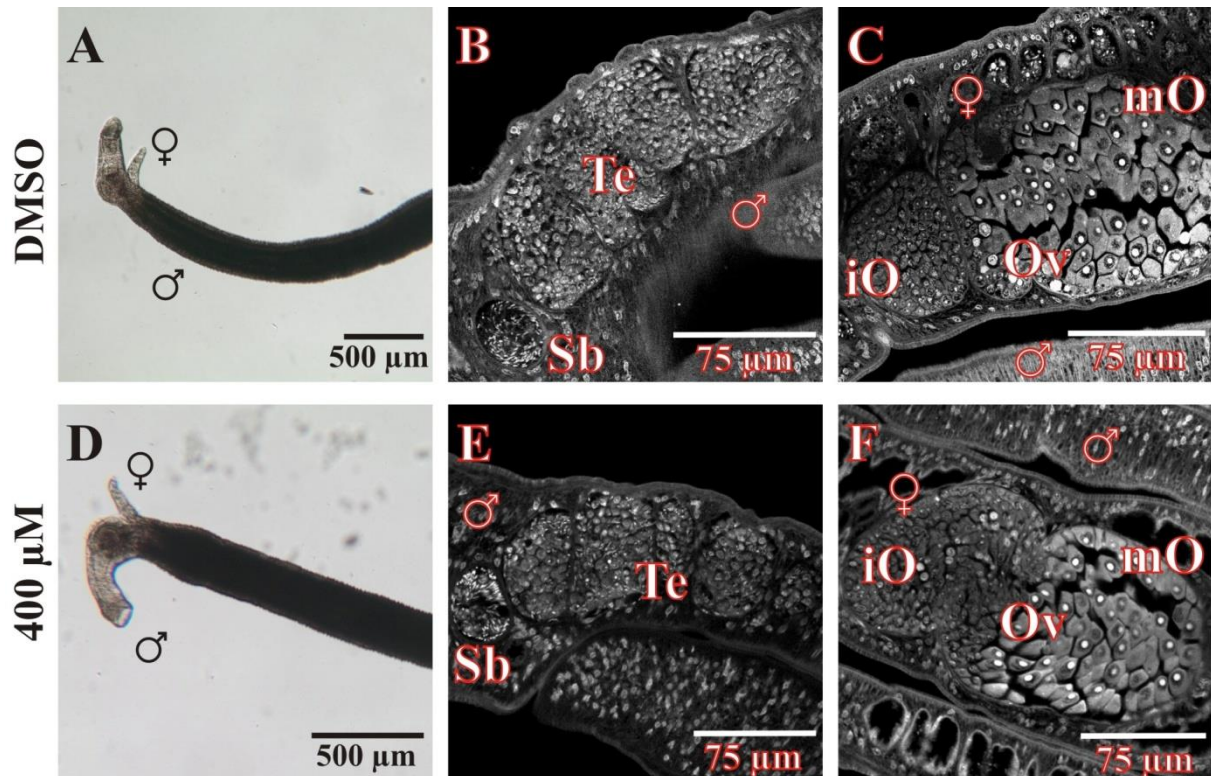




**Abb. 3.20: Lichtmikroskopische Untersuchung von Eiern aus inhibitorbehandelten *S. mansoni***

Lichtmikroskopische Bilder von *S. mansoni*-Eiern nach *in vitro*-Behandlung von Pärchen mit dem Frz-Dvl Inhibitor 3289-8625. Die Eier wurden 24 h nach der ersten Inhibitorzugabe in frische Schalen überführt und für eine Woche bei 37°C und 5 %CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Eier der DMSO-Kontrolle (A) zeigten deutliche Hinweise auf eine fortschreitende Entwicklung und befanden sich zwischen den Stufen II und III der Embryogenese nach Jurberg et al. (2009). Dieser Entwicklungszustand geht einher mit einer Größenzunahme von Ei und Embryo. Letzterer erscheint als klares Gebilde und nimmt die Hälfte bis zu zweidrittel des Eiinhalts ein. Zudem löst sich Vitellinmasse langsam auf und an der Innenseite der Eipole sind Schichten von Makromeren zu erkennen, aus denen sich später die äußere Hülle des Miracidiums entwickeln. Bei einer Inhibitorkonzentration von 200 µM verbleiben hingegen nahezu alle Eier in einem immaturren Zustand. Die Eier zeigen keinen Größenzuwachs und ein Embryo ist nicht oder kaum zu erkennen. Die Füllung aus noch intakten Vitellinzellen erscheint homogen. [Em: Embryo; Ma: Makromere; Vz: Vitellinzellen].

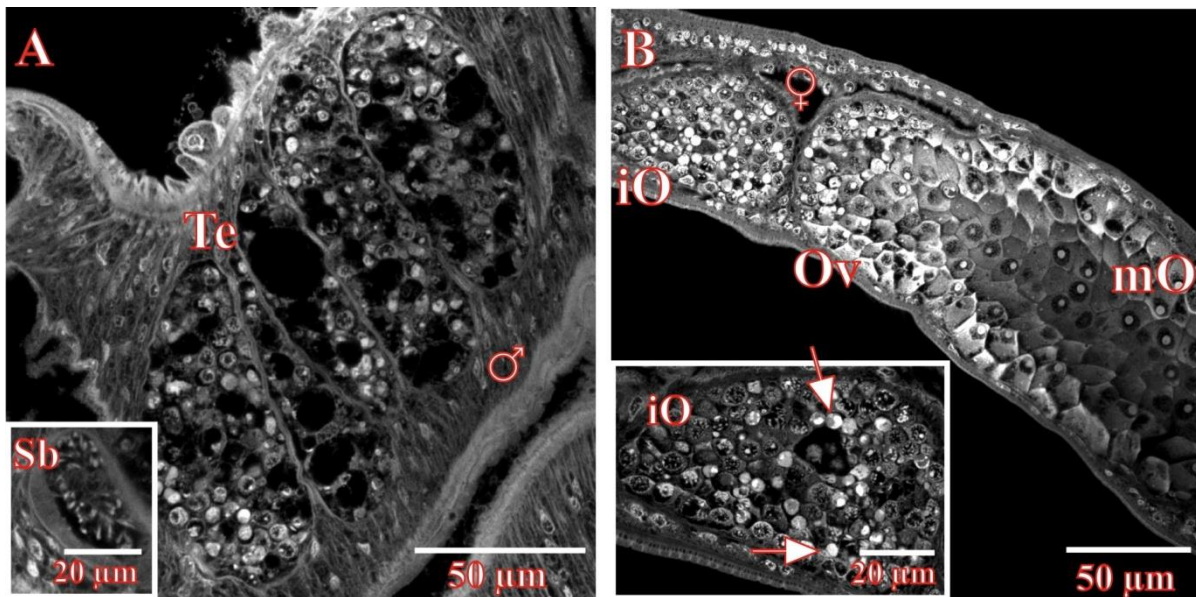
Zur Untersuchung des Einflusses der Inhibitorbehandlung auf die Morphologie behandelter *S. mansoni* wurden Pärchen nach 96 h in Kultur mikroskopisch analysiert. Hierbei konnten für die eingesetzten Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM) weder mit dem Lichtmikroskop noch mit dem KLSM morphologische Unterschiede zwischen behandelten Pärchen und der DMSO-Kontrolle festgestellt werden (siehe Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Mikroskopische Untersuchungen von *S. mansoni*-Pärchen nach *in vitro*-Behandlung mit dem *Frizzled*-*Dvl*-Inhibitor 3289-8625**

*S. mansoni*-Pärchen wurden für 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (50 µM, 100 µM, 200 µM und 400 µM) des *Frizzled*-*Dvl*-Inhibitors 3289-8625 kultiviert. Medium und Inhibitor wurden täglich erneuert. Als Kontrolle dienten Pärchen, welche ausschließlich mit DMSO inkubiert wurden. Nach Ende des Behandlungszeitraums wurden Pärchen aller Ansätze auf morphologische Veränderungen untersucht. Behandelte Pärchen unterschieden sich weder lichtmikroskopisch (400 µM: D) von den Kontrollen (DMSO: A), noch bei einer detaillierteren Betrachtung von Testes und Ovarien mit dem KLSM (DMSO: B, C; 400 µM: E, F). [Te: Testes; Sb: Samenblase; Ov: Ovar; iO: immature Oocyten; mO: mature Oocyten; ♂: Männchen; ♀: Weibchen].

Erste *in vitro*-Kultorexperimente mit einer höheren Inhibitor-Konzentration von 500 µM offenbarten hingegen dramatische morphologische Veränderungen in den Reproduktionsorganen adulter *S. mansoni* (siehe Abb. 3.22). Die Testesloben behandelter Männchen wiesen große löchrige Strukturen auf, während die Samenblasen zusammengeschrumpft waren. Auch im anterioren Bereich der Ovarien waren vereinzelte Löcher zu erkennen und ein Anteil immaturer Oocyten erschien apoptotisch. Desweiteren zeigten die behandelten Würmer sowohl eine hohe Entpaarungsrate als auch eingeschränkte Vitalzeichen wie verminderte Darmperistaltik und eingeschränkte Bewegung.



**Abb. 3.22: Mikroskopische Untersuchungen von *S. mansoni*-Pärchen nach *in vitro*-Behandlung mit 500  $\mu$ M des *Frizzled*-Dvl-Inhibitors 3289-8625**

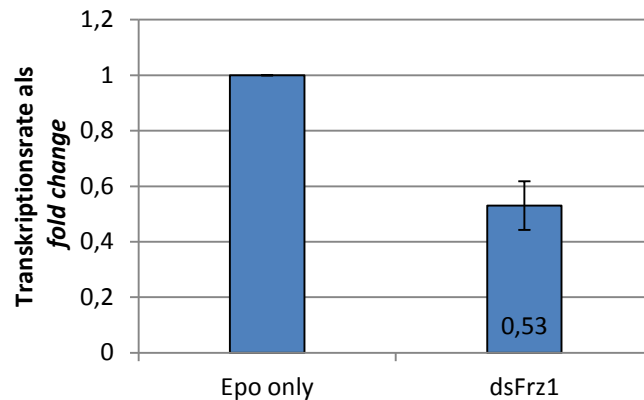
Die Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit einer höheren Konzentration (500  $\mu$ M) des *Frizzled*-Dvl-Inhibitors 3289-8625 für 96 h führte zu massiven morphologischen Veränderungen in den Gonaden. Mit AFA-fixierte und Karminrot-gefärbte Männchen zeigten bei der Analyse mit dem KLSM große löchrige Strukturen in den Testesloben sowie zusammengeschrumpfte Samenblasen (A). Die Ovarie behandelter Weibchen wiesen im anterioren Bereich ebenfalls vereinzelt Löcher auf und ein Teil der immaturren Oocyten erschien apoptotisch (B, Pfeil). [Te: Testes; Sb: Samenblase; Ov: Ovar; iO: immature Oocyten; mO: mature Oocyten; ♂: Männchen; ♀: Weibchen].

### 3.3.3.3 RNAi-Experimente zur funktionellen Analyse der Rolle von SmFrz1 in adulten *S. mansoni*

Nach *in vitro*-Kulturversuchen mit dem *Frizzled*-Dvl Inhibitor 3289-8625 wurden erste RNAi-Experimente durchgeführt, um die SmFrz1-Expression spezifisch zu reduzieren. Hierzu wurde eine dsRNA synthetisiert, welche spezifisch gegen das 3'-Ende der mRNA des *Frizzled*-Rezeptors gerichtet war (5'Frz-C-Term+T7/3'FrzR+T7). Das Einbringen der dsRNA in *S. mansoni* Pärchen erfolgte über Elektroporation. Je Ansatz wurden acht Pärchen mit 25  $\mu$ g dsRNA behandelt und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) wurden Pärchen ohne dsRNA elektroporiert.

Zum Nachweis einer Transkriptreduktion als Folge der dsRNA-Behandlung wurde Gesamt-RNA aus Pärchen extrahiert und im Anschluss an die cDNA-Synthese mittels qPCR untersucht. Zur Amplifikation von SmFrz1-cDNA wurden die Primer 5Smp\_118970-q2 und

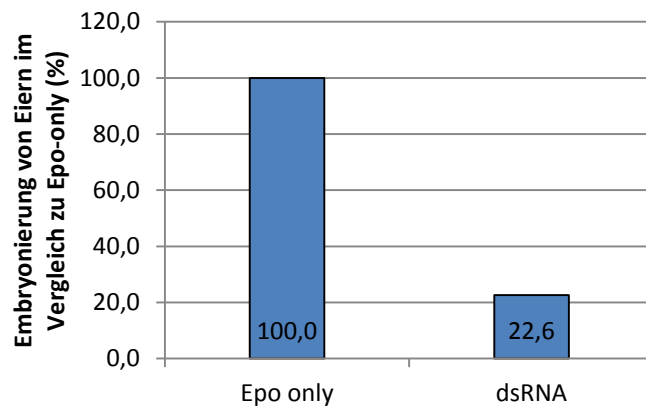
3'Smp\_118970-q2 verwendet. Als Referenzgen diente SmActin (5'Actin-q2/3'Actin-q2). Den qPCR-Ergebnissen zufolge führte eine Behandlung mit SmFrz1-spezifischer dsRNA zu einer Reduktion der Transkriptmenge des Rezeptors auf ca. 53 % im Vergleich zur Kontrolle. (siehe Abb. 3.23).



**Abb. 3.23: Transkriptionsrate von SmFrz1 nach dsRNA-Behandlung adulter *S. mansoni***

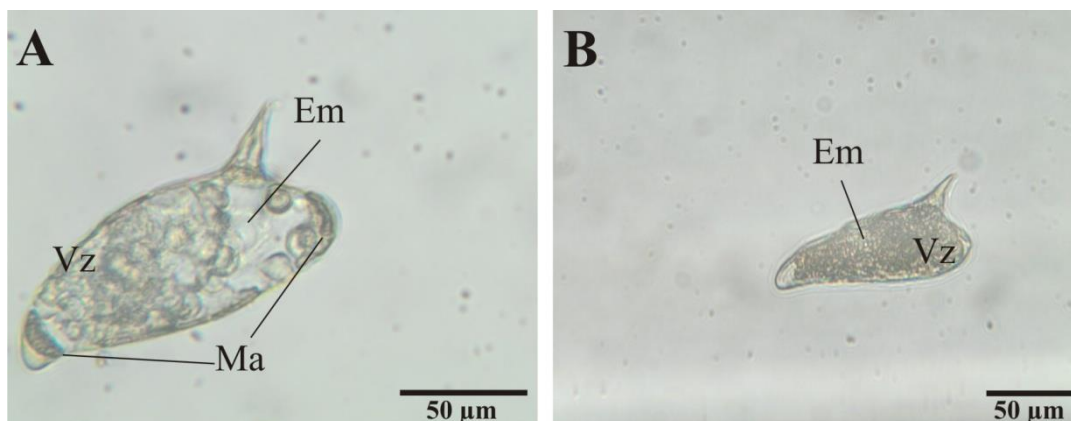
Bestimmung der Transkriptionsrate von SmFrz1 in adulten *S. mansoni* nach RNAi-Experimenten mittels qPCR. Pärchen wurden *in vitro* mit einer spezifisch gegen SmFrz1 gerichtete dsRNA (**dsFrz1**) elektroporiert und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (**Epo only**) dienen Würmer, welche ohne dsRNA elektroporiert wurden. Die Bestimmung der Transkriptmengen von SmFrz1 erfolgte über eine relative Quantifizierung im Vergleich zum Referenzgen SmActin ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode). Im dsRNA-Ansatz konnte eine Reduktion der Transkriptmenge auf ca. 53 % im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ ).

Nachdem eine Reduktion der SmFrz1-Transkripte durch die dsRNA-Behandlung detektiert werden konnte, wurde in Anlehnung an die Inhibitorexperimente zunächst ein möglicher Einfluss auf die Embryogenese der Eier untersucht. Hierzu wurden die Eier 24 h nach Elektroporation aus *Epo only* und dsRNA-Ansätzen eingesammelt und eine Woche bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließende lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass sich in den Schalen der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle nur ca. 22 % der Eier zur Stufe II oder III der Embryogenese weiter entwickelt haben (siehe 3.3.3.2; siehe Abb. 3.24 und 3.25). Mikroskopische Untersuchungen (KLSM) zur Morphologie dsRNA-behandelter Pärchen offenbarten hingegen keine Unterschiede zur *Epo only* Kontrolle (nicht gezeigt).



**Abb. 3.24: Einfluss der SmFrz1-dsRNA-Behandlung auf die Embryogenese von *S. mansoni*-Eiern**

24 h nach der *in vitro*-dsRNA-Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen wurden die Eier in neue Schalen überführt und für eine Woche bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Lichtmikroskopische Analysen der Ansätze zeigte eine Reduktion sich entwickelnder Eier in den dsRNA-Ansätzen auf 22,6 % im Vergleich zur *Epo only*-Kontrolle. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 1).



**Abb. 3.25: Lichtmikroskopische Untersuchung von Eiern aus dsRNA-behandelten *S. mansoni***

Lichtmikroskopische Bilder von Eiern aus *S. mansoni* nach *in vitro*-Behandlung von Pärchen mit SmFrzR1-dsRNA. Die Eier wurden 24 h nach der Elektroporation in frische Schalen überführt und für eine Woche bei 37°C und 5 %CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Eier der *Epo only* Kontrolle (A) zeigten deutliche Hinweise für eine fortschreitende Entwicklung und befanden sich zwischen den Stufen II und III der Embryogenese nach Jurberg et al. (2009). Bei den Ansätzen der dsRNA-Behandlung (B) verblieb hingegen ein wesentlich höherer Anteil der Eier in einem immaturren Zustand. [Em: Embryo; Ma: Makromere; Vz: Vitellinzellen]. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 1).

### 3.3.4 Charakterisierung von zwei FGF-Rezeptoren aus *S. mansoni*

FGFs und ihre Rezeptoren (FGFRs) regulieren ein breites Spektrum zellulärer Funktionen wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Migration (Turner & Grose, 2010). Eine besondere Bedeutung kommt ihnen während der Embryogenese bei der Entwicklung verschiedener Organsysteme zu (De Moerlooze et al., 2000). Aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung unterschiedlicher Tumore sind FGFRs in den letzten Jahren als mögliche *drug targets* stärker in den Focus der klinischen Forschung gerückt, was zur Entwicklung verschiedener Inhibitoren führte (Turner & Grose, 2010; Brooks et al., 2012).

Ähnlich wie Wnt/*Frizzled*-Signalwege zeigen FGFRs und ihre Liganden eine weite Verbreitung innerhalb der *Eumetazoa* und sind in nahezu allen Tierstämmen vertreten (Rebscher et al., 2009). Innerhalb der Invertebraten sind die FGFRs-Homologe der beiden Modellorganismen *D. melanogaster* und *C. elegans* am intensivsten untersucht worden. Neben ihrer Rolle in der Embryogenese sowie Zelldifferenzierung und -migration konnten FGFRs u. a. auch eine Funktion bei der sexuellen Differenzierung und der Regulation der Homöostase zugeordnet werden (Huang & Stern, 2005).

In freilebenden Plattwürmern wie Planarien werden FGFRs mit der Kontrolle der Neoblasten- und Keimzellendifferenzierung in Verbindung gebracht (Ogawa et al., 1998; Ogawa et al., 2002). Ähnliche Hinweise liefern Forschungsergebnisse aus Schistosomen. In einer aktuellen Studie wurden somatische Stammzellen, sog. *neoblast-like stem cells* in adulten *S. mansoni* identifiziert, welche möglicherweise einer Regulation durch das FGFR-Homolog SmFGFR-A (in dieser Arbeit als SmFGFR2 bezeichnet) unterliegen (Collins et al., 2013).

Insgesamt kommen im Genom von *S. mansoni* zwei FGFR-Homologe, SmFGFR1 und SmFGFR2 vor (Hahnel, 2010; Collins et al., 2013). Transkripte beider Rezeptoren konnten im Rahmen dieser Arbeit über gonadenspezifische RT-PCRs in Testes und Ovarien adulter *S. mansoni* nachgewiesen werden (siehe 3.2.1). Für SmFGFR2 wurden diese Ergebnisse außerdem über *in situ*-Hybridisierungen bestätigt (siehe 3.2.2). Zusätzlich durchgeführte qPCRs-Experimente untersuchten weiterhin den Einfluss der Paarung auf die Transkriptionsrate der Rezeptoren in beiden Reproduktionsorganen (siehe 3.2.3).

Zur weiteren Charakterisierung von SmFGFR1 und SmFGFR2 wurden Sequenzanalysen (siehe 3.3.4.1), Inhibitorversuche (siehe 3.3.4.2) sowie erste RNAi-Experimente mit dem Ziel durchgeführt, weitere Hinweise auf eine biologische Funktion von FGFR-Signalwegen in adulten *S. mansoni* zu erhalten (siehe 3.3.4.3).

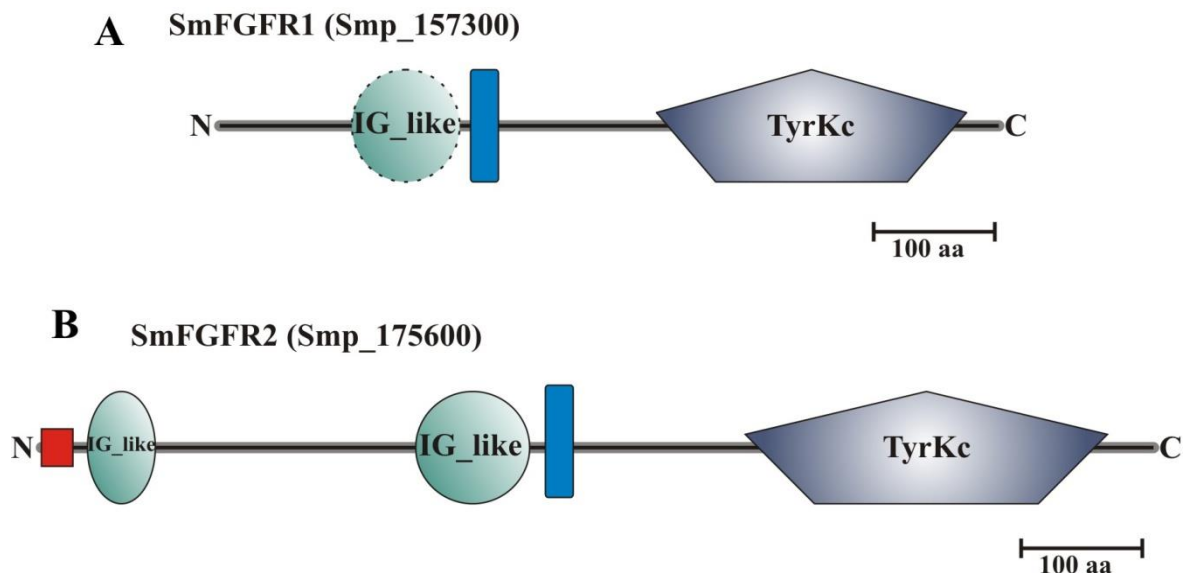
### 3.3.4.1 Aufklärung der SmFGFR1- und SmFGFR2-Sequenzen

Die Sequenzen beider FGFRs sind in der aktualisierten GeneDB (Protasio et al., 2012) unter den GeneIDs Smp\_157300 für SmFGFR1 und Smp\_175600 für SmFGFR2 aufgeführt. Beide CDS konnten über RT-PCRs mit Pärchen-cDNA vollständig amplifiziert und sequenziert werden. Die Sequenz von SmFGFR1 besitzt eine Länge von 1.932 bp (verwendete Primer: 5'FGFR1-2/3'RTK\_C-Term), die von SmFGFR2 ist hingegen 2.757 bp lang (verwendete Primer: 5'FGFR2/3'FGFR2-1). Anschließend wurden SMART-Analysen zur näheren Charakterisierung der Proteinsequenzen durchgeführt mit dem Ergebnis, dass sich beide Rezeptoren im Aufbau ihres extrazellulären Bereichs von FGFRs aus Vertebraten unterscheiden. Letztere besitzen neben einer N-terminalen Signalpeptidsequenz insgesamt drei *IG like*-Domänen, welche u.a. an der Ligandenbindung und der Autoregulation des Rezeptors beteiligt sind (Eswarakumar et al., 2005; Rebscher et al., 2009). In Invertebraten hingegen kann die Zahl der *IG like*-Domänen von zwei, z. B. bei *Dugesia japonica* (Ogawa et al., 2002) bis zu fünf z.B. beim FGFR-Homolog *Heartless* aus *Drosophila* (Gisselbrecht et al., 1996) variieren.

SmFGFR2 (Smp\_175600) besitzt wie die FGFRs aus Planarien eine N-terminale Signal-Sequenz (M<sup>1</sup> bis G<sup>26</sup>) gefolgt von zwei *IG like*-Domänen (SMART ACC: SM000410). Diese befinden sich bei SmFGFR2 zwischen den Aminosäuren T<sup>39</sup> und S<sup>94</sup> sowie zwischen S<sup>310</sup> und M<sup>403</sup>. Insgesamt entfallen auf den N-Terminus 416 Aminosäuren. Hieran schließt sich im Bereich von P<sup>417</sup> bis I<sup>439</sup> eine TMH an. Der intrazelluläre C-Terminus hat eine Länge von 479 Aminosäuren. Die katalytische Tyrosinkinase(TyrKc)-Domäne (SMART ACC: SM000219) ist im Bereich von F<sup>582</sup> bis I<sup>880</sup> lokalisiert. Diese Domäne katalysiert den Transfer von Phosphatgruppen an spezifische Tyrosinreste und ermöglicht so die Interaktion des Rezeptors mit *downstream*-Partnern (Krauss, 2008). Die Gesamtlänge des FGFRs beträgt 918 Aminosäuren (siehe Abb. 3.26).

Während SmFGFR2 somit alle für FGFRs aus Invertebraten charakteristischen Domänen ausweist, fehlen bei dem mit einer Gesamtlänge von 643 Aminosäuren kürzeren SmFGFR1 sowohl die Signalpeptidsequenz am N-Terminus als auch die ersten zwei *IG like*-Domänen. Im Bereich von P<sup>101</sup> bis N<sup>189</sup> befindet sich hingegen eine potentielle *IG like*-Domäne, deren Sequenz-Homologie SMART-Analysen zufolge allerdings nicht signifikant ist. Insgesamt entfallen 198 Aminosäuren auf den extrazellulären Bereich, der mit einer TMH zwischen Position W<sup>199</sup> und W<sup>221</sup> abschließt. Der intrazelluläre C-Terminus hat eine Länge von 422 Aminosäuren inklusive der katalytischen TyrKc-Domäne (L<sup>353</sup> bis L<sup>617</sup>) (siehe Abb. 3.26).

Mit Hinblick auf den unvollständigen N-Terminus ohne Signalsequenz und nur einer potentiellen *IG like*-Domäne, stellt sich die Frage ob der „verkürzte“ Rezeptor SmFGFR1 möglicherweise auf einen Datenbankfehler zurück zu führen ist. *In silico*-Analysen der genomischen Sequenz in 5'-Richtung der SmFGFR1-CDS erbrachten allerdings keine Hinweise auf ein mögliches alternatives Start-Codon bzw. auf Sequenzabschnitte die eine zusätzliche *IG like*-Domäne kodieren würden. Zudem verliefen erste RACE Experimente zur Aufklärung des 5'-Endes ergebnislos (nicht gezeigt). Das mögliche Auftreten von FGFR-Spleißvarianten, wie für SmFGFR1 bereits gezeigt wurde (Hahnel, 2010), wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.



**Abb. 3.26: Sequenzanalyse der FGF-Rezeptoren SmFGFR1 und SmFGFR2**

Die Proteinsequenzen beider FGFR-Rezeptoren, SmFGFR1 und SmFGFR2 wurden zur weiteren Charakterisierung einer SMART-Analyse unterzogen. SmFGFR1 (**A**) besitzt eine Gesamtlänge von 643 Aminosäuren. Der extrazelluläre Bereich enthält eine potentielle *IG like*-Domäne (**türkis, gestrichelt**). Im intrazellulären Abschnitt, C-terminal der TMH (**blau**) ist die katalytische TyrKc-Domäne (**grau**) lokalisiert. SmFGFR2 (**B**) ist mit 918 Aminosäuren länger als SmFGFR1. Innerhalb des 416 Aminosäuren langen N-Terminus befindet sich eine Signalpeptidsequenz (**rot**) sowie zwei *IG like*-Domänen (**türkis**). Die TyrKc-Domäne (**grau**) liegt im intrazellulären Abschnitt (479 Aminosäuren) hinter der TMH (**blau**). [N: N-Terminus; C: C-Terminus]



### 3.3.4.2 Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit dem FGFR-Inhibitor BIBF1120

Um Hinweise auf die Funktion von FGFRs in adulten *S. mansoni* zu erhalten, wurden Pärchen mit dem Angiokinase-Inhibitor BIBF1120 (SelleckChem) *in vitro* behandelt. BIBF 1120 inhibiert spezifisch die Kinaseaktivität humaner *vascular endothelial growth factor*-(VEGF)-, *platelet derived growth factor*-(PDGF)- und FGF-Rezeptoren im enzymatischen Assay mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 20 bis 100 nM (Hilberg et al., 2008). Die Blockierung der katalytischen Funktion erfolgt durch eine Interaktion des Wirkstoffs mit der ATP-Bindungstasche innerhalb der Kinasedomäne dieser Rezeptoren (Hilberg et al., 2008; Roth et al., 2009).

Da BIBF1120 neben FGFRs auch gegen zwei weitere Klassen humaner RTKs gerichtet ist, wurde im Genom von *S. mansoni* über Datenbankrecherchen nach Genen mit Homologie zu VEGFRs und PDGFRs gesucht. Hierbei konnten keine weiteren potentiellen Ziele des Inhibitors außer den beiden hier beschriebenen FGFRs, SmFGFR1 und SmFGFR2 gefunden werden.

Um den Einfluss von BIBF1120 auf die Kinaseaktivität der FGFRs aus *S. mansoni* zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Dr. Colette Dissous und Mathieu Vanderstraete GVBD-Experimente mit der TyrKc-Domäne von SmFGFR1 in *Xenopus*-Oocyten durchgeführt. Hierzu wurde die TyrKc-Domäne über die Primer 5'FGFR1-TK+BamHI und 3'FGFR1-TK+XbaI mit Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA 3.1/V5-His kloniert. Zusätzlich zur Wildtypsequenz (FGFR1-TK\_wt) wurden zwei weitere, über *in vitro*-Mutagenese hergestellte Konstrukte, FGFR1-TK\_ko und FGFR1\_active in *Xenopus*-Oocyten exprimiert. FGFR1-TK\_ko diente als Negativkontrolle, da die Sequenz eine Mutation in der Mg<sup>2+</sup>-Bindungsstelle enthielt, welche über den Aminosäureaustausch von D<sup>506</sup>FG zu D<sup>506</sup>NA zu einer inaktiven Kinasedomäne führte (Beckmann et al., 2011; Gougnard et al., 2011; Ahier et al., 2009). Zur Herstellung einer konstitutiv aktiven Mutante der SmFGFR1-TyrKc-Domäne wurde das Lysin im Motiv YYRK<sup>519</sup> zu einem Glutamat (YYRE<sup>519</sup>) verändert. Dieser Aminosäureaustausch entspricht der Mutation von YYKK<sup>650</sup> zu YYKE<sup>650</sup> des humanen (h)FGFR3, welche zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors führt (Webster et al., 1996; Neilson und Friesel, 1996) (siehe Abb. 3.27). Die beiden Tyrosine in Nähe zu K<sup>650</sup> stellen Phosphorylierungsstellen dar, die im unphosphorylierten Zustand das aktive Zentrum des Enzyms blockieren. Das Einbringen einer negativen Ladung in Nähe dieser Tyrosinreste durch den Austausch K<sup>650</sup>E simuliert deren Phosphorylierung, wodurch es aufgrund von Konformationsänderungen zu einer Öffnung des aktiven Zentrums kommt. Ein Vorgang, welcher beim Wildtyp des hFGFR3 nur durch

Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung erfolgt (Webster et al., 1996; Neilson & Friesel, 1996). Vergleichbare Mutationen führen auch bei anderen RTKs wie beim humanen Insulin-Rezeptor (Hubbard et al., 1994) zu konstitutiv aktiven Kinasedomänen. Gleiches gilt für die Venus-Kinaserezeptoren (VKRs) SmVKR1 und SmVKR2 aus *S. mansoni* (Ahier et al., 2009, Beckmann et al., 2011). Interessanterweise zeigten Sequenzvergleiche mit hFGFR3 und weiteren FGFRs, dass SmFGFR2 im Gegensatz zu SmFGFR1 nicht über das oben beschriebene konservierte Phosphorylierungsmotiv YY(R bzw. K)K verfügt (siehe Abb.3.24).

Die Versuche im *Xenopus*-Oocytensystem wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Wie erwartet führten die Expression von FGFR1-TK\_wt und FGFR1-TK\_ko zu keinem *germinal vesicle breakdown*, während die konstitutiv aktive Variante FGFR-TK1\_active in 70 % bis 80 % der Oocyten den GVBD auslöste. Zugaben von BIBF1120 in Konzentrationen von 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M inhibierten die Aktivität von FGFR-TK1\_active vollständig. Hieraus ergibt sich, dass SmFGFR1 über eine funktionierende katalytische TyrKc-Domäne verfügt und der Inhibitor in der Lage ist, deren enzymatische Aktivität zu inhibieren. Geringere Inhibitorkonzentrationen wurden in dieser Arbeit nicht getestet.

```

DjFgfr1    ...DLSARNILVGEHFEMKIADFGLTRIVD---YYRKKTDGILPVKWMape...
DjFgfr2    ...DLAARNVLVDQYVEMKIADFGLTRIVE---NYRKKTTDGRLPIKWMape...
hFGFR3     ...DLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDVHN-LDYYKKTNGRLPVKWMape...
SmFGFR1    ...DLAARNILVGKHYKLIKIADFGLTRFAE---NYRKMKNGRVPLKWLape...
SmFGFR2    ...DVAARNVVVTEGFVAKLDFGYACTQEESNGYMEMDKEYLAVRWMAPE...
           *: : * * * : * :      * : * * * :      * :      * : * * * * *

FGFR1-TK_ko ...DLAARNILVGKHYKLIKIADNALTRFAE---NYRKMKNGRVPLKWLape...
FGFR1-TK_ac ...DLAARNILVGKHYKLIKIADFGLTRFAE---NYREMKNNGRVPLKWLape...

```

**Abb. 3.27: Sequenzvergleich der TyrKc-Domänen verschiedener FGFRs mit SmFGFR1 und SmFGFR2**

Ausschnitt eines Sequenzvergleichs der TK-Domänen von **SmFGFR1** und **SmFGFR2** mit **hFGFR3** sowie zwei FGFRs aus *Dugesia japonica* (**DjFGFR1**, **DjFGFR2**). Das **DFG**-Motiv (**blaue Box**) ist Bestandteil der  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle und in allen FGFRs erhalten. Ein Aminosäureaustausch von DFG zu DNA (**rot**) führt zu einer inaktiven TyrKc-Domäne (**FGFR1-TK\_ko**). Die für die Aktivierung der TyrKc-Domäne notwendige Aktivierungsschleife enthält die konservierte Sequenz-Abfolge **YYKK**<sup>650</sup> (hFGFR3) bzw. im Falle von DjFGFR1, DjFGFR2 und SmFGFR1 **YYRK** (**grüne Box**).

-Fortsetzung nächste Seite-

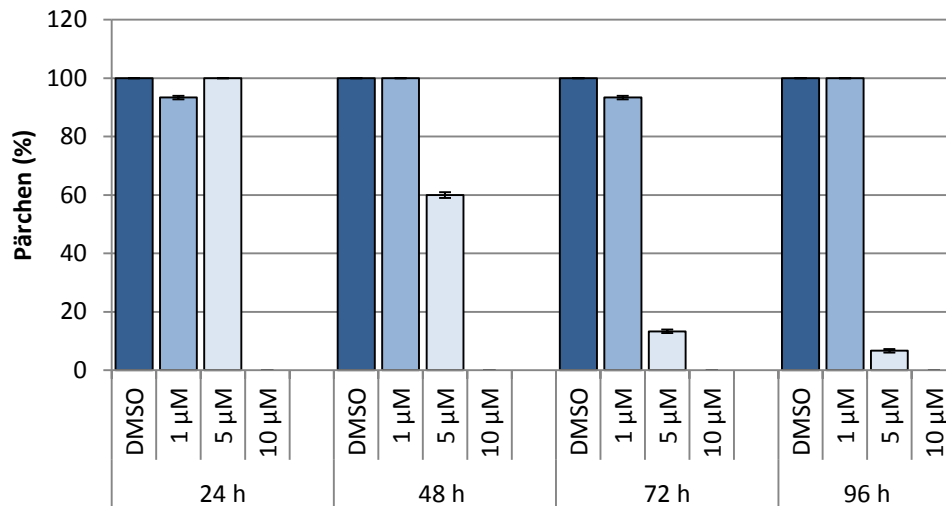
Eine Ligandenbindung und anschließende Rezeptordimerisierung bewirkt eine Phosphorylierung der beiden Tyrosinreste (**Y**) und damit eine Öffnung des aktiven Zentrums durch eine Konformationsänderung der Aktivierungsschleife. Das Einbringen einer negativen Ladung in Form eines Glutamats (**E, rot**) anstelle eines positiv geladenen Lysins (**K**) kann eine Phosphorylierung simulieren und führt so zu einer konstitutiv aktiven Rezeptormutante (**FGFR1-TK\_active**). Auffällig ist, dass sich SmFGFR2 in diesem Bereich von allen anderen FGFRs unterscheidet. Das Auftreten eines Glutamats anstelle des konservierten Lysins (Motiv: **GYME**) wirft die Frage auf, ob SmFGFR2 bereits in einer konstitutiv aktiven Form exprimiert wird oder ob sich der Aktivierungsmechanismus des Rezeptors grundlegend von denen anderer FGFRs unterscheidet.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Inhibitor BIBF 1120 gegen FGFRs aus *S. mansoni* wirkt, wurden Pärchen mit unterschiedlichen Konzentrationen (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) des Wirkstoffs *in vitro* behandelt. Ziel dieser Versuche war es, den Einfluss von BIBF1120 auf die Eiproduktion und Morphologie der Reproduktionsorgane zu untersuchen.

Hierzu wurden *S. mansoni*-Pärchen für 96 h unter täglicher Zugabe frischen Mediums und Inhibitors kultiviert. Die Paarungsstabilität (siehe Abb. 3.28) sowie die Zahl an gelegten Eiern (siehe Abb. 3.29) wurden alle 24 h bestimmt. Als Kontrollen dienten mit DMSO-(Lösungsmittel des Inhibitors)-behandelte Pärchen.

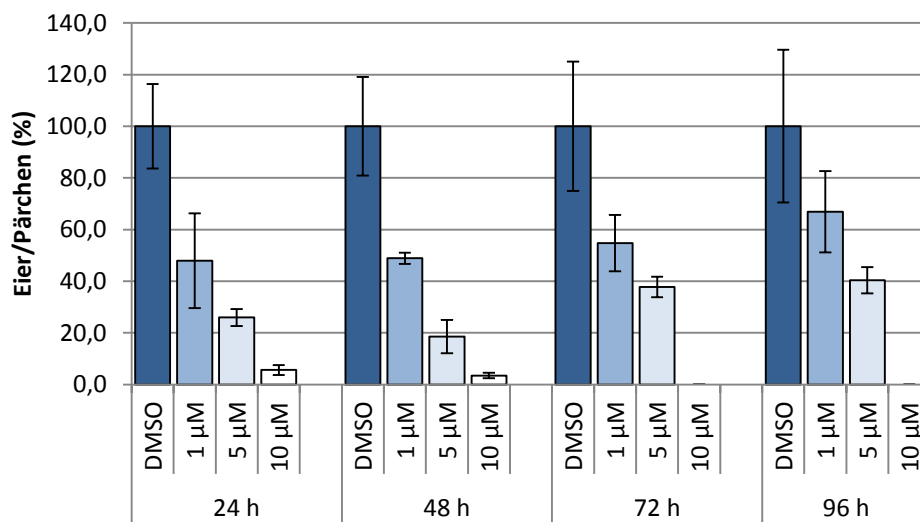
10  $\mu$ M Inhibitor führten bereits nach weniger als 48 h zum Tod der behandelten Parasiten. Eine Konzentration von 5  $\mu$ M hatte ebenfalls einen dramatischen Einfluss auf die Vitalität und die Paarungsstabilität der Würmer. Bereits nach 48 h waren nur noch 60 % der *S. mansoni* gepaart, 24 h später waren kaum noch Pärchen vorhanden (10 % Pärchen im Vergleich zur Kontrolle). Noch drastischer war die Wirkung des Inhibitors auf die Eiproduktion. Der stärkste Effekt zeigte sich hierbei nach 48 h, als die Rate gelegter Eier auf unter 20 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zurück ging.

Im Hinblick auf die Frage nach dem Einfluss von BIBF1120 auf die Reproduktion adulter *S. mansoni* waren die Ergebnisse am interessantesten, welche mit 1  $\mu$ M Inhibitor erzielt wurden. So behandelte Paarungen waren über den gesamten Zeitraum der Versuche stabil (siehe Abb. 3.28) und die Würmer zeigten keine Anzeichen eingeschränkter Vitalität. Trotzdem konnte eine deutliche Reduktion der Eiproduktion auf bis zu unter 50 % schon nach 24 h (siehe Abb. 3.29) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden.



**Abb. 3.28: Einfluss von BIBF1120 auf die Paarungsstabilität adulter *S. mansoni***

*S. mansoni*-Pärchen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM, 5 µM, 10 µM) des FGFR-Inhibitors BIBF1120 über einen Zeitraum von 96 h *in vitro* behandelt. Als Kontrolle dienten Pärchen, die ausschließlich mit DMSO inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss des Inhibitors auf die Paarungsstabilität. Während eine Behandlung mit 1 µM Inhibitor ohne Wirkung blieb, nahm die Anzahl an Pärchen bei 5 µM im Verlauf der Behandlung kontinuierlich ab. Im 10 µM-Ansatz entpaarten sich alle Würmer bereits innerhalb der ersten 24 h. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 3).

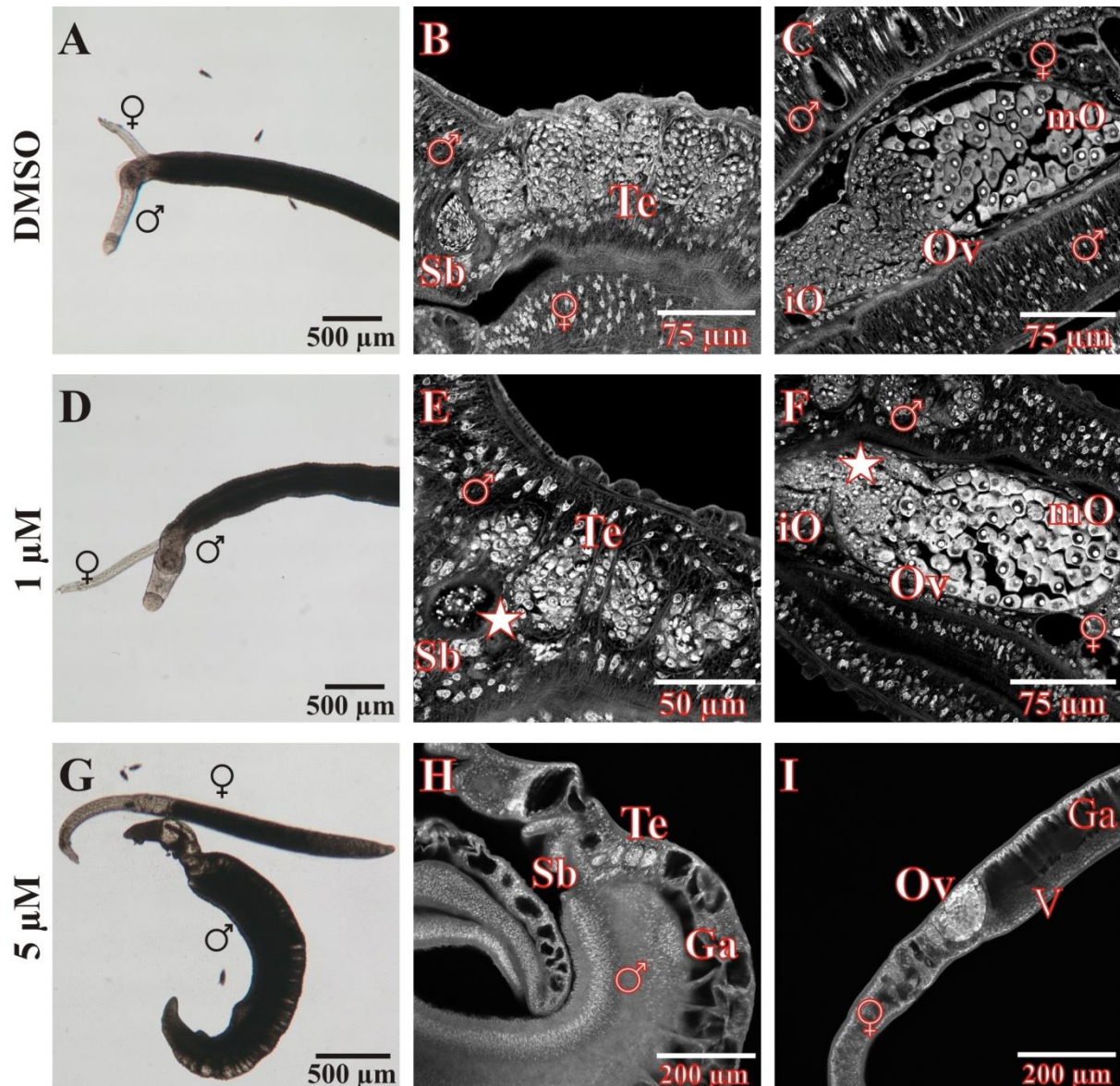


**Abb. 3.29: Einfluss von BIBF1120 auf die Eiproduktion adulter *S. mansoni***

*S. mansoni*-Pärchen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM, 5 µM, 10 µM) des FGFR-Inhibitors BIBF1120 über einen Zeitraum von 96 h *in vitro* behandelt. Als Kontrolle dienten Pärchen, die ausschließlich mit DMSO inkubiert wurden. Hierbei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss des Inhibitors auf die Eiproduktion mit dem deutlichen Effekt bereits nach 24 h. Zu diesem Zeitpunkt reduzierte die Behandlung mit BIBF1120 die Rate gelegter Eier auf ca. 50 % (1 µM) bzw. ca. 20 % (5 µM) im Vergleich zur Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen (10 µM) kam die Eiproduktion zu diesem Zeitpunkt nahezu zum Erliegen. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 3).

Nach 96 h wurden die Würmer mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht. Pärchen, die mit 1  $\mu$ M BIBF1120 behandelt wurden, zeigten unter dem Lichtmikroskop keine Auffälligkeiten und waren von denen der DMSO-Kontrolle nicht zu unterscheiden (siehe Abb. 3.30 **A, D**). Eine nähere Betrachtung der Gonaden mittels KLSM ergab hingegen Hinweise auf eine Beeinflussung der Testes- und Ovarmorphologie. Die Durchmesser der Testesloben schienen im Vergleich zur Kontrolle reduziert und die Samenblase untersuchter Männchen enthielten kaum ausgereifte Spermien (siehe Abb. 3.30 **E**). Im Ovar behandelter Weibchen erschienen immature Oocyten teilweise degeneriert und ohne deutliche Abgrenzungen zueinander (siehe Abb. 3.30 **F**).

Einen wesentlich drastischeren Einfluss auf die Gesamtmorphologie zeigte eine Behandlung mit 5  $\mu$ M Inhibitor. Bereits lichtmikroskopisch erschienen die entpaarten *S. mansoni* aufgequollen und in ihrer Vitalität stark beeinträchtigt (siehe Abb. 3.30 **G**). Die Betrachtung mit dem KLSM offenbarte sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen einen stark angeschwollenen Darm. Die Zellen in Testes und Ovarien erschienen apoptotisch (siehe Abb. 3.30 **H, I**).



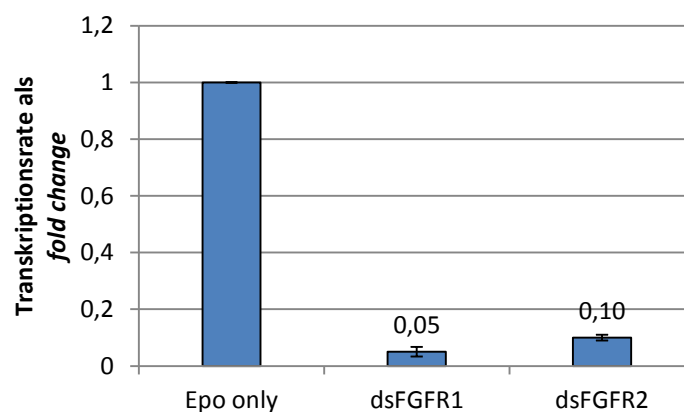
**Abb. 3.30: Mikroskopische Untersuchungen von *S. mansoni*-Pärchen nach *in vitro*-Behandlung mit dem FGFR-Inhibitor BIBF1120**

*S. mansoni*-Pärchen wurden für 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM, 5 µM) des FGFR-Inhibitors BIBF1120 kultiviert (D-I). Medium und Inhibitor wurden täglich erneuert. Als Kontrolle dienten Pärchen, welche ausschließlich mit DMSO inkubiert wurden (A-C). Nach Ende des Behandlungszeitraums wurden Pärchen aller Ansätze mikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht. Pärchen aus dem 1 µM-Ansatz (D) zeigten lichtmikroskopisch keine Auffälligkeiten zur DMSO-Kontrolle (A). Eine detailliertere Betrachtung mit dem KLSM offenbarte einen reduzierten Durchmesser der Testesloben und eine verringerte Anzahl reifer Spermien in der Samenblase (E, Stern). Im anterioren Bereich untersuchter Ovarien erschienen immature Oocyten teilweise degeneriert und ohne deutliche Abgrenzungen zueinander (F, Stern). Eine höhere Inhibitorkonzentration von 5 µM hatte starken Einfluss auf die Vitalität behandelter *S. mansoni*. Bereits lichtmikroskopische sichtbare Aufblähungen der Würmer (G) stellten sich bei einer detaillierteren Betrachtung mit dem KLSM als Schwellungen des Darm heraus (H, I). Zellen von Testes (H) und Ovar (I) erschienen apoptotisch. [Te: Testes; Sb: Samenblase; Ov: Ovar; iO: immature Oocyten; mO: mature Oocyten V: Vitellarium; Ga: Gastrodermis; ♂: Männchen; ♀: Weibchen].

### 3.3.4.3 RNAi-Experimente zur funktionellen Analyse der Rolle von SmFGFR1 und SmFGFR2 in adulten *S. mansoni*

Nach den *in vitro*-Kulturversuchen mit dem FGFR-Inhibitor BIBF1120 wurden erste RNAi-Experimente durchgeführt, um die SmFGFR1- und SmFGFR2-Expression in adulten *S. mansoni* spezifisch zu reduzieren. Zur Synthese spezifischer dsRNAs wurden die Primer 5'RTK\_C-Term+T7(neu) und 3'RTK\_C-Term+T7(neu) für SmFGFR1 sowie 5'FGFR2-insitu+T7 und 3'FGFR2-2+T7 für SmFGFR2 verwendet. Das Einbringen der dsRNA in *S. mansoni*-Pärchen erfolgte über Elektroporation. Je Ansatz wurden acht Pärchen mit 25 µg dsRNA behandelt und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) wurden Pärchen ohne dsRNA elektroporiert.

Zum Nachweis einer Transkriptreduktion als Folge der dsRNA-Behandlungen wurde Gesamt-RNA aus Pärchen extrahiert und im Anschluss an die cDNA-Synthese mittels qPCR untersucht. Zur Amplifikation von SmFGFR1- und SmFGFR2-cDNA wurden die Primer 5'FGFR1-q3 und 3' FGFR1-q3 sowie 5'FGFR2-q und 3'FGFR2-q verwendet. Als Referenzgen diente SmActin (5'Actin-q2/3'Actin-q2). Den qPCR-Ergebnissen zufolge führte eine Behandlung mit SmFGFR1- und SmFGFR2-spezifischer dsRNA zu einer Reduktion der Transkriptmenge der Rezeptoren auf ca. 5 % (SmFGFR1) bzw. 10 % (SmFGFR2) im Vergleich zur Kontrolle. (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: Transkriptionsraten von SmFGFR1 und SmFGFR2 nach dsRNA-Behandlung adulter *S. mansoni***

Bestimmung der Transkriptionsraten von SmFGFR1 und SmFGFR2 in adulten *S. mansoni* nach RNAi-Experimenten mittels qPCR. Pärchen wurden mit spezifisch gegen SmFGFR1 bzw. SmFGFR2 gerichteten dsRNAs (**dsFGFR1**, **dsFGFR2**) elektroporiert und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) dienten Würmer, welche ohne dsRNA elektroporiert wurden. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über eine relative Quantifizierung im Vergleich zum Referenzgen SmActin ( $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). In den dsRNA-Ansätzen konnte eine Reduktion der Transkriptmenge auf ca. 5 % (SmFGFR1) bzw. 10 % (SmFGFR2) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ ).

Obwohl über qPCRs eine deutliche Reduktion der Transkriptmenge beider Rezeptoren nach dsRNA-Behandlung nachgewiesen wurde, konnten bei den behandelten Pärchen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (nicht gezeigt).

#### **3.3.5 Untersuchungen zu zwei Progesteron-bindenden Transmembranrezeptoren und Behandlung adulter *S. mansoni* mit Progesteron**

Das Sexualhormon Progesteron gehört zur chemischen Gruppe der Steroide und steuert bei Säugetieren sowie anderen Vertebraten eine Reihe entwicklungs- und fortpflanzungsrelevanter Prozesse (Penzlin, 1996; Scarpin et al., 2009). Über mögliche biologische Funktionen des Steroidhormons bei anderen Tiergruppen ist hingegen kaum etwas bekannt. Zwar mehren sich Hinweise auf Einflüsse von Progesteron auf verschiedene, meist reproduktionsbiologische Vorgänge bei Mollusken, Insekten und Helminthen, allerdings sind diese meist nicht ausreichend erforscht. Auch gibt es keine gesicherten Erkenntnisse darüber ob, und in welchem Umfang Invertebraten befähigt sind Wirbeltiersteroide wie Progesteron zu synthetisieren (Lafont & Mathieu, 2007; Scott, 2012; Scott, 2013). Hingegen exprimieren viele Invertebraten Gene mit Homologie zu steroidbindenden Rezeptoren von Vertebraten. Hierzu zählen sowohl „klassische“ intrazelluläre Rezeptoren der *nuclear steroid receptor* Superfamilie (Tsai & O'Malley, 1994) als auch verschiedene Gruppen von transmembranen Rezeptormolekülen (Thomas, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten im Genom von *S. mansoni* zwei transmembrane Proteine mit Homologie zu Progesteron-bindenden Rezeptoren gefunden werden. Die Transkription der Rezeptoren SmPMRC1 und SmProgesterinR1 erfolgt nach gonadenspezifischen RT-PCRs in beiden Gonaden adulter *S. mansoni* (siehe 3.2.1). Weiterhin lieferten qPCRs erste Hinweise auf eine paarungsabhängige Regulation der Transkription, sowohl in ganzen Würmern als auch in Testes und Ovarien (siehe 3.2.3). Aufgrund dieser Befunde sollten beide Rezeptoren im Folgenden eingehender charakterisiert werden. Zunächst wurden daher Sequenzanalysen durchgeführt (siehe 3.3.5.1). Um weitere Hinweise auf mögliche Funktionen von Steroidhormonen in adulten *S. mansoni* zu erhalten, wurden Pärchen außerdem mit Progesteron *in vitro* behandelt (siehe 3.3.5.2). Zusätzlich erfolgten erste RNAi-Experimente, um die Transkription beider Rezeptoren in adulten Würmern spezifisch zu reduzieren (siehe 3.3.5.3).



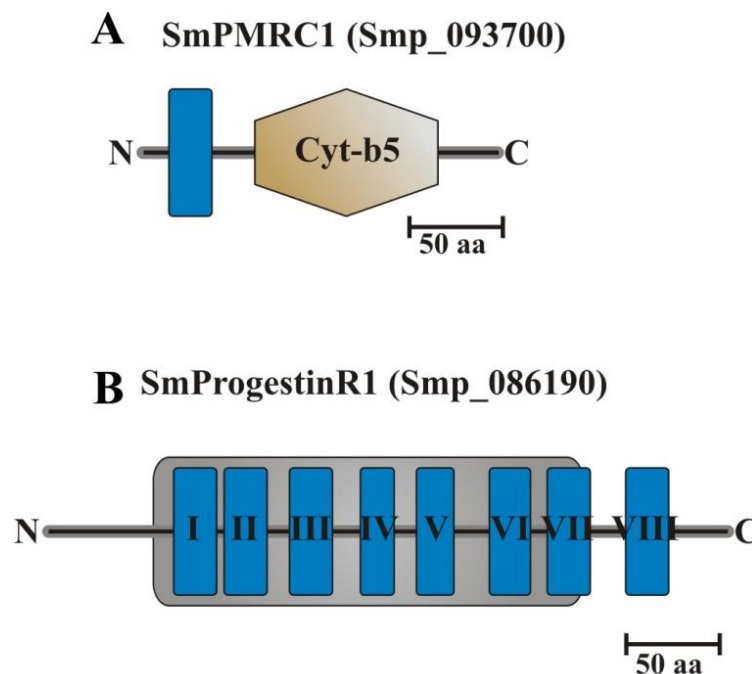
### 3.3.5.1 Aufklärung der Sequenz zweier potentieller transmembranen Progesteron-Rezeptoren SmPMRC1 und SmProgesterinR1

Die CDS der beiden Rezeptoren SmPMRC1 und SmProgesterinR1 konnten im Verlauf dieser Arbeit über RT-PCRs mit Pärchen-cDNA vollständig amplifiziert werden. Hierzu wurden die folgenden Primer verwendet: 5' SmProR1 und 3' SmProR1... (SmPMRC1) sowie 5' Progesterin und 3' Progesterin (SmProgesterinR1). Die Ergebnisse der Sequenzierungen stimmen mit den GeneDB-Einträgen Smp\_093700 für SmPMRC1 und Smp\_086190 für SmProgesterinR1 überein. Blast-Analysen der SmPMRC1 Proteinsequenz offenbarten Homologien des Rezeptors zu *progesterone membrane receptor component* (PMRC)-Proteinen anderer Organismen (siehe Tab. 3.6). SMART-Analysen zufolge besitzt das 190 Aminosäuren lange SmPMRC1 wie auch andere Mitglieder dieser Proteinfamilie einen kurzen intrazellulären N-Terminus (14 Aminosäuren), eine einzelne TMH (von Position V<sup>15</sup> bis L<sup>37</sup>) sowie einen extrazellulären C-Terminus (153 Aminosäuren) inklusive einer *cytochrome b5* (Cyt-b5)-Bindungsdomäne (von Position F<sup>61</sup> bis L<sup>158</sup>, SMART ACC: SM001117) (Thomas, 2008) (siehe Abb. 3.32, A). Diese ist in der Lage, eine Häm-Gruppe zu binden (Gosh et al., 2005) und ist weiterhin für die direkte oder indirekte Interaktion mit Progesteron von Bedeutung. Ihre genaue Funktion ist allerdings bisher nicht im Detail verstanden (Rohe et al., 2009).

Der zweite Rezeptor, SmProgesterinR1, besitzt laut Blast-Analysen Homologie zu den Mitgliedern V und VI der *progesterone and AdipoQ* (PAQ)-Rezeptorfamilie (siehe Tab. 3.7). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Rezeptoren mit einer 7-TMH-Struktur, welche sich analog zur Superfamilie der GPCRs entwickelt hat (Tang et al., 2005). Während einige PAQRs durch Adiponektine aktiviert werden, können PAQR V und PAQR VI wie auch weitere Vertreter dieser Familie Progesteron binden (Zhu et al., 2003; Tang et al., 2005; Smith et al., 2008). Drei weitere PAQRs aus *S. mansoni*, SmAdipoR1 (Smp\_045410), SmAdipoR2 (Smp\_045420) und SmAdipoR3 (Smp\_057130) (Hahnel, 2010) zeigten eine höhere Sequenzähnlichkeit zu Adiponektin-bindenden Rezeptoren und werden daher im Rahmen dieser Arbeit als Adiponektin-Rezeptoren bezeichnet.

Der Rezeptor SmProgesterinR1 hat eine Gesamtlänge von 354 Aminosäuren. Hiervon entfallen 67 Aminosäuren auf den intrazellulären N-Terminus. Die für PAQRs typische *Haemolysin-III related* (Hyl III, PFAM ACC: PF3006)-Transmembrandomäne reicht von Position F<sup>68</sup> bis Y<sup>297</sup> und enthält insgesamt sieben TMHs. Hieran schließt sich im C-Terminus (54 Aminosäuren) eine achte TMH (I<sup>320</sup> bis Y<sup>342</sup>) an (siehe Abb. 3.32, B). Während zusätzliche THMs bei PAQR bisher nicht beschrieben wurden, ist zumindest bei GPCRs das Auftreten einer weiteren Helix (Helix 8) bekannt. Diese spielt unter anderem eine Rolle bei der

Stabilisierung des C-Terminus oder der Rezeptordimerisierung (Dowal et al., 2011; Bruno et al., 2012). Möglicherweise erfüllt die THM VIII in SmProgesterinR1 eine ähnliche Rolle. Alternativ könnte es sich um eine falsche Vorhersage durch SMART handeln. Dies ist z.B. oft bei Signalpeptidsequenzen der Fall, die ähnlich wie THMs über einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren verfügen (Krogh et al., 2001). Interessanterweise besitzt das bei BLAST-Analysen (siehe Tab. 3.7) gefundene Homolog aus *Clonorchis sinensis* ebenfalls eine achte TMH, während das entsprechende Homolog aus *S. japonicum* nur sieben THMs aufweist.



**Abb. 3.32: Sequenzanalyse der potentiellen Progesteron-Rezeptoren SmPMRC1 und SmProgesterinR1**

Die Proteinsequenzen der beiden potentiellen Progesteron-Rezeptoren, **SmPMRC1** und **SmProgesterinR1** wurden zur weiteren Charakterisierung einer SMART-Analyse unterzogen. Der Rezeptor SmPMRC1 (**A**), welcher zur Familie der *progesterone membrane receptor component* (PMRC)-Proteinen gehört, besitzt eine Gesamtlänge von 190 Aminosäuren. Hiervon entfallen 14 auf den intrazellulären N-Terminus. Der extrazelluläre Bereich (153 Aminosäuren) C-terminal der TMH (**blau**) enthält eine Cyt-b5 Bindungsdomäne (**braun**). Der Rezeptor SmProgesterinR1 (**B**), der sich in die *progesterone and AdipoQ* (PAQ)-Rezeptorfamilie einordnen lässt, hat eine Länge von 354 Aminosäuren. An den 67 Aminosäuren langen intrazellulären N-Terminus schließt sich die *Haemolysin-III related*-Transmembrandomäne mit sieben THMs (**I - IV**) an. Im C-Terminus (54 Aminosäuren) befindet sich eine achte TMH (VIII) deren Funktion unklar ist. [N: N-Terminus; C: C-Terminus].

Tab. 3.6: BLAST-Analyse zum potentiellen Progesteron-Rezeptor SmPMRC1

Nr.	Entry	Gen	Art	E-value
1	G4V9R2	Putative membrane associated progesterone rec... Smp_093700	<i>Schistosoma mansonii</i>	8.0×10 <sup>-136</sup>
2	C1LFE1	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Schistosoma japonicum</i>	9.0×10 <sup>-116</sup>
...				
7	L7M742	Putative steroid membrane receptor	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	6.0×10 <sup>-45</sup>
8	E0X658	Progesterin membrane receptor component 1	<i>Penaeus monodon</i>	6.0×10 <sup>-45</sup>
...				
18	K1QJ10	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Crassostrea gigas</i>	2.0×10 <sup>-43</sup>
19	F1NQX1	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Gallus gallus</i>	9.0×10 <sup>-42</sup>
20	E2BWH9	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Harpegnathos saltator</i>	2.0×10 <sup>-41</sup>
21	Q5ZKN2	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Gallus gallus</i>	2.0×10 <sup>-41</sup>
...				
25	D8KY56	Steroid membrane binding protein	<i>Bombus ignitus</i>	6.0×10 <sup>-41</sup>
...				
28	D3TSE3	Putative progesterone receptor membrane compo...	<i>Glossina morsitans</i>	2.0×10 <sup>-40</sup>
...				
31	E2AQY5	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Camponotus floridanus</i>	4.0×10 <sup>-40</sup>
32	M7BGQ3	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Chelonia mydas</i>	4.0×10 <sup>-40</sup>
33	F4W9A3	Membrane-associated progesterone receptor com...	<i>Acromyrmex echinatio</i>	4.0×10 <sup>-40</sup>
...				
49	Q6P2W8	Pgrmc2 protein	<i>Xenopus tropicalis</i>	2.0×10 <sup>-39</sup>
50	A5PJQ6	PGRMC2 protein	<i>Bos taurus</i>	2.0×10 <sup>-39</sup>

Tabelle 3.6 enthält die ersten 50 Ergebnisse zur BLAST-Analyse der SmMPCR1 Proteinsequenz mit der Proteindatenbank UniProt. Ergebnisse die auf Sequenzähnlichkeiten zur Familie der *progesterone membrane receptor component* (PMRC)-Proteine (auch *membrane-associated progesterone receptor component*) anderer Organismen verweisen, wurden farblich hervorgehoben. Als *hypothetical protein* annotierte Einträge wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus der Tabelle.

**Tab. 3.7: BLAST-Analyse zum potentiellen Progesteron-Rezeptor SmProgesterinR1**

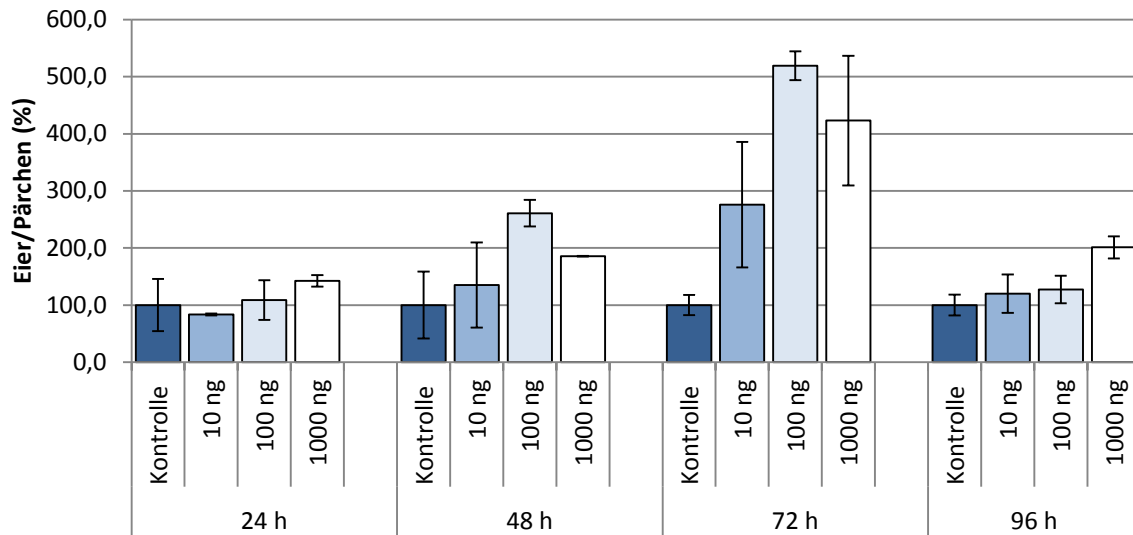
Nr.	Entry	Gen	Art	E-value
1	G4VCE0	Putative progesterin and adipog receptor Smp_086190	<i>Schistosoma mansoni</i>	0.0
2	Q5DDM3	SJCHGC00917 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	0.0
...				
4	G7Y2Y5	Membrane progesterin receptor gamma	<i>Clonorchis sinensis</i>	5.0×10 <sup>-119</sup>
...				
10	G5AR96	Progesterin and adipog receptor family member 6	<i>Heterocephalus glaber</i>	8.0×10 <sup>-57</sup>
...				
16	F1RP12	Progesterin and adipog receptor family member V	<i>Sus scrofa</i>	1.0×10 <sup>-55</sup>
...				
21	L8ICU4	Progesterin and adipog receptor family member 6	<i>Bos grunniens</i>	5.0×10 <sup>-55</sup>
...				
23	Q5TCK7	Progesterin and adipog receptor family member V	<i>Homo sapiens</i>	9.0×10 <sup>-55</sup>
24	Q6TCH4	Progesterin and adipog receptor family member 6	<i>Homo sapiens</i>	9.0×10 <sup>-55</sup>
...				
31	Q0VBT6	Progesterin and adipog receptor family member VI	<i>Mus musculus</i>	4.0×10 <sup>-54</sup>
32	Q6TCG5	Progesterin and adipog receptor family member 6	<i>Mus musculus</i>	4.0×10 <sup>-54</sup>
...				
42	B7Z9R9	Progesterin and adipog receptor family member 6	<i>Homo sapiens</i>	3.0×10 <sup>-53</sup>
...				
46	H2RFA5	Progesterin and adipog receptor family member V	<i>Pan troglodytes</i>	1.0×10 <sup>-52</sup>
47	I6THQ9	Membrane progesterone receptor gamma-1	<i>Pimephales promelas</i>	2.0×10 <sup>-52</sup>
...				
50	Q9NXX6	Membrane progesterin receptor gamma	<i>Homo sapiens</i>	4.0×10 <sup>-52</sup>

Tabelle 3.7 enthält die ersten 50 Ergebnisse zur BLAST-Analyse der SmProgesterinR1 Proteinsequenz mit der Proteindatenbank UniProt. Ergebnisse die auf Homologie zu Mitgliedern V (auch  $\gamma$ ) und VI der *progesterin and Adipog* (PAQ)Rezeptor-Familie verweisen, wurden farblich hervorgehoben. Als *hypothetical protein* annotierte Einträge wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit aus der Tabelle entfernt.

### 3.3.5.2 Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit dem Steroidhormon Progesteron

Obwohl PAQRs und PMRCs eine bedeutende Rolle bei der Entstehung verschiedener Tumore spielen (Rhoe et al., 2009; Thomas, 2012), sind derzeit noch keine kommerziellen Inhibitoren gegen diese Proteinklassen erhältlich, welche im Rahmen dieser Arbeit für erste funktionelle Analysen hätten genutzt werden können. Aufgrund ihrer potentiellen Eigenschaft Progesteron zu binden, wurde daher beschlossen, Pärchen von *S. mansoni* in einem ersten *in vitro*-Experiment mit Progesteron zu behandeln, um gegebenenfalls die Aktivität der beiden Rezeptoren zu stimulieren, um so einen möglichen Einfluss von Progesteron oder strukturell verwandter Stoffe auf die Reproduktion adulter Schistosomen zu untersuchen.

Hierzu wurden *S. mansoni*-Pärchen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Steroidhormons (10 ng/ml bzw. 0,03  $\mu$ M; 100 ng/ml bzw. 0,3  $\mu$ M; 1  $\mu$ g/ml bzw. 3  $\mu$ M) für 96 h in Kultur gehalten. Alle 24 h wurde das Medium (Basch) gewechselt, neues Progesteron (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und die Zahl der gelegten Eier bestimmt (siehe Abb. 3.33). Hierbei zeigte sich nach 48 h ein positiver Einfluss auf die Eiproduktion bei Konzentrationen von 100 ng und 1  $\mu$ g Progesteron pro ml Medium. Der durch die Behandlung hervorgerufene Effekt hatte seinen Höhepunkt nach 72 h. Unter Progesteron-Einfluss legten die behandelten Pärchen ca. 3-mal (10 ng/ml) bis 4-mal (1  $\mu$ g/ml) bzw. 5-mal (100 ng/ml) so viele Eier wie die Kontrollen (siehe Abb. 3.30). Nach 96 h glichen sich die Raten gelegter Eier wieder an, einzig im Ansatz mit der höchsten Progesteron-Konzentration (1  $\mu$ g/ml) war noch ca. die doppelte Menge an Eiern im Vergleich zu den anderen Ansätzen zu finden. Diese waren allerdings teilweise deformiert und es befand sich eine erhöhte Zahl freier Vitellinzellen im Medium (nicht gezeigt).

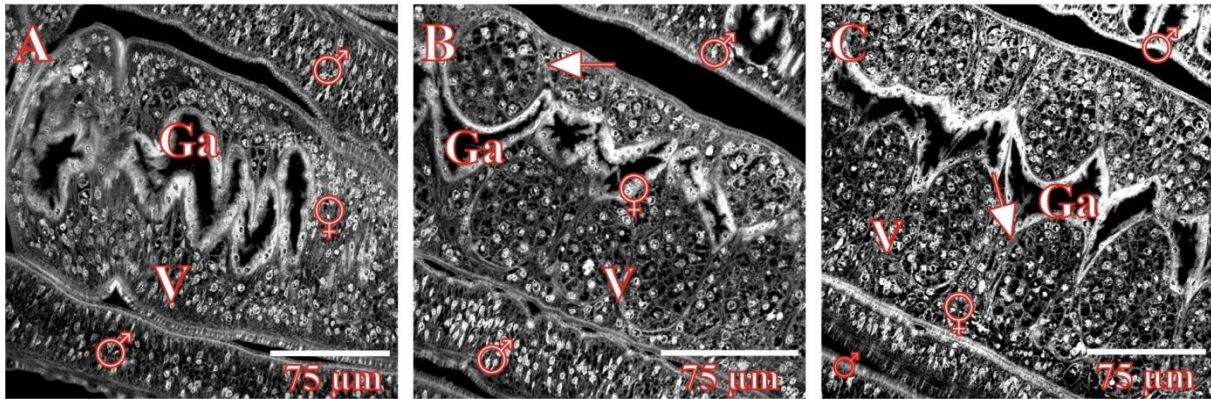


**Abb. 3.33: Einfluss von Progesteron auf die Eiproduktion adulter *S. mansoni***

*S. mansoni*-Pärchen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml) des Steroidhormons Progesteron über einen Zeitraum von 96 h *in vitro* behandelt. Nach 48 h war ein erster positiver Einfluss der Steroidhormon-Behandlung bei Konzentrationen von 100 ng und 1 µg Progesteron je ml Medium auf die Eiproduktion zu verzeichnen. Der stärkste Effekt wurde allerdings nach 72 h erzielt. (Die Anzahl der biologischen Replikate belief sich auf n = 3).

Nach Ende des Behandlungszeitraums wurden *S. mansoni*-Pärchen mittels KLSM auf Veränderungen in den Reproduktionsorganen untersucht. Testes und Ovarien behandelter *S. mansoni* zeigten keine Unterschiede zur Kontrolle (nicht gezeigt). Eine detaillierte Betrachtung des Vitellariums hingegen offenbarte einen Einfluss von Progesteron auf die Struktur der Vitellinloben. Diese erschienen bei Behandlungen mit höheren Konzentrationen (100 ng/ml, 1 µg/ml) auffällig vergrößert im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3.34). Dies spricht möglicherweise für einen stimulierenden Effekt des Steroidhormons auf die Bildung von Vitellinzellen.

Erste Langzeitbehandlungen von adulten Männchen (> 7 Tage) *in vitro* deuteten außerdem einen möglichen positiven Effekt auf die Spermienproduktion an (nicht gezeigt). Entsprechende Experimente bedürfen allerdings einer Wiederholung, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.



**Abb. 3.34: Mikroskopische Untersuchungen von *S. mansoni*-Pärchen nach *in vitro*-Behandlung mit Progesteron**

*S. mansoni*-Pärchen wurden für 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml) des Steroidhormons Progesteron kultiviert. Nach Ende des Behandlungszeitraums wurden Pärchen aller Ansätze mit dem KLSM auf morphologische Veränderungen in den Reproduktionsorganen untersucht. Während Testes und Ovarien in allen Behandlungen unauffällig waren, zeigten Würmer nach einer Inkubation mit höheren Progesteron-Konzentrationen (**B**: 100 ng/ml; **C**: 1 µg/ml) deutliche Veränderungen im Vitellarium. Die Vitellinloben erschienen hier im Vergleich zur Kontrolle (**A**) stark vergrößert (**B, C**: **Pfeil**). [**V**: Vitellarium; **Ga**: Gastrodermis; ♂: Männchen; ♀: Weibchen].

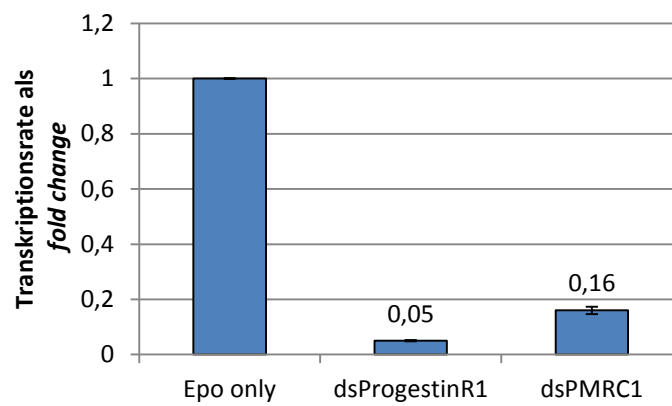
### 3.3.5.3 RNAi-Experimente zur funktionellen Analyse der Rolle von SmPMRC1 und SmProgesterinR1 in adulten *S. mansoni*

Nach den *in vitro*-Kulturversuchen mit dem Steroidhormon Progesteron wurden erste RNAi-Experimente durchgeführt, um die SmPMRC1- und SmProgesterinR1-Expression in adulten *S. mansoni* spezifisch zu reduzieren. Zur Synthese entsprechender dsRNAs wurden die Primer 5'SmProR+T7 und 3'SmProR+T7 für SmPMRC1 sowie 5'ProgesterinR\_C-Term+T7 und 3'ProgesterinR+T7 für SmProgesterinR1 verwendet. Das Einbringen der dsRNA in *S. mansoni*-Pärchen erfolgte über Elektroporation. Je Ansatz wurden acht Pärchen mit 25 µg dsRNA behandelt und anschließend für fünf Tage kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) wurden Pärchen ohne dsRNA elektroporiert.

Zum Nachweis einer Transkriptreduktion als Folge der dsRNA-Behandlungen wurde Gesamt-RNA aus Pärchen extrahiert und im Anschluss an die cDNA-Synthese mittels qPCR untersucht. Zur Amplifikation von SmPMRC1- und SmProgesterinR1-cDNA wurden die Primer 5'ProR-q2 und 3'ProR-q2 sowie 5'Progesterin-q2 und 3'Progesterin-q2 verwendet. Als Referenzgen diente SmActin (5'Actin-q2/3'Actin-q2). Den qPCR-Ergebnissen zufolge führte eine Behandlung mit SmPMRC1- und SmProgesterinR1-spezifischer dsRNA zu einer

Reduktion der Transkriptmenge der Rezeptoren auf ca. 5 % (SmProgestinR1) bzw. 16 % (SmPMRC1) im Vergleich zur Kontrolle. (siehe Abb. 3.35).

Mikroskopische Untersuchungen (KLSM) dsRNA-behandelter Pärchen offenbarten trotz nachgewiesener Transkriptreduktion in keinem der dsRNA-Ansätze morphologische Veränderungen im Vergleich zu Würmern der *Epo only*-Kontrolle (nicht gezeigt).



**Abb. 3.32: Transkriptionsraten von SmPMRC1 und SmProgestinR1 nach dsRNA-Behandlung adulter *S. mansoni***

Bestimmung der Transkriptionsraten von SmPMRC1 und SmProgestinR1 in adulten *S. mansoni* nach RNAi-Experimenten mittels qPCR. Pärchen wurden mit spezifisch gegen SmPMRC1 bzw. SmProgestinR1 gerichteten dsRNAs elektroporiert und anschließend für fünf Tage *in vitro* kultiviert. Als Kontrolle (*Epo only*) dienen Würmer, welche ohne dsRNA elektroporiert wurden. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte über eine relative Quantifizierung im Vergleich zum Referenzgen SmActin ( $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). In den dsRNA-Ansätzen konnte eine Reduktion der Transkriptmenge auf ca. 5 % (SmProgestinR1) bzw. 16 % (SmPMRC1) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. (Die Anzahl der technischen Replikate belief sich auf  $n = 3$ )



## 4. Diskussion

### 4.1 Etablierung einer Methode zur Isolation von Testes und Ovarien aus adulten *S. mansoni* und erste Transkriptionsanalysen ausgewählter Gene

Die Sequenzierung des Genoms (Berrimann et al., 2009; Protasio et al., 2012) stellt einen Meilenstein für die Erforschung der Biologie des Trematoden *S. mansoni* dar. Sie bildet eine wichtige Grundlage für funktionelle Genanalysen, um detailliertere Einblicke in biologische Prozesse innerhalb des Entwicklungszyklus des Parasiten zu erhalten. Allerdings sind der Charakterisierung von Genen aus *S. mansoni* derzeit aus unterschiedlichen Gründen noch enge Grenzen gesetzt. Einer der limitierenden Faktoren ist hierbei der stark eingeschränkte Zugang zu spezifischen Geweben und definierten Zellen, was u.a. im typischen Körperbau der *Acoelomata* begründet ist (Quack et al., 2010). Erste Ansätze, um über einen mechanischen Aufschluss adulter Schistosomen eine Mischung unterschiedlicher Zelltypen zu erhalten und temporär zu kultivieren, erwiesen sich in der Vergangenheit als erfolgreich. Intakte Gewebe oder Organe wurden allerdings durch die mechanische Prozedur zerstört (Dong et al., 2002; Ming et al., 2006). Bisherige Versuche mit dem Ziel über einfache Proteasebehandlungen Zugriff auf innere Organe und Zellen adulter *S. mansoni* zu erhalten, schlugen hingegen fehl (Grevelding & Quack, persönliche Mitteilung). Möglicherweise erwies sich hierbei das Tegument der Würmer als Barriere für einen enzymatischen Abbau subtegumentaler Muskelschichten. Dieses überzieht als syncytiale Schicht den gesamten Körper des Parasiten und wird nach außen durch die, aus mehreren Lipidschichten bestehende Membranocalyx abgeschlossen (van Hellemond et al., 2006). Ein bereits etablierter Ansatz zur Entfernung des Teguments, basierend auf mehreren Zyklen aus abwechselndem Einfrieren und Vortexen der Würmer (Roberts et al., 1983) erschien nicht geeignet, da die Zellen durch Kontakt zum flüssigen Stickstoff geschädigt werden. Daher entwickelte Dr. Thomas Quack aus der Arbeitsgruppe von Prof. Grevelding eine Kombination aus Detergenzienbehandlung und nachfolgendem Proteaseverdau, um Tegument und Muskulatur aufzulösen. Ein Einsatz milder Detergenzien erwies sich als zweckdienlich das Tegument zu entfernen, ohne die weitere Struktur männlicher und weiblicher *S. mansoni* zu beeinträchtigen. Eine anschließende Behandlung weiblicher Würmer mit Col/Dis. führte zur Freisetzung von morphologisch intakten Ovarien. Anschließende Versuche zur RNA- (eigene Beobachtungen) und Protein-

Isolation (Quack, persönliche Mitteilung) schlugen allerdings fehl, was auf eine negative Beeinträchtigung der Zellen schließen lässt.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit das vorhandene Ausgangsprotokoll zur Isolation von Ovarien aus maturen Weibchen so modifiziert werden, dass die gewonnenen Organe vitale Zellen enthalten. Außerdem war es das Ziel, das Protokoll an eine Gewinnung von Ovarien aus immaturren Weibchen und Testes aus paarungserfahrenen und -unerfahrenen Männchen zu adaptieren. Hierfür erwiesen sich eine Reduzierung von Detergenzienkonzentration und Inkubationsdauer sowie die Verwendung von Elastase als Alternative zu Col/Dis. als erfolgreich. Durch die Behandlung kam es zum Aufschluss des parenchymatischen Gewebes und zur Freisetzung von Gonaden sowie unterschiedlicher Zelltypen. Testes bzw. Ovarien waren frei von anderen Zellen und Geweben und konnten über einfache Pipettierschritte eingesammelt und effizient angereichert werden. Zusätzlich wurde auch der Zugriff auf andere Gewebe wie z.B. Vitellarium und Darm ermöglicht. Unter den freigesetzten Zelltypen erschienen vor allem S4-Vitellinzellen als prominent, da sie sich aufgrund der Einlagerung von Lipiden und Eischalenvorläuferproteinen (Erasmus, 1975; Erasmus & Popiel, 1980) farblich gut von anderen Zellen absetzen.

Anschließende Trypanblau-Färbungen zeigten, dass die Zellen isolierter Testes und Ovarien mehrheitlich vital waren. Daher wurden im folgenden Gesamt-RNAs aus Gonaden paarungserfahrener und -unerfahrener Individuen beider Geschlechter extrahiert. Diese waren qualitativ vergleichbar mit Extraktionen von Gesamt-RNA aus vollständigen Würmern. Quantitative Analysen ergaben für Testes paarungsunerfahrener und -erfahrener Männchen vergleichbare Mengen an Gesamt-RNA pro Organ, wobei letztere einen leicht höheren RNA-Gehalt aufwiesen. Dies deckt sich mit den Erwartungen, da paarungsunerfahrene Männchen bereits über vollständig entwickelte Testes verfügen (Armstrong, 1965). Leicht reduzierte Lobengrößen paarungsunerfahrener Männchen, wie sie über eine morphologische Studie festgestellt wurden (Neves et al., 2005), spiegeln sich hierbei möglicherweise in dem etwas geringeren RNA-Gehalt wider. Große Unterschiede zeigten sich hingegen beim Vergleich von Ovarien maturer und immaturren Weibchen. Erstere besitzen einen 33-fach höheren RNA-Gehalt je Organ. Gründe hierfür liegen im paarungsinduzierten Wachstum und der Differenzierung des Ovariums sowie einer vermehrten mRNA-Speicherung primärer Oozyten für die Embryogenese (Clarke, 2012). Zusammenfassend bestätigten diese Analysen die Extraktion von Gesamt-RNA aus Testes und Ovarien in ausreichender Qualität und Quantität für weiterführende molekularbiologische Anwendungen. Aus den isolierten Organen konnten

auch Proteine in guter Qualität und Menge für Immuno-Blots extrahiert werden, wie Dr. Thomas Quack und Zhigang Lu zeigten (Hahnel et al., 2013).

Als nächsten Schritt verwendete ich Gesamt-RNAs aus Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni*, um mittels RT-PCRs die Transkription ausgewählter Gene in den Gonaden zu untersuchen. Die hier betrachteten Gene ließen sich in drei Gruppen einteilen. 1.) Gene, deren Transkription/Expression in Testes und/oder Ovarien bereits in früheren Studien beschrieben wurde. 2.) Gene, deren Transkription/Expression bisher in anderen Geweben adulter *S. mansoni* nachgewiesen wurde, nicht aber in den Gonaden. 3.) Gene, deren Transkription/Expression in adulten *S. mansoni* bisher noch nicht beschrieben wurde, deren Homologie zu charakterisierten Genen anderer Organismen aber auf potentielle biologische Funktionen in den Gonaden hinweist.

Zur ersten Gruppe gehörten u.a. die kleine GTPase SmRho1, die Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 und ein *egg shell precursor*-Protein. Frühere Lokalisationsstudien mittels *in situ*-Hybridisierung detektierten Transkripte dieser Gene u.a. in Testes und Ovarien (Quack et al., 2009; Beckmann et al., 2010a) bzw. im Falle des *egg shell precursor*-Proteins (Buro et al., 2013) in Ovarien aber nicht in den Testes. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit mittels gonadenspezifischer RT-PCRs bestätigt werden. Weitere Gene dieser ersten Gruppe sind die Proteindisulfidisomerase SmPDI und die katalytische Untereinheit der Calcium-abhängigen Serin/Threonin Phosphatase SmCNA. Die Transkription bzw. Expression beider Gene wurde in früheren Studien u. a. in den Testes nachgewiesen (Finken et al., 1994; Mecozzi et al., 2000; Knobloch et al., 2004). Dies konnte hier über gonadenspezifische RT-PCRs bestätigt und zusätzlich um eine Transkription in Ovarien erweitert werden. Entsprechendes erscheint plausibel, da sowohl PDI als auch Calcineurine in weiblichen Reproduktionsorganen anderer Organismen exprimiert werden (Dorner et al., 1990; Talakhun et al., 2012). Calcineurine spielen z.B. eine Rolle bei der Regulation des Meiose-Arrests von *Drosophila*-Oocyten (Takeo et al., 2012). Die Transkripte weiterer Gene wie SmFKBP12, SmT $\beta$ R-1, SmVKR1 und SmVgl1 wurden im Rahmen früherer Studien im Ovar detektiert (Vicogne et al., 2003; Knobloch et al., 2004; Skinner et al., 2012). Hingegen konnte hier über gonadenspezifische RT-PCRs Transkripte dieser Gene in jeweils beiden Gonaden nachgewiesen werden. Da das Immunophilin FKBP12 (Rossi et al., 2002; Knobloch et al., 2004) und der TGF $\beta$ -Rezeptor SmT $\beta$ R-1 (Knobloch et al., 2004; LoVerde et al., 2009) wichtige Komponenten des TGF $\beta$ -Signalwegs darstellen, lassen diese Ergebnisse des Schluss zu, dass der entsprechende Signalweg möglicherweise auch in den Testes etabliert ist. Auch

mit Hinblick auf die RTK SmVKR1 dienen die RT-PCR-Ergebnisse dazu, die in den Testes beschriebenen Signalwege um eine weitere Komponente zu erweitern. Der Nachweis von Transkripten des Vasa-like Gens SmVlg1 in den Testes ist ebenso nachvollziehbar, da die RNA-Helikase Vasa in vielen Organismen einen wichtigen Stammzellmarker darstellt und vielfach auch in Zellen männlicher Reproduktionsorgane exprimiert wird (Castrillon et al., 2000; Noce et al., 2001). Die hier auftretenden Unterschiede zu früheren Lokalisationsstudien liegen möglicherweise einer höheren Sensitivität der RT-PCR im Vergleich zu *in situ*-Hybridisierungen oder der Immunohistologie zugrunde. Diese kann vor allem bei schwach transkribierten bzw. exprimierten Genen von Bedeutung sein, die gegebenenfalls unter die Nachweisgrenze der letztgenannten Methoden fallen.

Die zweite Gruppe umfasst mit SmHSP70, SmSPRM1hc, SmAQP1, SmGTP4 und SmNPP-5 Gene, die bisher u.a. als tegumental exprimiert in Erscheinung getreten sind (Wippersteg et al., 2002; Krautz-Peterson et al., 2007; Faghiri et al., 2010; Krautz-Peterson et al., 2010; Bhardwaj et al., 2011). Transkripte der beiden ersten Gene konnten über gonadenspezifische RT-PCRs in Testes und Ovarien nachgewiesen werden. Dies spricht für ein ubiquitäres Expressionsmuster von SmHSP70 und SmSPRM1hc in adulten *S. mansoni*, die als Chaperon bzw. aminosäuretransportierende Permease konservierte zellbiologische Funktionen erfüllen, welche in nahezu allen Zelltypen von Bedeutung sind (Verrey et al., 1999; Verrey et al., 2000; Kampinga & Craig, 2010; Young, 2010; Fotiadis, et al., 2013). Weiterhin wurde eine SmAQP-Transkription mittels RT-PCRs in den Testes detektiert, während SmGTP4- und SmNPP-5-Transkripte weder in den Testes noch in Ovarien gefunden wurden. Aquaporine sind transmembrane Proteine, die als Kanäle den Transport von Wasser und kleineren Molekülen über die Zellmembran erleichtern. SmAQP konnte über Immunohistologie (Faghiri et al., 2010) und im Rahmen mehrerer Proteomstudien (Braschi et al., 2006; Castro-Borges et al., 2011) im Tegument adulter *S. mansoni* nachgewiesen werden. Das Potential zum Transport von Mannitol, Fruktose und Alanin spricht für eine Rolle von SmAQP bei der Aufnahme von Nährstoffen sowie Entgiftungsprozessen (Faghiri & Skelly, 2009; Faghiri et al., 2010). Keine der Studien untersuchte allerdings eine Expression des Aquaporins in den Reproduktionsorganen. Damit liefern die hier durchgeführten RT-PCRs erste Hinweise auf eine Transkription von SmAQP in den Testes. Sowohl in Vertebraten, wie einigen Nagerarten (Calamita et al., 2001) als auch in Invertebraten, wie *C. elegans* (Huang et al., 2007), konnten verschiedene Aquaporine bereits in männlichen Reproduktionsorganen nachgewiesen werden, wo sie u.a. in die Spermatogenese involviert sind. Eine weitere Studie zum Trematoden *Fasciola gigantica* identifizierte neben dem Tegument das Epithelgewebe von Testes und

Ovarien als Expressionsorte für zwei Aquaporine (Geadkaew et al., 2011). Dies spricht für die Möglichkeit, dass SmAQP neben einem (Nähr-)Stofftransport über das Tegument auch in die Reproduktion von *S. mansoni* involviert ist. Ein Nachweis von SmAQP mittels eines spezifischen Antikörpers in testesspezifischen Proteinlysate schlug allerdings fehl (Hahnel et al., 2013). Daher wäre es auch denkbar, dass SmAQP-Transkripte in den Testes auf eine *leaky*-Transkription zurückzuführen sind, bzw. aufgrund posttranskriptioneller Regulation nicht translatiert werden. SmGTP4- und SmNPP-5-Transkripte wurden hingegen nicht über RT-PCRs in den Gonaden nachgewiesen, was sich mit vorherigen Studien deckt, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Funktionen beider Gene eng mit tegumentalen Prozessen assoziiert sind. SmGTP4 reguliert als Glukose-Transporter die Aufnahme des Zuckers über das Tegument (Krautz-Peterson et al., 2010), während SmNPP-5 (Bhardwaj et al., 2011) eine Rolle bei der Parasit-Wirtsinteraktion zu spielen scheint.

Die dritte Gruppe ausgewählter Gene umfasst SmOGT1, SmAxDyn und SmRingoA. Transkripte der potentiellen Glykosyltransferase SmOGT1 wurde sowohl in Testes als auch in Ovarien nachgewiesen. *O-linked N-acetylglucosamine*-Transferasen (OGTs) sind stark konservierte Proteine im Tier- und Pflanzenreich, die u.a. direkt an Prozessen zur epigenetischen Genregulation in Stammzellen beteiligt sind (Pietersen & van Lohuizen, 2008; Sinclair et al., 2009). Dies legt die Vermutung nahe, dass SmOGT1 in Stammzellen der Reproduktionsorgane eine vergleichbare Rolle einnimmt. Transkripte des potentiellen axonemalen Dynein SmAxDyn und dem Speddy/Ringo-Homolog SmRingoA wurden wie erwartet in den Testes detektiert. Aus anderen Organismen ist bekannt, dass beide Proteine u.a. als Bestandteile von Cilien bzw. Zellzyklusregulatoren in die Spermatogenese involviert sind (Cheng et al., 2005; Fatima, 2011).

Zusammenfassend konnten durch erste testes- und ovarspezifische Transkriptionsanalysen mittels RT-PCR zum einen die Ergebnisse älterer Studien zur Transkription von Genen in den Gonaden bestätigt werden (siehe z.B. SmRho1, SmTK6, *egg shell precursor*-Protein). Zum anderen wurden die Ergebnisse älterer Studien zur Transkription von Genen um eine Lokalisation in Testes und/oder Ovarien erweitert (siehe z.B. SmCNA, SmT $\beta$ R-1, SmSPRM1hc, SmAQP). Schließlich gelang auch der Nachweis der Transkription einiger bisher nicht charakterisierter Gene in den Gonaden (z. B. SmOGT1, SmAxDyn, SmRingoA).

Darüber hinaus lieferten die RT-PCR-Analysen in Hinblick auf die Gonaden Hinweise auf testes-, oder ovarspezifisch transkribierte Gene wie z.B. SmAxDyn, oder das *egg shell precursor*-Protein, welche in zukünftigen Analysen als organspezifische Marker dienen

könnten. Ebenso wichtig sind Gene wie SmGTP4 und SmNPP-5, die keine Transkription in den Gonaden zeigten und damit gegebenenfalls im Rahmen zukünftiger Untersuchungen wichtige Negativkontrollen darstellen.

Eine einzige Studie untersuchte bislang umfassend eine gewebespezifische Transkription von Genen in adulten *S. mansoni*. Diese erfolgte über die Lasermikrodissektion (LMD) definierter Gewebe wie Testes, Ovarium, Vitellinloben und Gastrodermis in Kombination mit Microarray(MA)-Analysen (Nawaratna et al., 2011). Auf diese Weise wurden für jedes Gewebe Datensätze mit Genen erstellt, die im Vergleich zum restlichen Wurm quantitativ stärker transkribiert werden. Ein Vergleich der hier vorliegenden Ergebnisse mit den Daten von Nawaratna et al. (2011) zeigte z.B. für die Gene SmCNA und SmHSP70 Übereinstimmungen bezüglich einer Transkription im Ovar (siehe 3.1.4). Allerdings sind viele andere Gene, auch solche deren Lokalisation in den Gonaden bereits über andere Methoden bestätigt wurde, wie z.B. SmRho1 und SmPDI, nicht in den MA-Datensätzen vorhanden. Dies kann darin begründet liegen, dass einige Gene aufgrund der quantitativen Aussage der MA-Studien nicht berücksichtigt werden, während RT-PCRs bezüglich der Anwesenheit von Transkripten eine klare Ja/Nein-Antwort liefern. Weiterhin können über LMD nur geringe Mengen biologisches Material mit relativ großem Aufwand gewonnen werden. Besonders schwach transkribierte Gene fallen daher möglicherweise unter die Nachweisgrenze. Weitere Limitierungen erfährt die Methode dadurch, dass bei der LMD Kontaminationen mit Zellmaterial des umliegenden Gewebes nicht vollständig ausgeschlossen werden können und die Isolation besonders kleiner Gewebe wie immaturer Ovarien schwer zu bewerkstelligen ist. Auch eine Untersuchung gewebespezifischer Unterschiede auf Proteinebene ist aufgrund geringer Gewebemengen kaum möglich.

Zusammenfassend bietet die im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelte Methode zur Organisolation Zugriff auf Testes und Ovarien aus paarungserfahrenen und -unerfahrenen *S. mansoni*. Die effektive Isolation und Anreicherung dieser Organe, basierend auf einer kombinierten Detergenzien-/Proteasebehandlung kann in großen Mengen und unter einfachen Laborbedingungen erfolgen. Die hier durchgeführten Analysen isolierter Organe zeigten, dass die Mehrheit der Zellen in den Organen vital ist und die Organe als Quelle für RNA in ausreichender Menge und Qualität für nachfolgende molekularbiologische Anwendungen dienen können.

Um eine Anwendbarkeit der Methode für gewebespezifische Transkriptionsanalysen zu belegen, wurden erste RT-PCRs mit RNA aus Testes und Ovarien paarungserfahrener

*S. mansoni* durchgeführt. Die hierbei erzielten Ergebnisse bestätigen und/oder ergänzen frühere Transkriptionsstudien ausgewählter Gene bezüglich einer Transkription in den Gonaden. Außerdem liefern sie erste Hinweise auf die Transkription weiterer, bisher nicht untersuchter Gene in diesen Organen. Hieraus wird der Nutzen gonadenspezifischer RT-PCR-Ansätze deutlich, um z. B. andere, wesentlich zeitaufwendigere Lokalisationmethoden wie *in situ*-Hybridisierung und Immunohistologie zu verifizieren und aufgrund höherer Sensitivität zu ergänzen. Außerdem kann sie aufgrund ihrer Praktikabilität und schnellen Durchführbarkeit anderen kostenintensiveren und zeitaufwendigeren Methoden vorangestellt werden, um Gene mit potentiellen biologischen Funktionen in Testes und Ovarien zu identifizieren.

Zusätzlich konnte durch Dr. Thomas Quack und Zhigang Lu gezeigt werden, dass sich die isolierten Gonaden auch für eine Extraktion von Proteinen und nachfolgende Analysen wie Immuno-Blots eignen, die bei Verfügbarkeit spezifischer Antikörper einen Nachweis der Proteinexpression in Testes und Ovarien ermöglichen (Hahnel et al., 2013). Weitere Anwendungsmöglichkeiten, die sich hieraus ergeben sind z.B. gewebespezifische Interaktionsstudien über Co-Immunopräzipitation oder Untersuchungen posttranslationaler Modifikationen. Diese Ansätze wurden in Schistosomen bisher nur in heterologen Systemen bzw. auf Ebene ganzer Würmer verfolgt (Beckmann et al., 2011; Long et al., 2012; Luo et al., 2012).

Die Verfügbarkeit von RNA und Protein aus den Gonaden adulter *S. mansoni* bildet darüber hinaus eine wichtige Basis für vergleichende Subtranskriptom- und Subproteomstudien auf Ebene der Gonaden und könnte vor allem bei der Frage nach paarungsinduzierten Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen in Testes und Ovarien neue und entscheidende Erkenntnisse liefern. Entsprechende Vergleiche des Transkriptoms/Proteoms von Gonaden aus paarungserfahrenen und -unerfahrenen *S. mansoni* aber auch zwischen Testes und Ovarien eines Paarungsstatus wären nützlich, um neue Schlüsselgene in der Reproduktion adulter *S. mansoni* zu identifizieren und z.B. das Bild gonadenspezifischer Signalprozesse entscheidend zu erweitern. Ein Vergleich von Transkriptom und Proteom spezifischer Organe könnte darüber hinaus Aufschluss geben, welche Transkripte wirklich translatiert oder z.B. im Hinblick auf mature Ovarien, für die spätere Embryogenese gespeichert werden.

Das hier etablierte Protokoll zur Gonadenisolation bietet darüber hinaus Zugang zu anderen Geweben und Zellen. Zukünftige Ziele werden sein, das Ausgangsprotokoll für die Isolation von Vitellinloben, Gastrodermis u.a. Geweben zu optimieren, um gewebespezifische Gen-

sowie Transkriptom/Proteomanalysen weiter voran zu treiben. Gleiches gilt für die Isolation unterschiedlicher Zelltypen z.B. über *fluorescence activated cell sorting* (FACS) zur Beantwortung zellspezifischer Fragestellungen. Besonders bedeutsam für die Erforschung der Reproduktionsbiologie von *S. mansoni* wird dabei die Aufreinigung von S1 bis S4 Vitellinzellen und ihre weiterführende Analyse sein. Außerdem bildet die Verfügbarkeit von Stammzellen, wie sie in den Gonaden und somatischen Gewebe vorhanden sind (Collins et al., 2013), eine wichtig Voraussetzung zur Etablierung dringend benötigter schistosomaler Zelllinien. Diese könnten vielfältig genutzt werden, z.B. zur Expression von Proteinen im homologen System sowie zur Etablierung von Transfektionsmethoden und anschließender Gencharakterisierungen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden gonadenspezifische RT-PCRs erstmals eingesetzt, um die Transkription ausgewählter Transmembranrezeptoren in Testes und Ovarien zu untersuchen und erste Hinweise auf eine paarungsabhängige Regulation der Transkriptionsraten dieser Rezeptoren in diesen Organen zu erhalten. Entsprechende Ergebnisse werden unter 4.2 diskutiert.

## **4.2 Lokalisationsstudien und erste Analysen zur paarungsabhängigen Transkription von Transmembranrezeptoren in adulten *S. mansoni***

Auf der Suche nach alternativen Behandlungsstrategien zur Bekämpfung der Schistosomiasis ist in den letzten Jahren u.a. die außergewöhnliche Reproduktionsbiologie des Parasiten in den Focus der Grundlagenforschung gerückt. Bei einer molekularbiologischen Betrachtung der paarungsinduzierten sexuellen Reifung des Weibchens konnten u.a. verschiedene CTKs wie die Src-Kinase SmTK3, die Syk-Kinase SmTK4 und Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 mit Schlüsselrollen in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen der Reproduktionsorgane ausgemacht werden. Hiervon ausgehend wurden über Y2H-Screenings und Interaktionsstudien Bindungspartner dieser Kinasen identifiziert und so das Bild reproduktionsrelevanter Signalwege kontinuierlich erweitert. Hierbei zeigte sich, dass viele dieser Signalkaskaden aus Ovarien und Vitellarium auch in den Testes angelegt und dort in die Spermatogenese involviert sind (Beckmann et al., 2010b). Trotz bedeutender Fortschritte sind viele dieser Signalwege noch nicht in ihrer Gänze aufgeklärt, da u.a. initiale Transmembranrezeptoren sowie ihre Liganden vielfach noch unbekannt sind.



Unterstützt durch das Genomprojekt konnte in den letzten Jahren ein breites Spektrum unterschiedlicher Gruppen von Transmembranrezeptoren wie z.B. GPCRs und Rezeptorkinasen in *S. mansoni* identifiziert werden (Hahnel, 2010; Avelar et al., 2011; Andrade et al., 2011; Zamanian et al., 2012). Aufgrund der großen Anzahl an potentiellen Rezeptoren werden auf der Suche nach Kandidaten für gonaden- und vitellariumspezifische Signalprozesse häufig Homologie-Vergleiche zu Genen anderer Organismen herangezogen, um Hinweise auf Rezeptoren mit einer entwicklungs- und/oder reproduktionsbiologischen Relevanz zu erhalten. Hieran schließen sich Lokalisationsstudien an mit dem Ziel, eine Transkription bzw. Expression ausgewählter Gene in entsprechenden Geweben zu bestätigen. Die Methode der Wahl ist hierbei der Transkriptonachweis über die (*whole mount*) *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitte oder ganze Würmer (Beckmann et al., 2010b; Cogswell et al. 2011). Ihre Nachteile liegen allerdings in der hohen Zeitintensivität und einem erschwerten Nachweis schwach transkribierter Gene. Gerade Letzteres trifft aber häufig auf transmembrane Rezeptoren zu, die meist an der Spitze von Signalkaskaden stehen (Krauss, 2008).

Um diese Limitierungen zu umgehen, wurde die im Rahmen dieser Arbeit etablierte gonadenspezifische RT-PCR (siehe 3.1 und 4.1) angewendet, um die Transkription 14 ausgewählter Transmembranrezeptoren in Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni* zu untersuchen. Die Kandidaten wurden dabei nach unterschiedlichen Kriterien ausgewählt.

Für das transmembrane Mucin SmTmMuc1 und SmPAR1, einem von mehreren potentiellen Allatostatin-Rezeptoren aus *S. mansoni*, gab es bereits Hinweise auf eine Transkription in Ovarien paarungserfahrener Weibchen über erste *in situ*-Hybridisierungen (Hahnel, 2010). Transkripte beider Rezeptoren konnten mittels gonadenspezifischer RT-PCRs wiederum in Testes und Ovarien detektiert werden. Dies bestätigt eine Co-Lokalisation von SmTmMuc1 mit seinem Interaktionspartner SmTK6 in beiden Gonaden (Beckmann, 2008; Hahnel, 2010; Beckmann et al., 2011). Auch das Bild möglicher aktiver Gewebe von PAR konnte so um eine Transkription in den Testes erweitert werden. Allgemein bilden Allatostatine eine große Gruppe von Neuropeptiden bei Invertebraten und erreichen ihre höchste Diversität innerhalb der *Insecta* (Stay et al., 1996; Bendena et al., 1999). Hier sind sie an einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen wie Muskelkontraktionen, Nahrungsaufnahme, Verdauung und neuronaler Kommunikation beteiligt und werden zusammen mit ihren Rezeptoren in vielen unterschiedlichen Organen und Geweben exprimiert (Bendena et al., 1999). Außerdem mehren sich Hinweise auf eine direkte Beteiligung an Reproduktionsprozessen. Hierfür

sprechen Lokalisationen dieser Neuropeptide und ihrer GPCRs in Testes und Ovarien verschiedener Arten (Woodhead et al., 2003; Abdel-Latif et al., 2004; Lungchukiet et al., 2008; Mayoral et al., 2010). Funktionelle Analysen zeigten zudem, dass eine Reduktion der Allatostatin-Expression zu einer Abnahme der Eisyntese und Testesentwicklung in Insekten führte (Meyering-Vos et al., 2006; Griebler et al., 2008). Erste Untersuchungen zu Allatostatinen in Helminthen sprechen für eine Beteiligung an der Steuerung der Muskeltätigkeit (Mousley et al., 2005). Darüber hinaus konnten Allatostatine über Immunohistologie im Nervensystem verschiedener Helminthen wie. z.B. *S. mansoni* detektiert werden (Smart et al., 1994; Smart, 1995; Cebria, 2008). Obwohl die Funktion von Allatostatinen hier noch unbekannt ist, bestätigen die durchgeführten gonadenspezifischen RT-PCRs die Hypothese, dass Allatostatin-Rezeptoren wie SmPAR1 von reproduktionsbiologischer Relevanz für *S. mansoni* sein könnten.

Weiterhin wurden die vier Vertreter der *Frizzled*-Familie aus *S. mansoni*, SmFrz1 bis SmFrz4 (Hahnel, 2010; Zamanian et al., 2012) in die RT-PCR-Analysen mit einbezogen. Mitglieder dieser Familie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, neuronalen Formation und Organentwicklung, indem sie regulatorisch auf Zellproliferation sowie Zellpolarität wirken und dadurch die Differenzierung von Zellen und Geweben beeinflussen. In dieser Funktion sind *Frizzled*-Rezeptoren von fundamentaler Bedeutung für Entwicklung vielzelliger Organismen, was sich in einem Vorhandensein dieser Familie innerhalb aller Gruppen der *Eumetazoa* widerspiegelt (Wang et al. 1996; Huang & Klein, 2004; Frederiksson & Schiöth, 2005). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnten Transkripte von SmFrz1 in Testes und Ovarien detektiert werden. Die anderen *Frizzled*-Rezeptoren werden gonadenspezifischen RT-PCRs zufolge hingegen nicht in diesen Reproduktionsorganen transkribiert. Für *S. japonicum* wurde bereits die Expression eines *Frizzled*-Homologs in den Gonaden und dem Vitellarium adulter Würmer beschrieben (Wang et al., 2011). Zusätzliche Expressionsorte waren das Parenchym und die Muskulatur. Einen weiteren Hinweis auf Wnt/*Frizzled*-Signalwege in den Gonaden liefert der Datensatz der Nawaratna et al.-Studie (2011). Hier erschien SmFrz1 als stärker transkribiert in Ovarien, im Vergleich zu den anderen Geweben des Weibchens.

Die Transkription weiterer untersuchter Rezeptoren wurde ebenfalls in Testes und Ovarien nachgewiesen. Hierzu zählen die beiden FGFR-Homologe SmFGFR1 und SmFGFR2, zwei potentielle Adiponektin-Rezeptoren (AdipoRs), SmAdipoR1 und SmAdipoR2, die Rezeptortyrosinphosphatase (RTP) SmRTP1 sowie zwei potentielle Progesteron-bindende

Rezeptoren SmProgesterinR und SmPMRC1. FGFRs spielen ähnlich wie *Frizzled*-Rezeptoren eine bedeutsame Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse und sind vor allem in die Embryogenese und Organentwicklung involviert. Sie sind in ihrer molekularen Struktur sowie biologischen Funktion stark konserviert und in nahezu allen Stämmen der *Eumetazoa* vertreten. In Planarien werden FGFRs mit der Kontrolle der Neoblasten- und Keimzellendifferenzierung in Verbindung gebracht (Ogawa et al., 1998; Ogawa et al., 2002). Ähnliche Hinweise liefern Forschungsergebnisse aus Schistosomen. In einer aktuellen Studie wurden somatische Stammzellen, sog. *neoblast-like stem cells* (NSCs) in adulten *S. mansoni* identifiziert, welche möglicherweise einer Regulation durch das FGFR-Homolog SmFGFR-A (hier: SmFGFR2) unterliegen (Collins et al., 2013). WISH-Experimente in adulten Männchen detektierten SmFGFR2 Transkripte außer in den als NCS definierten parenchymatischen Zellen auch in den Testes. Eine Transkription von SmFGFR2 in den Testes wird außerdem durch die Nawaratna et al.-Studie (2011) belegt. Da Zellen mit Stammzellcharakter auch in Ovarien vorkommen, erscheint die Transkription von SmFGFR1 und SmFGFR2 in beiden Gonaden hierzu nicht widersprüchlich.

SmAdipoR1 und SmAdipoR2 gehören aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu den Mitgliedern der PAQR-Familie und verfügen dementsprechend über eine 7TMH-Architektur (Tang et al., 2005). Bei Adiponektinen handelt es sich um Peptidhormone, welche beim Menschen primär in den Lipidmetabolismus und die zelluläre Glucose-Aufnahme involviert sind (Kadowaki & Yamauchi, 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Adiponektine in den Gonaden an der Synthese von Steroiden wie Progesteron beteiligt sind und die sexuelle Reifung beeinflussen (Chabrolle et al., 2007; Caminos et al., 2008; Ocon-Grove et al., 2008). Signalwege von AdipoRs laufen häufig über heterotrimere G-Proteine. Unter anderem ist ein regulatorischer Einfluss auf die Zellproliferation bekannt, welcher über eine Src/Ras-abhängige Aktivierung von ERK1 und 2 vermittelt wird (Lee et al., 2008). Obwohl AdipoRs evolutionär stark konserviert sind (Tang et al., 2005), wurden in Invertebraten bisher nur einzelne Rezeptoren beschrieben. Homologe Rezeptoren aus *C. elegans* scheinen wie bei Säugetieren primär in den Lipid- und Fettsäuremetabolismus involviert zu sein (Svensson et al., 2011). Die Expression eines *Bombyx mori*-Homologs erfolgt hingegen neben den malphigischen Gefäßen und Fettkörpern auch in den Testes (Zhu et al., 2008). Letzteres spricht für eine mögliche Beteiligung an Reproduktionsprozessen bei Invertebraten, wie sie bei Säugern bereits beschrieben wurden. Dies wird ebenfalls in Bezug auf SmAdipoR2 durch Nawaratna et al. (2011) unterstützt. Hier erscheint der Rezeptor im Vergleich zum Gesamtwurm verstärkt im Ovar transkribiert.

Die hier gezeigte Transkription von SmRTP1 in Testes und Ovarien wird ebenfalls durch die Nawaratna et al.-Studie (2011) im Hinblick auf eine Transkription in beiden Gonaden unterstützt. Die Rolle von Tyrosinphosphatasen (TPs) in Signaltransduktionsprozessen gestaltet sich als sehr komplex und ist bisher nicht in ihrer Gänze verstanden. Einerseits können TPs direkt als Antagonisten zu TKs wirken, indem sie die Phosphatgruppen von phosphorylierten Tyrosinresten entfernen und so als negative Regulatoren von Signalkaskaden wirken. Andererseits sind TPs aber z. B. auch in der Lage, CTK-vermittelte Signalwege über eine Dephosphorylierung inhibitorischer Phosphotyrosine im C-Terminus von Src-Kinasen zu aktivieren (Tonks, 2013). RTPs verfügen über eine einzelne TMH mit der sie in der Plasmamembran verankert sind. Im extrazellulären Bereich befinden sich, wie im Falle von SmRTP1, häufig Fibronectin-*type* III-Domänen, die eine Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix ermöglichen. Auch eine *trans*-Bindung zwischen zwei RTPs angrenzender Zellen via extrazellulärer Domänen ist beschrieben worden (Brady-Kalnay et al., 1993; Sap et al., 1994). Dies hat möglicherweise die Funktion, die Verteilung von RTPs über die Zellmembran zu kontrollieren. Im inneren Bereich liegen zwei Proteinphosphatasedomänen, von denen die eigentliche enzymatische Aktivität ausgeht (Tonks, 2013). Der Prozess ihrer Aktivierung ist bisher unklar und unterscheidet sich zwischen verschiedenen RTPs. Häufig wird eine Inhibition der Phosphataseaktivität durch eine Dimerisierung des Rezeptors ausgelöst, welche auch über eine Interaktion mit RTKs erfolgen kann (Mohebiany et al., 2013). Obwohl bislang noch nicht ausreichend erforscht, werden RTPs in Vertebraten wie auch in *Drosophila* hauptsächlich mit der Entwicklung des Nervensystems in Verbindung gebracht (Liao et al., 2013). Einer der wenigen Hinweise auf eine Funktion von RTPs in Reproduktionsprozesse stammt ebenfalls aus *Drosophila*. Hier konnte gezeigt werden, dass eine RTP in Kooperation mit Integrinen an der Strukturierung des Cytoskeletts während der Oocytenreifung beteiligt ist (Bateman et al., 2001). Zusammen hiermit liefern die Ergebnisse der gonadenspezifischen RT-PCRs und der Nawaratna et al.-Daten (2011) weitere Hinweise auf eine Rolle von RTPs in testes- und ovarspezifischen Signalwegen.

SmProgesterinR1 und SmMPRC1 gehören zu zwei unterschiedlichen Gruppen von Transmembranrezeptoren, deren Mitglieder in anderen Organismen an der Bindung von Progesteron und strukturell verwandten Steroidverbindungen beteiligt sind (Thomas, 2008). In Invertebraten sind diese Rezeptoren noch kaum beschrieben, allerdings gibt es Hinweise auf eine Beteiligung an Fortpflanzungsprozessen (Preechaphol et al., 2010; Stout et al., 2010),

die eine Transkriptlokalisierung beider Rezeptoren in Testes und Ovarien von *S. mansoni* unterstützen.

Als letzter Rezeptor wurde SmNPYR1 mit in die gonadenspezifische Transkriptionsanalyse mit einbezogen. SmNPYR1 ist ein GPCR mit Sequenzähnlichkeit zu Neuropeptid-F/Y-bindenden Rezeptoren. Er wird den Ergebnissen der gonadenspezifischen RT-PCRs zufolge nur in den Testes nicht aber in Ovarien transkribiert. Die Transkription in den Testes wird zusätzlich durch die Nawaratna et al.-Studie (2011) bestätigt. Ferner zeigte eine Studie, dass Neuropeptide-F/Y als potentielle Liganden von SmNPYR1 an der Spermatogenese und Testes-Entwicklung von Planarien beteiligt sind (Collins et al., 2010). Dies zusammengenommen macht SmNPYR1 zu einem interessanten Kandidaten für die Untersuchung testesspezifischer Signalwege in *S. mansoni*.

Um die Transkriptlokalisationen zu verifizieren, wurden für sechs der untersuchten Rezeptoren *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Für die Rezeptoren SmTMuc1, SmPAR1, SmFrz1, SmFGFR2 und SmNPYR1 konnte auf diesem Wege die Ergebnisse der gonadenspezifischen RT-PCRs bestätigt werden. Bei SmFGFR1 sind die durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen hingegen fehlgeschlagen, was für eine schwache Transkriptionsrate dieses Rezeptors spricht und den Vorteil der gonadenspezifischen RT-PCRs bei der Detektion von Transkripten verdeutlicht. Die *in situ*-Hybridisierungen offenbarten zusätzlich eine Transkription von SmTmMuc1 im Vitellarium und im Parenchym, wodurch das transmembrane Mucin nachweislich in allen Geweben transkribiert wird, in denen auch der Interaktionspartner SmTK6 nachgewiesen werden konnte (Beckmann et al., 2010a). Auch für SmPAR1 konnten zusätzlich Transkripte im Vitellarium detektiert werden.

Durch die Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Organisation und anschließender gonadenspezifischer RT-PCRs konnte die Transkription einer Reihe unterschiedlicher Transmembranrezeptoren in den Gonaden nachgewiesen und interessante Kandidaten für testes- und ovarspezifische Signalwege identifiziert werden. Hieran schlossen sich qPCR-Analysen an, um mögliche paarungsabhängige Transkriptionsprofile von Transmembranrezeptoren in adulten *S. mansoni* beider Geschlechter sowie auf Ebene der Gonaden zu untersuchen. Hintergrund dieser Experimente bilden die, durch den kontinuierlichen Paarungskontakt adulter Schistosomen induzierten Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse, welche zur sexuellen Reifung des Weibchens führen (Kunz, 2001; Grevelding, 2004; LoVerde et al., 2004). Die paarungsbedingten Einflüsse des Männchens auf das Weibchen lassen sich sowohl morphologisch durch die Entwicklung der

Reproduktionsorgane als auch auf Ebene der Genexpression verfolgen (Erasmus, 1973; Den Hollander & Erasmus, 1985; Popiel, 1986; Grevelding et al., 1997; Fitzpatrick & Hoffmann, 2006; Waisberg et al., 2007). Im Gegensatz zum Weibchen sind paarungsunerfahrene Männchen von erfahrenen morphologisch kaum unterscheidbar und verfügen bereits über vollständig entwickelte Testes mit differenzierten Spermien (Armstrong, 1965). Trotzdem gibt es in Männchen paarungsabhängige Unterschiede bei der Induktion von Reifungsprozessen im Weibchen (Den Hollander & Erasmus, 1985) sowie auf Ebene der Genexpression (Fitzpatrick & Hoffmann, 2006; Waisberg et al., 2007; Leutner et al., eingereicht).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen zunächst, dass alle Rezeptoren, die für die qPCR-Analyse ausgewählt wurden, grundsätzlich in paarungserfahrenen und -unerfahrenen *S. mansoni* beider Geschlechter transkribiert werden. Daher ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil ihrer biologischen Funktionen unabhängig vom Paarungsstatus erfolgt. Dies macht insofern Sinn, da Signalwege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren, bereits im nicht-ausgereiften Organismus angelegt sein müssen, um im Falle eines externen Stimulus angesprochen werden zu können. Die quantitative Betrachtung offenbart hingegen einen teilweisen starken Einfluss der Paarung auf die Transkriptionsrate untersuchter Rezeptoren. Bei Männchen führt die Paarung vor allem zu einer Zunahme der Transkription von SmTmMuc1. Im Weibchen hingegen werden mehr Rezeptoren durch die Paarung beeinflusst, wobei in den meisten Fällen eine Zunahme der Transkriptionsrate in paarungserfahrenen Weibchen beobachtet werden kann. Dies deckt sich mit Beobachtungen früherer Transkriptomstudien, die zeigten, dass die Paarung im Weibchen zu einer Fokussierung der Genexpression auf Reproduktionsvorgänge führt (Fitzpatrick & Hoffmann, 2006). Hingegen scheint die Expression von Genen, die für eine autarke Lebensweise von Bedeutung sind und z. B. bei Lokomotion oder dem Nahrungserwerb eine Rolle spielen, aufgrund der Versorgung durch das Männchen in den Hintergrund zu treten. So ist z. B. die Transkription von SmNPYR1, dem einzigen der untersuchten Rezeptoren, der nicht in den weiblichen Reproduktionsorganen transkribiert wird, in paarungsunerfahrenen Weibchen höher, weil er hier möglicherweise Aufgaben im Nervensystem übernimmt, welche z.B. für die Bewegung wichtig sein könnten.

Im Hinblick auf das Ziel, neue Kandidatengene mit einer möglichen Rolle für die Reproduktion von adulten *S. mansoni* zu finden, erscheint eine Fokussierung auf die Gonaden allerdings wesentlich interessanter. Der Vergleich der Transkriptionsprofile von Testes aus

paarungserfahrenen und -unerfahrenen Männchen offenbart für die Mehrheit der hier untersuchten Rezeptoren eine deutliche paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptionsrate, welche bei einer Betrachtung ganzer Würmer zumeist verborgen geblieben ist. Dies wird vor allem für SmNPYR1 deutlich, der tendenziell in paarungsunerfahrenen Würmern stärker transkribiert zu werden scheint. Auf Ebene der Testes hingegen konnte eine durch die Paarung induzierte Zunahme der Transkriptmenge um den Faktor drei beobachtet werden. Die generelle Zunahme der Transkriptmenge aller untersuchten Rezeptoren in den Testes liegt möglicherweise in einer verstärkten Spermatogenese paarungserfahrener Männchen begründet, die sich auch morphologisch in größeren Testesloben widerspiegelt (Neves et al., 2005). In den Ovarien kommt es aufgrund der Paarung zu einer starken Erhöhung der Transkriptmengen beider potentiellen Progesteron-bindenden Rezeptoren und SmFrz1, während die Transkriptionsraten der FGFR-Rezeptoren und SmTmMuc1 weitgehend unbeeinflusst bleiben. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Erstere verstärkt oder hauptsächlich in primären Oocyten transkribiert werden, welche wiederum erst mit der Reifung des Ovariums gebildet werden. Da FGFRs hingegen auch in Planarien und Schistosomen mit Stammzellregulation in Verbindung gebracht werden (Ogawa et al., 1998; Ogawa et al., 2002; Collins et al., 2013), ist es zu erwarten, dass SmFGFR1 und SmFGFR2 bereits in immaturren Ovarien exprimiert werden. Gleiches könnte eventuell auch für SmTmMuc1 zutreffen, zumal Interaktionen zwischen FGFRs und transmembranen Mucinen bereits beschrieben wurden (Ren et al., 2006). Analog zu SmNPYR1 in Männchen und Testes verhält sich SmFrz1 in Bezug auf die Weibchen. Während die Transkriptionsrate von SmFrz1 beim Vergleich von paarungserfahrenen und -unerfahrenen Weibchen unauffällig erscheint, offenbart die Betrachtung auf Ebene von Ovarien eine starke paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptionsrate.

Zusammenfassend konnten gonadenspezifische RT-PCRs erfolgreich angewendet werden, um neue Rezeptorkandidaten für testes- und ovarspezifische Signalwege zu identifizieren. Hierbei konnten frühere Lokalisationsstudien zu einigen der Rezeptoren bezüglich einer Transkription in den Gonaden bestätigt bzw. erweitert werden, während andere Rezeptoren zum ersten Mal mit einer möglichen Funktion in der Reproduktionsbiologie adulter *S. mansoni* in Verbindung gebracht werden konnten. Weiterhin gelang es über *in situ*-Hybridisierungen, die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit etablierten neuen Methode nochmals zu verifizieren und zusätzlich für einige Rezeptoren weitere Gewebe zu detektieren, in denen Transkripte nachweisbar waren. Überaus wichtige Erkenntnisse lieferten darüber hinaus erste qPCR-Analysen ausgewählter Rezeptoren zur paarungsabhängigen Transkription in adulten

*S. mansoni* beider Geschlechter und deren Gonaden. Hierbei zeigte sich u.a., dass einige interessante Rezeptoren bei einer Betrachtung ganzer Würmer unauffällig in Bezug auf eine paarungsabhängige Regulation der Transkriptmenge erschienen, während ein „Zoom-in“ in das Organ erhebliche Unterschiede in den Transkriptionsraten nach Paarungskontakt offenbarte. So konnte erstmals der Einfluss der Paarung auf die Genexpression spezifischer Gewebe nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht erneut die Notwendigkeit eines Zugriffs auf definierte Organe und Gewebe aus *S. mansoni*, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Genregulation differenzierter betrachten zu können. Auf bezogen Transkriptom- und Proteomstudien zum Einfluss des Paarungskontaktes auf die Genexpression adulter *S. mansoni* bedeutet dies, dass bei einer globale Analyse ganzer Würmer viele Gene mit Schlüsselfunktionen unentdeckt bleiben, da ihre möglicherweise vorhandenen gewebespezifischen Expressionsprofile bei alleiniger Betrachtung auf Ebene des Gesamtorganismus unentdeckt bleiben.

Mehrere der hier untersuchten Rezeptorkandidaten wurden aufgrund ihrer Lokalisation und ihres paarungsabhängigen Transkriptionsprofils einer weiterführenden Charakterisierung unterzogen, um erste Hinweise auf ihre Funktion in den Gonaden adulter *S. mansoni* zu erhalten (siehe 4.3).

### **4.3 Erste Charakterisierungen ausgewählter Transmembranrezeptoren aus *S. mansoni***

#### **4.3.1 Charakterisierung des transmembranen Mucins SmTmMuc1 aus *S. mansoni***

Das erste in *S. mansoni* beschriebene transmembrane Mucin SmTmMuc1 wurde in einem Y2H-Screening als *upstream*-Interaktionspartner der Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 identifiziert (Beckmann, 2008; Beckmann et al., 2011) und eine Interaktion beider Moleküle über direkte Interaktionsstudien verifiziert (Hahnel, 2010). Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Bindung der SH2-Domäne von SmTK6 an ein konserviertes Src-Bindungsmotiv im intrazellulären C-Terminus des Mucins erfolgt. Eine erste Lokalisation von SmTmMuc1-Transkripten im Ovar maturaer Weibchen (Hahnel, 2010) wurde in der hier vorliegenden Arbeit über gonadenspezifische RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen bestätigt und um eine Transkription im Vitellarium sowie den Testes und dem Parenchym beider Geschlechter



erweitert (siehe 3.2 und 4.2). Damit konnte gezeigt werden, dass SmTmMuc1 in den gleichen Geweben wie SmTK6 transkribiert wird (Beckmann et al., 2010a). SmTK6 wiederum ist Bestandteil eines postulierten trimeren Kinasekomplexes in den Gonaden adulter *S. mansoni* und zusammen mit der Src-Kinase SmTK3 und der Syk-Kinase SmTK4 in Signalwege involviert, die vermutlich die Reorganisation des Cytoskeletts sowie Mitose und Zellteilung innerhalb dieser Organe steuern (Beckmann et al., 2011). Oberhalb dieses Kinasekomplexes stehen Interaktionsstudien zufolge wiederum die RTK SmVKR1 sowie das Integrin Sm $\beta$ -Int1, wobei die genauen Mechanismen des Zusammenwirkens der beteiligten Signalmoleküle bisher nicht nachvollzogen sind. In dieses komplexe Szenario gilt es, zukünftig weitere identifizierte Interaktionspartner wie SmTmMUC1 einzubinden. Aufgrund seiner Interaktion mit SmTK6 und der Lokalisation in den Gonaden ist anzunehmen, dass SmTmMuc1 ebenfalls für die hier beschriebenen Signalwege von Bedeutung ist. Diese Annahme wird noch zusätzlich durch den Umstand gestärkt, dass das transmembrane Mucin in einem Y2H-Screening auch als Bindungspartner von SmTK4 identifiziert werden konnte (Beckmann, 2008), wobei diese Interaktion bisher nicht weiter untersucht bzw. verifiziert wurde. Welche Rolle SmTmMuc1 oberhalb des trimeren Kinasekomplexes einnimmt ist bisher völlig unklar. Im Allgemeinen erfüllen transmembrane Mucine in Signalprozessen ein breites Spektrum unterschiedlicher Funktionen. Diese reichen von einer direkten Detektion biochemischer Parameter über eine Bedeutung als Co-Rezeptoren für verschiedene Klassen von RTKs bis hin zu einer Funktion als Adapterprotein bei der Formierung von Signalkomplexen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass transmembrane Mucine auch als Folge proteolytischer Spaltung transkriptionelle Prozesse im Zellkern steuern können (Singh & Hollingsworth, 2006). Daher sollte in dieser Arbeit eine weiterführende Charakterisierung des transmembranen Mucins erfolgen.

Zunächst wurde die Proteinsequenz von SmTmMuc1 einer *in silico*-Analyse unterzogen. Hierbei wurden im extrazellulären Bereich mehrere *tandem repeat*-Regionen gefunden, die charakteristische Merkmale von Mucine darstellen und häufig posttranslational glykosyliert werden (Singh & Hollingsworth, 2006). Es wird postuliert, dass unterschiedliche Glykosylierungsmuster transmembraner Mucine deren Spezifität für verschiedene Signalwege beeinflussen (Cullen, 2011). Möglicherweise sind die *tandem repeat*-Regionen aufgrund ihrer repetitiven Struktur auch auf Nukleinsäureebene, neben der Sequenzlänge, ein weiterer Grund warum das Mucin nicht vollständig amplifiziert werden konnte. Repetitive Bereiche können stabile Sekundärstrukturen bilden, die für reverse Transkriptasen oder DNA-Polymerasen nur schwer zugänglich sind (Gallup, 2011). Eine weitere Erkenntnis der *in silico*-Analyse war,

dass die durch das Programm TMpred (Hofmann & Stoffel, 1993) vorausgesagte TMH von SmTmMuc1 (Beckmann, 2008) als zweites wichtiges Merkmal transmembraner Mucine von weiteren Programmen zur Vorhersage der Proteinstruktur, wie SMART (Leutnic et al., 2012) und TMHMM Server V.2.0 (Moller et al., 2001) nicht erkannt wurde. Daher erscheint es sinnvoll, im Rahmen zukünftiger Analysen eine Membranintegration von SmTmMuc1 z. B. über die heterologe Expression eines GFP-Fusionsproteins zu bestätigen.

Um erste Hinweise auf mögliche biologische Funktionen zu erhalten, wurden RNAi-Experimente *in vitro* mit dem Ziel durchgeführt, die Expression von SmTmMuc1 in adulten *S. mansoni* zu reduzieren. Hierbei zeigte sich, dass eine Verwendung von spezifischen, gegen SmTmMuc1 gerichteten dsRNAs zu einer deutlichen Reduktion der Transkriptionsrate behandelter Würmer auf ca. 20 % im Vergleich zur Kontrolle führte. Anschließende mikroskopische Studien offenbarten deutliche morphologische Veränderungen in den Ovarien behandelter Weibchen. In unbehandelten Weibchen enthält das Ovarium im anterioren Bereich immature Oocyten, sogenannte Oogonien mit Stammzellcharakter, und *posterior* primäre Oocyten mit einem höheren Cytoplasmaanteil. Als Folge der dsRNA-Behandlung konnte hingegen eine erhöhte Anzahl an primären Oocyten und ein wesentlich geringer Anteil immaturer Oocyten beobachtet werden. Weiterhin kam es zu einer Verschiebung primärer Oocyten in den anterioren Bereich. Interessanterweise gleicht dieser Phänotyp morphologischen Veränderungen, die nach einem SmTK4-*knock down* mit RNAi sowie einer SmTK4-Inhibition über den Inhibitor Piceatannol beobachtet werden konnten (Beckmann et al., 2010a). In entsprechenden Studien wurde postuliert, dass die Syk-Kinase möglicherweise an Signalprozessen beteiligt ist, die die Regulation der Meiose während der Oocytenreifung steuern (Beckmann, 2008; Beckmann et al., 2010a). SmTmMuc1 könnte in diesen Signalwegen mit SmTK4 kooperieren, was die ähnlichen Phänotypen nach RNAi-Experimenten erklären würde. Leider können keine Vergleiche zu einem SmTK6-*knock down* heran gezogen werden, da bisherige RNAi-Experimente zu keiner Transkriptreduktion in behandelten *S. mansoni* führten (Beckmann et al., 2011). Möglicherweise zählt SmTK6 zur Gruppe der sog. *non knockables*, Gene aus *S. mansoni* für die jegliche RNAi-basierten Beeinflussungen bisher gescheitert sind (Krautz-Peterson et al., 2010a; Beckmann & Grevelding, 2012). Eine weitere Erklärung für den beobachteten SmTmMuc1-Phänotyp im Ovar wäre eine Beteiligung des Mucins bei der Kontrolle der Oogonien-Determination. Oogonien sind immature Keimzellen mit Stammzellcharakter, die asymmetrische Zellteilungen durchlaufen. Dabei teilt sich eine Oogonie mitotisch in zwei Tochterzellen, von denen eine in die Meiose übergeht und sich zur primären Oocyte entwickelt, während sich die

andere zur Aufrechterhaltung der Oogonien-Population erneut mitotisch teilt (Kimble & Crittenden, 2007). Der „Switch“ zwischen Mitose und Meiose entscheidet demnach, ob die Oogonie ihre Stammzellfunktion beibehält oder differenziert und wird daher auf zellulärer Ebene streng überwacht. In *C. elegans* z. B. wird die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus von Keimzellen durch den Notch-Signalweg reguliert (Kimble & Crittenden, 2007). Mutationen des Notch-Homologs Glp-1 führten dazu, dass sich mitotisch teilende Keimzellen in die Meiose übergehen. Bei temperatursensitiven Glp-1-Mutanten konnte so zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten eine gleichzeitige Meiose aller Keimzellen induziert werden (Austin & Kimble, 1987). Der Phänotyp der SmTmMuc1 RNAi-Experimente ist mit diesem Phänotyp vergleichbar, wenn auch schwächer ausgeprägt, da noch immature Oocyten in den Ovarien behandelter Weibchen zu erkennen sind. Allerdings erfolgt über RNAi auch kein vollständiger *knock out* der Genfunktion, so dass davon auszugehen ist, dass SmTmMuc1 noch zu einem gewissen Grad exprimiert wird. Letztlich ergibt sich hieraus die Frage, ob SmTmMuc1 eine essentielle Komponente von Signalwegen darstellt, die den Stammzellstatus von Oogonien im Ovar adulter *S. mansoni* aufrechterhält. Unterstützt wird eine solche Vermutung durch Studien an humanen Zellkulturen, die zeigten, dass eine N-terminal verkürzte Form von MUC1 in Kombination mit dem Wachstumsfaktor NM23 eine Differenzierung pluripotenter Stammzellen verhindert (Hikita et al., 2008; Smaghe et al., 2013). Der Mechanismus der Bindung von NM23 und MUC1 sowie *downstream* gelegene Signalprozesse sind allerdings bisher nicht erforscht. NM23-Homologe kommen auch in *S. mansoni* vor (siehe Smp\_092750), wobei allerdings beachtet werden muss, dass zwischen SmTmMuc1 und MUC1 zumindest im extrazellulären Bereich kaum Sequenzübereinstimmungen bestehen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist zudem die beschriebene Interaktion zwischen transmembranen Mucinen und FGFRs. Es ist bekannt, dass der humane FGFR3 mit MUC1 interagiert und so eine Src-abhängige Phosphorylierung des YEKV-Motivs im C-Terminus von MUC1 stimuliert (Ren et al., 2006). Dieses konservierte Src-Bindungsmotiv besitzt in SmTmMuc1 die Aminosäureabfolge YEKL und ist als Bindungsstelle der Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 identifiziert worden (Hahnel, 2010). Demnach wäre es denkbar, dass SmTmMuc1 über eine Interaktion mit SmFGFR1 oder SmFGFR2, SmTK6-vermittelte Signalwege in den Oogonien ansteuert. Beide FGFRs werden ebenfalls im Ovarium transkribiert und werden darüber hinaus mit der Stammzellregulation in adulten *S. mansoni* in Verbindung gebracht (Collins et al., 2013).

Vom Ovarphänotyp abgesehen zeigten die anderen Reproduktionsorgane, in denen SmTmMuc1 transkribiert wird, sowie das Parenchym beider Geschlechter keine auffälligen Veränderungen als Folge der RNAi-Experimente. Anders als für den SmTK4-*knock down* (Beckmann et al., 2010a) beschrieben, scheint z. B. die Spermatogenese nicht beeinflusst zu werden, da die Samenblasen behandelter Männchen mit reifen Spermien gefüllt waren und sich nicht von den Kontrollen unterschieden. Die Spermatogenese in den Testes läuft ausgehend von Spermatogonien über Spermatocyten und Spermatidien zu reifen Spermien. Im dorsalen Bereich der Loben befinden sich hauptsächlich die größeren Keimzellen, während zum ventralen Bereich hin die Differenzierung zu Spermien erfolgt (Mehlhorn & Piekarski, 2002; Beckmann et al., 2010b). Auch die Testesloben behandelter Würmer selbst waren mit Zellen ausgefüllt und erschienen in ihrer Größe nicht reduziert. Allerdings bietet die hier angewendete Kombination aus Karminrot-Färbung und KLSM nicht die Möglichkeit, zwischen den verschiedenen Zellstadien der Spermatogenese mit Ausnahme der reifen Spermien klar zu unterscheiden, so dass es z.B. schwierig ist, ein verschobenes Mengenverhältnis zugunsten eines Stadiums auszumachen. Dies trifft auch für das Vitellarium zu, in dem ebenfalls keine Veränderungen zur Kontrolle detektiert werden konnten. Dieses Phänomen wurde bereits bei anderen RNAi-Studien in *S. mansoni* beobachtet. So führten z. B. *knock downs* von Sm $\beta$ -Int1 und SmDia zu klaren Phänotypen in Ovarien, während weitere Transkriptionsorte wie Testes und Vitellarium scheinbar unbeeinflusst blieben (Beckmann et al., 2012). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass nicht jedes Gewebe im gleichen Maße zugänglich für dsRNAs ist, oder die zelluläre RNAi-Maschinerie nicht in jedem Gewebe und jeder Zelle mit der gleichen Effizienz abläuft. (Beckmann & Grevelding, 2012; Dalzell et al., 2011). Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Gonadenisolation bietet hier zukünftig die Möglichkeit, eine dsRNA-induzierte Reduktion der Transkriptionsrate auf der Ebene von Testes und Ovarien zu untersuchen und diese Annahmen zu bestätigen. Denkbar wäre zudem, dass das Proteinprodukt in verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Stabilität besitzt, so dass gewebespezifische RNAi-Effekte eventuell zeitlich verzögert eintreten. Gerade bei transmembranen Mucinen hat sich gezeigt, dass die *turn-over* Rate des Proteins entscheidend durch den Glykosylierungsstatus des extrazellulären Bereichs beeinflusst wird (Cullen, 2011). Ein entscheidender Faktor in Bezug auf das Vitellarium könnte zudem der als *in vitro*-Regression beschriebene Kultureffekt darstellen, wonach es unabhängig von einer Paarung zu einer De-Differenzierung des Vitellariums kommt (Galanti et al., 2012). Sollte SmTmMuc1 z.B. für die Vitellinzellsynthese notwendig sein, könnte ein *knock down*-Effekt durch die allgemeine De-Differenzierung des

Vitellariums überlagert werden. Dies mag auch eine Erklärung dafür sein, warum bisher noch keine klaren Phänotypen im Vitellarium von nach RNAi-Experimenten beobachtet werden konnten.

Die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Analysen zu SmTmMuc1 lieferten erste Hinweise auf eine Rolle des Mucins an der Differenzierung von Oocyten im Ovar gepaarter *S. mansoni*-Weibchen. Möglicherweise besteht eine Aufgabe der SmTmMuc1-Signalwege darin, den Stammzellcharakter und damit die mitotische Aktivität von unreifen Oocyten, den Oogonien, aufrechtzuerhalten. Sollte dies zutreffen, würde der hier beobachtete Phänotyp mit einer Reduktion der Keimzellproliferation und einer verringerten mitotischen Aktivität im maturen Ovar einhergehen. Eine geeignete Methode dies zu überprüfen, würde die Zugabe des Thymidin-Analogons EdU ins Kulturmedium behandelter *S. mansoni* darstellen, mit der mitotisch aktive Zellen markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können (Collins et al., 2013). Außerdem wäre dieser Ansatz möglicherweise ebenfalls dazu geeignet, auch in anderen Geweben in denen SmTmMuc1 transkribiert wird, wie z.B. den Testes oder dem Parenchym, eine Reduktion mitotisch aktiver Zellen zu detektieren. Ein gängiger Ansatz RNAi- und Inhibitorbehandlungen zu vergleichen, um Phänotypen zu verifizieren, ist im Falle von SmTmMuc1 nicht möglich, da kommerzielle Inhibitoren gegen transmembrane Mucine aufgrund fehlender katalytischer Funktionen bisher noch nicht erhältlich sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich SmTmMuc1 nicht zuletzt aufgrund hier durchgeführter Lokalisations- und RNAi-Studien als interessante Komponente gonadenspezifischer Signalprozesse erweist, welches im Rahmen zukünftiger Studien weiter untersucht werden sollte. Innerhalb weiterführender Charakterisierungen sollte zunächst die Interaktion von SmTmMuc1 mit SmTK4 verifiziert werden. Gleiches gilt auch für die postulierten Interaktionen mit SmFGFR1 und SmFGFR2. SmTmMuc1 ist darüber hinaus ein gutes Beispiel für die Notwendigkeit von *S. mansoni*-Zelllinien. Vollängenexpressionen im heterologen System werden vermutlich durch die Größe des Proteins erschwert. Außerdem kann hier eine spezifische Glykosylierung nicht gewährleistet werden, die für die charakteristischen Funktionen von transmembranen Mucinen notwendig ist (Cullen, 2011). Weitere Charakterisierungen auf Proteinebene setzen ferner die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper voraus.

### 4.3.2 Charakterisierung des potentiellen Neuropeptidrezeptors SmNPYR1 aus *S. mansoni*

Ein weiterer Transmembranrezeptor aus *S. mansoni*, der für Folgeanalysen ausgewählt wurde, war SmNPYR1, ein potentieller Rezeptor für Liganden der Neuropeptid-F/Y-Familie. Gonadenspezifische RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass SmNPYR1 spezifisch in Testes nicht aber in Ovarien transkribiert wird (siehe 3.2 und 4.2), was ihn zu einem interessanten Kandidaten für testesspezifische Signalwege macht. Umso mehr, da bisher untersuchte Signalmoleküle mit möglicher reproduktionsbiologischer Relevanz zumeist in beiden Gonaden transkribiert werden (Beckmann et al., 2010b). Zudem zeigt der Rezeptor in den Testes eine paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptmenge was für eine direkte Beteiligung an Fortpflanzungsprozessen spricht. In weiteren Geweben adulter *S. mansoni* konnten hingegen keine Transkripte des Rezeptors detektiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass Neuropeptide und ihre Rezeptoren auch in Plattwürmern bisher hauptsächlich mit neuronaler Kommunikation in Verbindung gebracht worden sind (McVeigh et al., 2005), ist eine zusätzliche Lokalisation von SmNPYR1 in Teilen des Nervensystems aber nicht auszuschließen. Allerdings erscheinen andere Methoden wie WISH und vor allem Immunohistologie für solche Nachweise geeigneter als die hier durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen auf Gewebeschnitte.

In einer Vielzahl von Studien konnten Neuropeptide verschiedener Plattwürmer bisher hauptsächlich mit einer Modulation der Muskeltätigkeit in Verbindung gebracht werden, ihre Rezeptoren sind dagegen bisher kaum beschrieben. Zusammen mit gonadenspezifischen RT-PCRs und *in situ*-Hybridisierungen zum potentiellen Allatostatin-Rezeptor SmPAR1 liefern die Lokalisationsstudien zu SmNPYR1 erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Neuropeptidrezeptoren an der Reproduktion von Schistosomen.

*In silico*-Untersuchungen der Proteinsequenz zeigten, dass es sich bei SmNPYR1 um einen Vertreter der *Rhodopsin*-Gruppe innerhalb der Superfamilie der GPCRs handelt. Er besitzt eine typische 7TMH-Architektur mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Wie bei Mitgliedern der *Rhodopsin*-Unterfamilie üblich, verfügt SmNPYR über keine extrazellulären Ligandenbindungsdomänen. Vielmehr erfolgt bei *Rhodopsin*-Rezeptoren die Ligandenbindung über ein Zusammenspiel des N-Terminus und der extrazellulären Schleifen (Krauss, 2008; Luttrell, 2008). Da Neuropeptide und ihre Rezeptoren in Invertebraten eine hohe Diversität entfaltet haben, sind Sequenzähnlichkeiten zu GPCRs aus Vertebraten und dem Menschen gering, so dass für weiterführende

Untersuchungen von SmNPYR1 auf keinen kommerziell erhältlichen und spezifischen Inhibitor zurück gegriffen werden konnten.

Um Hinweise auf biologische Funktionen von SmNPYR1 in den Testes adulter Männchen zu erhalten, wurden daher RNAi-Experimente mit einer spezifischen, gegen den Rezeptor gerichteten dsRNA durchgeführt. Zum Ende des Behandlungszeitraums durchgeführte RT-PCRs bestätigten eine Transkriptreduktion in *S. mansoni*-Pärchen als Folge der dsRNA-Behandlung. Morphologische Analysen der Würmer offenbarten Veränderungen in den Testes behandelter Männchen im Vergleich zur Kontrolle. So enthielten die Samenblasen und Testesloben wesentlich geringere Mengen an reifen Spermien. Weiterhin erschienen die Testesloben in ihrem Durchmesser reduziert und weniger stark mit Zellen gefüllt. Dies spricht dafür, dass SmNPYR1 und seine Liganden in Prozesse der Spermatogenese involviert sind, die für eine Bildung reifer Spermien essentiell sind. Dies deckt sich mit einer Studie zu Neuropeptiden *S. mediterranea*. Hier konnte über funktionelle Analysen gezeigt werden, dass ein Mitglied der Neuropeptid-Y-Familie, das NPY-like peptide 8, von essentieller Bedeutung für die Spermatogenese ist (Collins et al., 2010). *Knock down*-Versuche zu NPY-8 führten zu einer Degeneration der Testes und zur Abwesenheit reifer Spermien, also Veränderungen, welche mit den hier erfolgten RNAi-Experimenten zu SmNPYR1 übereinstimmen. Weiterhin wurden im Rahmen obiger Studie ein Homolog von NPY-8 im Genom von *S. mansoni* entdeckt. Diese könnte den natürlichen Ligand von SmNPYR1 darstellen und sollte in diesem Fall zu einem vergleichbaren Phänotyp nach RNAi-Behandlung führen. Darüber hinaus mehrten sich auch aus aktuellen Untersuchungen zu Insekten die Hinweise auf eine Bedeutung von Neuropeptiden-F/Y an der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane. Der RNAi-vermittelte *knock down* eines NPFs aus *Schistocera gregaria* führte zu kleineren Testes und Samenblasen in behandelten Männchen (van Wielendaele et al., 2013).

Interessanterweise gleicht der SmNPYR1-Phänotyp morphologischen Veränderungen, welche nach Piceatannol-Behandlung bzw. SmTK4-*knock down* beobachtet werden konnten. Allerdings gibt es keine Hinweise darauf, dass SmNPYR1 und SmTK4 an den gleichen Signalwegen beteiligt sind, zumal eine Aktivierung von Syk-Kinasen häufig über RTKs erfolgt (Beckmann et al., 2010a), wohingegen direkte oder indirekte Interaktionen mit GPCRs kaum beschrieben wurden. Es ist daher durchaus möglich, dass beide Signalmoleküle zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Spermatogenese eingreifen.

Abgesehen vom beobachteten Phänotyp in den Testes blieben andere Gewebe dsRNA-behandelter *S. mansoni*-Pärchen hingegen unverändert. Dies war entsprechend den

Ergebnissen der Lokalisationsstudien zu erwarten. Da die RNAi-Experimente nur einmal durchgeführt wurden, sollten die hier erhaltenen Ergebnisse über eine Wiederholung verifiziert werden. Hierbei sollten zusätzlich die Eilegeraten behandelter Pärchen bestimmt werden, um den Einfluss des SmNPYR1-*knock down* auf die Eisyntese des Weibchens zu ermitteln.

Zusammenfassend betrachtet liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf eine Beteiligung von SmNPYR1 an testesspezifischen Signalwegen zur Steuerung der Spermatogenese. Die paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptionsrate in den Testes macht den Rezeptor darüber hinaus zu einem interessanten Kandidaten für eine Beteiligung am postulierten Kompetenzstatus paarungserfahrener Männchen (Leutner et al., eingereicht). So konnte in klassischen Paarungsexperimenten gezeigt werden, dass paarungserfahrene Männchen in der Lage sind, schneller mitotische Teilungen in Weibchen zu induzieren als paarungsunerfahrene Männchen (Den Hollander & Erasmus, 1985). Darüber hinaus stellt SmNPYR1 aufgrund seines Einflusses auf die Spermatogenese ein interessantes Ziel für zukünftige Therapieansätze dar, zumal der Rezeptor nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu humanen GPCRs besitzt, wodurch gegebenenfalls eine höhere Spezifität von Inhibitoren erreicht werden kann.

Zukünftige Studien zu SmNPYR1 sollten zwei Strategien verfolgen. Zum einen sollte versucht werden, den oder die natürlichen Liganden des Rezeptors zu identifizieren. Zum anderen wäre es von Interesse, Signalwege zu entschlüsseln, welche von SmNPYR1 angesprochen werden. Ersteres Ziel lässt sich z.B. über die heterologe Expression des Rezeptors in Hefe- oder HEK-Zellen mit nachfolgenden Reporterassays erreichen, wie es für eine Reihe von GPCRs aus *S. mansoni* bereits erfolgreich durchgeführt wurde (El-Shehabi et al., 2009; Taman & Ribeiro, 2009; El-Shehabi & Ribeiro, 2010). Eine Grundvoraussetzung für diese Versuche ist gegeben, da potentielle Liganden in Form von NPY-Homologen, wie NPY-8, welches in *S. mediterranea* in die Spermatogenese involviert ist, im Genom von *S. mansoni* bereits identifiziert wurden (McVeigh et al., 2009; Collins et al., 2010). Sollten sich unter den NPYs Kandidaten befinden, welche in der Lage sind, den Rezeptor im heterologen System zu aktivieren, können RNAi-Experimente folgen, um eine Interaktion beider Moleküle *in vivo* über vergleichbare Phänotypen zu verifizieren. In Schistosomula konnten Transkriptionen von Neuropeptiden bereits erfolgreich über RNAi reduziert werden (McVeigh et al., 2011).



Der Einfluss potentieller Liganden ließe sich gegebenenfalls auch *in vivo* durch eine Stimulation von Zellen isolierter Testes untersuchen, vorausgesetzt ein geeigneter Reporterassay ist vorhanden. Da aktivierte GPCR-Signalwege häufig einen Anstieg intrazellulärer Calcium-Konzentrationen bewirken, könnte der Einfluss von Neuropeptiden auf Testeszellen möglicherweise über Calcium-*imaging* analysiert werden. Eine prinzipielle Durchführbarkeit von Calcium-*imaging*-Analysen konnte bereits für isolierte Vitellinzellen gezeigt werden (Zhigang Lu, persönliche Mitteilung). Für eine Identifizierung von *downstream* gelegenen Interaktionspartnern wie heterotrimeren G-Proteinen bietet sich ein membranabhängiges Y2H-System an (Dualsystems Biotech), welches bereits erfolgreich bei GPCRs angewendet wurde (Xue et al., 2006; Nakamura et al., 2013). Im Genom von *S. mansoni* sind eine Reihe von G $\alpha$ , G $\beta$  und G $\gamma$  Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine kodiert (eigene Untersuchungen). Um eine Vorselektion zu erreichen, sollte zunächst die Transkription potentieller Interaktionspartner über gonadenspezifische RT-PCRs nachgewiesen werden, bevor direkte Interaktionsstudien folgen.

#### 4.3.3 Charakterisierung des *Frizzled*-Rezeptors SmFrz1 aus *S. mansoni*

Bei den Mitgliedern der *Frizzled*-Familie handelt es sich um Rezeptoren für Wnt-Lipoglykoproteine mit einer weiten Verbreitung innerhalb der *Eumetazoa*. Wnt/*Frizzled*-Signalwege sind von großer Bedeutung bei der Regulation verschiedener Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse im Embryo sowie im adulten Organismus (Huang & Klein, 2004). In Planarien werden sie darüber hinaus vornehmlich mit der Geweberegeneration in Verbindung gebracht (Almuedo-Castillo et al., 2012). Obwohl über *in silico*-Analysen wichtige Komponenten von Wnt/*Frizzled*-Signalwegen wie beispielsweise Wnt, *Frizzled*, Dsh,  $\beta$ -Catenin, oder Axin auch in parasitischen Plattwürmern wie *Ecchinokokken* und *Schistosomen* nachgewiesen werden konnten, ist hier über ihre Funktionen allerdings wenig bekannt (Riddiford & Olson, 2011). Die einzigen Untersuchungen zu Wnt und *Frizzled* stammen bisher aus *S. japonicum* (Li et al., 2010). Hier konnte u.a. die Expression eines Frz-Rezeptors in den Reproduktionsorganen adulter *S. japonicum* nachgewiesen werden (Wang et al., 2011). Das Genom von *S. mansoni* enthält Gene für insgesamt fünf Wnts sowie vier *Frizzled*-Rezeptoren (Hahnel, 2010; Riddiford & Olson, 2011; Zamanian et al., 2012). Von diesen wird SmFrz1 gonadenspezifischen RT-PCRs zufolge als einziger in Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni* transkribiert. Zusätzliche Untersuchungen mittels *in situ*-Hybridisierung konnten die Lokalisation von SmFrz1-Transkripten in den Gonaden bestätigen. Weiterführende, quantitative Transkriptionsanalysen über qPCR offenbarten

zudem eine 2-fache bzw. 5-fache paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptmengen von SmFrz1 in Testes und Ovarien (siehe 3.2 und 4.2). Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise darauf, dass *Frizzled*-Signalwege in Form von SmFrz1 Einfluss auf Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse in den Gonaden adulter *S. mansoni* nehmen könnten.

Aus diesem Grunde sollte SmFrz1 im Rahmen dieser Doktorarbeit detaillierter untersucht werden. Eine Analyse der Proteinsequenz offenbarte alle typischen Charakteristika von *Frizzled*-Rezeptoren einschließlich einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne und der Transmembrandomäne, bestehend aus sieben TMHs und eines konservierten Dsh-Bindungsmotivs im intrazellulären C-Terminus (Schulte, 2010). Um Hinweise auf die biologische Funktion von SmFrz1 in den Gonaden paarungserfahrener *S. mansoni* zu erhalten wurden weiterhin funktionelle Analysen durchgeführt. Da Wnt/*Frizzled*-Signalprozesse bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen, sind mittlerweile eine Reihe unterschiedlicher, kommerzieller Inhibitoren gegen verschiedene Mitglieder dieser Signalwege erhältlich (Schulte, 2010).

Der Inhibitor 3289-8625 (auch *Dvl-PDZ Domain Inhibitor II*, Merck Millipore) blockiert die Interaktion zwischen *Frizzled* und seinem *downstream*-Interaktionspartner Dsh (auch Dvl) direkt über eine Bindung an dessen PDZ-Domäne (Grandy et al., 2009; Gao & Chen, 2010; Voronkov & Krauss, 2013). Die *Frizzled*/Dsh-Interaktion spielt eine zentrale Rolle bei den meisten Wnt-vermittelten Signalprozessen wie z. B. den Wnt/ $\beta$ -Catenin- und *planar cell polarity* (PCP)-Signalwegen (Huang & Klein, 2004). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass einige *Frizzled*-Signalwege, wie der Wnt/Calcium-Signalweg möglicherweise ohne eine Beteiligung von Dsh erfolgen (Ma & Wang, 2007; Schulte, 2010). Über *in silico*-Analysen konnten zwei Dsh-Homologe SmDsh1 und SmDsh2 im Genom von *S. mansoni* identifiziert werden. Zusätzliche gonadenspezifische RT-PCRs belegten zudem eine Co-Lokalisation beider Dsh-Homologe mit SmFrz1 in Testes und Ovarien und lieferten so die Grundvoraussetzung für eine Verwendung des Inhibitors zur Untersuchung biologischer Funktionen von SmFrz1 in den beiden Reproduktionsorganen. Aus zeitlichen Gründen konnte eine Bindung zwischen SmFrz1 und SmDsh1 bzw. SmDsh2 nicht mehr über Proteininteraktionsstudien bestätigt werden und muss daher Inhalt zukünftiger Studien sein. Dies bietet sich vor allem auch deshalb an, weil die Bindung beider Proteine über den intrazellulären C-Terminus des Rezeptors erfolgt und daher im konventionellen Y2H-System untersucht werden kann (Wong et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 3289-8625 zur *in vitro*-Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen eingesetzt, um mögliche biologische Funktionen von *Frizzled*-Signalwegen bei der Reproduktion von Schistosomen zu untersuchen. In Versuchen mit der humanen Krebszelllinie PC-3 wurden für 3289-8625 IC<sub>50</sub>-Werte von 12.5 µM ermittelt (Grandy et al., 2009). Bei den behandelten *S. mansoni*-Paaren zeigten Konzentrationen bis 400 µM hingegen keinen Einfluss auf Paarungsstabilität und Eiproduktion. Auch morphologische Analysen blieben unauffällig. Hierbei ist zu beachten, dass strukturelle Unterschiede zwischen humanen und *S. mansoni*-Homologen die Effizienz des Inhibitors voraussichtlich beeinträchtigen. Zudem sind eine effiziente Aufnahme des Inhibitors durch den Wurm sowie dessen Verteilung und Stabilität in inneren Geweben ungewiss.

Initiale *in vitro*-Experimente mit einer Konzentration von 500 µM führten hingegen zur Beobachtung multipler Effekte. Möglicherweise liegt zwischen 400 µM und 500 µM ein kritischer Schwellenwert, bei dessen Überschreitung die Inhibition der *Frizzled*/Dsh-Interaktion durch freie Dsh-PDZ-Domänen nicht mehr kompensiert werden kann. Als Folge dieser Behandlung kam es zur Entpaarung behandelter Würmer, weshalb keine Eilegeraten bestimmt wurden. Weiterhin zeigten die adulten *S. mansoni* eingeschränkte Vitalzeichen wie reduzierte Bewegung und Darmperistaltik. Morphologische Studien mit dem KLSM offenbarten zudem gravierende Veränderungen in den Gonaden. Die Testesloben behandelter Männchen wiesen große löchrige Strukturen auf, während die Samenblasen zusammengeschrumpft waren. Auch im anterioren Bereich der Ovarien waren vereinzelte Löcher zu erkennen und ein Anteil immaturer Oocyten erschien apoptotisch. Dies spricht dafür, dass der Einsatz des *Frizzled*/Dsh-Inhibitors 3289-8625 zu massiven Zellschädigungen und strukturellen Veränderungen in den Gonaden von adulten *S. mansoni* führt. Allerdings lassen sich diese morphologischen Aberrationen nicht genau erklären. Zwar ist eine Beteiligung von Wnt/*Frizzled*-Signalwege an der Spermatogenese und Oogenese, vor allem bei Vertebraten beschrieben (Boyer et al., 2008; Golestaneh et al., 2009; Tanwar et al., 2010; Nicol & Guiquen, 2011; Sirotkin, 2011; Huang, Z. et al., 2012), dennoch gibt es keine funktionellen Analysen, die sich mit dem hier beschriebenen Inhibitorphänotypen decken.

Um die Effekte des Inhibitors auf die Gonaden näher eingrenzen zu können, sollten daher im Rahmen zukünftiger Studien Ansätze gewählt werden, die einen detaillierteren Einblick in die Ultrastruktur der Gonaden behandelter *S. mansoni* liefern. Eine bedeutende Frage ist z.B. ob die hier beobachtete zellschädigende Wirkung von 3289-8625 gegen definierte Zellstadien der Spermatogenese gerichtet ist. Auch die Verwendung von TUNEL-Assays bietet sich an, um

das Auftreten apoptotischer Zellen vor allem auch in den Ovarien genauer zu definieren. Entsprechende Assays wurden bei adulten *S. mansoni* bereits erfolgreich angewendet (Galanti et al., 2012).

Unabhängig morphologischer Veränderungen hatte die *in vitro*-Behandlung mit 3289-8625 einen klaren, konzentrationsabhängigen Effekt auf die Entwicklung gelegter Eier. Während Eier unbehandelter Kontrollen nach einer Woche in der *in vitro*-Kultur deutliche Anzeichen einer fortschreitenden Embryogenese aufwiesen, verblieben ab 200  $\mu$ M Inhibitor nahezu alle Eier behandelter Würmer in einem unreifen Zustand. Dies spricht dafür, dass frühe Schritte in der Embryogenese von *S. mansoni*, wie bei anderen Organsimen auch, von *Frizzled*/Dsh-vermittelten Signalwegen abhängig sind (Kilian et al., 2003; van Amerongen & Nusse, 2009; Wansleben & Meijlink, 2011; Almuedo-Castillo et al., 2012).

Eine Frage, die an dieser Stelle allerdings unbeantwortet bleibt, ist der Zeitpunkt zu dem der Inhibitor auf die Embryogenese einwirkt. Aufgrund des experimentellen Aufbaus der Inhibitorstudie ist nicht klar, ob primäre Oocyten bei Konzentrationen von 200  $\mu$ M bereits im Ovar durch 3289-8625 beeinträchtigt werden, oder ob eine Inhibition der *Frizzled*/Dsh-Interaktion erst im Ei erfolgt. Eine Antwort hierauf könnte allerdings eine selektive *in vitro*-Behandlung von Eiern liefern.

In Hinblick auf die Interpretation der durch die Inhibitorbehandlung adulter *S. mansoni* erhaltenen Phänotypen müssen einige Einschränkungen gemacht werden. Zunächst ist zu berücksichtigen, dass der Inhibitor spezifisch auf die Interaktion zwischen *Frizzled* und Dsh wirkt, Dsh-unabhängige *Frizzled*-Signalwege demnach nicht beeinflusst werden. Weiterhin werden die *Frizzled*-Rezeptoren SmFrz2, SmFrz3 und SmFrz4 wenn nicht in den Gonaden, dann doch in anderen Geweben adulter *S. mansoni* transkribiert wie RT-PCR-Analysen gezeigt haben. Auch diese Signalwege können durch 3289-8625 beeinflusst werden, wodurch möglicherweise indirekte Effekte auf die Morphologie der Gonaden wirken. Ebenso ist unklar, welche *Frizzled*-Rezeptoren in den Eiern exprimiert werden. Letztlich bindet der Inhibitor an die PDZ-Domäne von Dsh, einer Proteininteraktionsdomäne die Bestandteil vieler zellulärer Proteine ist (Jelen et al., 2003; Lee & Zheng, 2010). Es ist daher nicht auszuschließen, dass einige der hier beobachteten Effekte des Inhibitors auf die unspezifische Inhibition anderer Signalprozesse zurückgeht. Allerdings gibt es derzeit keine Studien zu Beeinträchtigungen anderer Moleküle bei erhöhter 3289-8625-Konzentration. Weitere kommerziell erhältliche Inhibitoren von WNT/*Frizzled*-Signalwegen wirken u.a. auf die Degradation von  $\beta$ -Catenin (Voronkov & Krauss, 2013).

Um die Spezifität der inhibitorinduzierten Effekte in den Gonaden und der Embryogenese auf eine SmFrz1-Inhibition zurückführen zu können sowie eventuelle Dsh-unabhängige SmFrz1-Signalwege zu inhibieren, wurden zusätzlich RNAi-Experimente gegen den *Frizzled*-Rezeptor durchgeführt. Hierbei konnte nach Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen mit spezifischer dsRNA eine Reduktion der SmFrz1-Transkription auf ca. 53 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die behandelten Würmer zeigten jedoch keine mit der KLSM-Methode nachweisbaren phänotypischen Veränderungen. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in einem zu schwachen *knock down*-Effekt durch die dsRNA-Behandlung. In solchen Fällen zeigte sich anderen Studien die Verwendung einer Kombination verschiedener dsRNAs bzw. siRNA-Ansätze als erfolgreich, um genspezifische Transkriptreduktionen zu verstärken (Beckmann et al., 2012b). Allerdings zeigte sich wie zuvor bei der Inhibitorbehandlung ein negativer Effekt auf die Embryogenese der gelegten Eier. Auch hier ist wiederum unklar, ob der RNAi-Effekt schon im Ovar zum Tragen gekommen ist oder die Eier dsRNA aus dem Medium aufgenommen haben. Daher erscheint es sinnvoll, in einem Folgeexperiment ausschließlich die gelegten Eier mit dsRNA zu behandeln und die so erzielten Effekte zu vergleichen. Dennoch liefert das RNAi-Experiment erste Hinweise darauf, dass SmFrz1 als einer von möglicherweise mehreren *Frizzled*-Rezeptoren in die frühe Embryogenese von *S. mansoni* involviert ist. Entsprechende Kandidaten sollten sich über eispezifische RT-PCRs eingrenzen lassen.

Zusammenfassend betrachtet, liefern die durchgeführten funktionellen Analysen mittels Inhibitorbehandlung und RNAi-Experimente eine Reihe von Hinweisen auf eine Beteiligung von SmFrz1 an Reproduktionsprozessen in Testes und Ovarien adulter *S. mansoni* aber auch an der Embryogenese im Ei. Dies macht den *Frizzled*-Rezeptor zu einem interessanten Kandidaten für weiterführende Studien. Hierzu zählt sicherlich die Identifizierung von Wnt-Liganden als auch von *downstream*-Interaktionspartnern. Beide Gruppen konnten bereits über *in silico*-Analysen im Genom von *S. mansoni* nachgewiesen werden (Riddiford & Olson, 2011). Besonders die Suche nach *downstream*-Interaktionspartnern erscheint geeignet, um die bisher beschriebenen gonadenspezifischen Signalwege weiter aufzuklären und miteinander zu vernetzen. So ist z. B. aus anderen Organismen bekannt, dass *Frizzled*-Rezeptoren über Dsh mit der kleinen GTPase Rho und Forminen (Wallingford & Habas, 2005) als auch mit *Lethal giant larvae* (LGL) interagieren können (Dollar et al., 2005). Ließe sich dies auch in *S. mansoni* bestätigen, wären mögliche Verknüpfungen zu SmTK3- bzw. SmTK6-vermittelten Signalwegen hergestellt (Beckmann et al., 2010b, Beckmann et al., 2011; Buro, 2013).

Um ein vollständigeres Bild von *Frizzled*-Signalwegen in *S. mansoni* zu bekommen, bieten sich darüber hinaus stadienspezifische RT-PCRs an, um die Transkriptionsmuster verschiedener *Frizzled*-Rezeptoren miteinander zu vergleichen und Präferenzen einzelner Rezeptoren für bestimmte Stadien ausmachen zu können. Entsprechend lassen sich die hier durchgeführten funktionellen Analysen auf verschiedene Entwicklungsstadien ausweiten. Berücksichtigt man die biologische Relevanz von *Frizzled*-Rezeptoren für Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse, erscheinen vor allem Schistosomula für solche Analysen interessant. Zum einen sind sie für RNAi-Experimente gut geeignet, zum anderen können sie nach RNAi-Behandlung wieder in den Endwirt injiziert werden und sich *in vivo* zum adulten Wurm entwickeln (Bhardwaj et al., 2011; Beckmann & Grevelding, 2012). So könnten die Funktionen von *Frizzled*-Rezeptoren bei der Entwicklung verschiedener Organsysteme einschließlich der Reproduktionsorgane analysiert werden, wie sie für andere Organsimen bereits beschrieben sind (Bernard & Haley, 2007; Biason-Lauber & Konrad, 2008). Alternativ hierzu kann ein Ansatz verfolgt werden, Schistosomula *in vitro* bis zu adulten Pärchen zu kultivieren (Basch, 1981). Hierdurch wäre ein besserer Zugang zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen gegeben und der Inhibitor- bzw. dsRNA-Einfluss ließe sich zeitlich untersuchen. Die Etablierung eines entsprechenden Kultivierungssystems erfolgt zurzeit durch die Arbeitsgruppe um PD Dr. Helmut Haas (Forschungszentrum Borstel, persönliche Mitteilung).

#### **4.3.4 Charakterisierung der FGFR-Rezeptoren SmFGFR1 und SmFGFR2 aus *S. mansoni***

RTKs der FGFR-Familie sind Rezeptoren für *fibroblast growth factors* (FGFs) und ähnlich wie Wnt/Frz-Signalwege innerhalb der *Eumetazoa* evolutionär stark konserviert (Rebscher et al., 2009; Itoh & Ornitz, 2011; Rudolf et al., 2013). Dabei steuern sie ein breites Spektrum unterschiedlicher zellulärer Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung, Aufrechterhaltung, Migration und Apoptose (Powers et al., 2000). Eine entscheidende Rolle kommt FGFRs bei der Entwicklung verschiedener Organsysteme während der Embryonalentwicklung verschiedener Tiergruppen wie Helminthen, Insekten und Wirbeltieren zu. Im adulten Organismus sind sie hingegen an der Regulation physiologischer Prozesse wie Geweberegeneration, Homöostase und Angiogenese beteiligt (Turner & Grose, 2010). Zudem zeigte sich in den letzten Jahren, dass FGFRs eine wichtige Bedeutung bei der Kontrolle der Stammzellkompetenz besitzen (Dvorak et al., 2006; Gotoh, 2009; Dalton, 2013). Entsprechende Hinweise kommen auch aus Studien zu verschiedenen Plathelminthenarten. So

werden zwei FGFR-Homologe aus *D. japonica* neben einer Regulation der Homöostase mit der Kontrolle der Neoplasten- und Keimzellendifferenzierung in Verbindung gebracht (Ogawa et al., 1998; Ogawa et al., 2002; Adell et al., 2010). In adulten *S. mansoni* wurden zudem in einer aktuellen Studie somatische Stammzellen, sog. *neoblast-like stem cells* identifiziert, die möglicherweise einer Regulation durch das FGFR-Homolog SmFGFR2 unterliegen. Entsprechende mitotisch aktive Zellen transkribieren den Rezeptor und sind über das gesamte Parenchym adulter Würmer verteilt. RNAi-Experimente zum *knock down* von SmFGFR2 hatten einen stark negativen Effekt auf die Mitose-Rate der *neoblast-like stem cells*, wobei unklar ist, ob dieser Effekt auf eine Inhibition der Zellproliferation oder auf eine Differenzierung der Stammzellen zurück geht. WISH-Analysen zu adulten Männchen lokalisierten Transkripte des FGF-Rezeptors SmFGFR2 zudem in den Testes als auch in Zellen des Darms. RNAi-Effekte auf diese Gewebe wurden im Rahmen der Studien allerdings nicht untersucht (Collins et al., 2013).

Zusätzlich zu SmFGFR2 wird mit SmFGFR1 ein weiteres Mitglied dieser Rezeptorfamilie im Genom von *S. mansoni* kodiert (Hahnel, 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführten gonadenspezifischen RT-PCRs (siehe 3.2 und 4.2) detektierten Transkripte beider FGFRs in Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni*. Diese Ergebnisse konnten für SmFGFR2 über *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden, allerdings gelang es im Gegensatz zur WISH-Analyse der parallel durchgeführten Studie (Collins et al., 2013) nicht, Transkripte im Parenchym und in Zellen des Darms nachzuweisen. Dies könnte methodischen Unterschieden, wie z. B. verschiedenen Hybridisierungstemperaturen und/oder den verwendeten RNA-Sonden geschuldet sein.

Im Gegensatz zu anderen hier untersuchten Rezeptoren zeigen beide FGFRs keine starke paarungsinduzierte Transkriptionsregulation auf Ebene der Gonaden. Einzig SmFGFR2 erscheint in Testes paarungserfahrener Männchen im Vergleich zu paarungsunerfahrenen Männchen hochreguliert. In Ovarien hingegen bleibt eine Transkription beider Rezeptoren unabhängig von der Paarung weitgehend konstant. Demnach scheinen beide FGFRs bereits in den Oogonien auf einem Niveau exprimiert zu werden, welches sich im Verlauf der Oogenese nicht mehr grundlegend verändert. Dies kann eventuell als ein weiteres Indiz für eine Assoziation von FGFRs mit schistosomalen Stammzellen angesehen werden. Dementsprechend erscheinen SmFGFR1 und SmFGFR2 als interessante Kandidaten für eine Beteiligung an gonadenspezifischen Signalprozessen.

Um beide FGFRs näher zu charakterisieren, wurden zunächst *in silico*-Analysen der Proteinsequenz durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass SmFGFR2 alle charakteristischen Merkmale von FGFRs aufweist (Turner & Grose, 2010), während SmFGFR1 zwar über eine TMH sowie intrazelluläre katalytische TyrKc-Domäne verfügt, im extrazellulären Bereich aber *IG-like* Domänen für Ligandenbindungen fehlen. Ebenfalls auffällig ist die Abwesenheit eines N-terminalen Signalpeptids welches eine Membranlokalisierung gewährleistet. Dies könnte für eine fehlerhafte Datenbanksequenz sprechen. Erste RACE-Experimente zur Aufklärung des 5'-Endes verliefen ergebnislos. Dementsprechend sollte es ein Ziel zukünftiger Untersuchungen sein, die Vollängensequenz von SmFGFR1 aufzuklären.

Um Hinweise auf biologische Funktionen von FGFRs in paarungserfahrenen *S. mansoni* zu erhalten, wurden erste funktionelle Analysen durchgeführt. Da FGFR-Signalprozesse bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen, sind mittlerweile eine Reihe unterschiedlicher, kommerzieller Inhibitoren gegen diese Rezeptoren erhältlich (Turner & Grose, 2010; Brooks et al., 2012). So wurde für die *in vitro*-Behandlung adulter *S. mansoni* der Angiokinase-Inhibitor BIBF1120 (SelleckChem) eingesetzt, der die Kinaseaktivität humaner *vascular endothelial growth factor*- (VEGF), *platelet derived growth factor*- (PDGF) und FGF-Rezeptoren im enzymatischen Assay mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 20 bis 100 nM spezifisch inhibiert (Hilberg et al., 2008). Die Blockierung der katalytischen Funktion erfolgt hierbei durch eine Interaktion des Wirkstoffs mit der ATP-Bindungstasche innerhalb der Kinasedomäne der Rezeptoren (Hilberg et al., 2008; Roth et al., 2009). Da allerdings keine Homologe von PDGF- und VEGF-Rezeptoren im Genom von *S. mansoni* kodiert werden, ist davon auszugehen, dass die beiden FGFRs primäre Ziele des Inhibitors darstellen. Um eine Funktionalität von BIBF1120 vorab zu überprüfen, wurden verschiedene Konstrukte der katalytischen TyrKc-Domäne von SmFGFR1 in Anlehnung an Studien anderer schistosomaler Signalmoleküle wie SmTK6, SmTK4 oder SmVKR1 *Xenopus* Oocyten exprimiert (Beckmann et al., 2011; Gouignard et al., 2012). Die Ergebnisse der GVDB-Assays zeigten, dass SmFGFR1 über eine funktionierende katalytische Domäne verfügt und diese bei einer Konzentration von 5 µM durch BIBF1120 vollständig inhibiert werden kann. Weitere Versuche mit niedrigeren Konzentrationen stehen noch aus. So ist letztlich noch ungeklärt, ab welchen Konzentrationen der Inhibitor wirksam ist. Ein äquivalentes Experiment mit der TyrKc-Domäne von SmFGFR2 muss ebenfalls noch erfolgen. Interessanterweise ergaben detaillierte Sequenzvergleiche der TyrKc-Domäne beider FGFRs mit Homologen vom Menschen und *D. japonica* Hinweise darauf, dass sich eine Aktivierung von SmFGFR2 möglicherweise grundlegend von denen anderer FGFRs unterscheidet. Ein bei



FGFRs konserviertes YY(R bzw. K)K-Motiv innerhalb der Aktivierungsschleife ist bei SmFGFR2 nicht vorhanden (siehe 3.3.4.2). Im humanen FGFR3 führt ein Aminosäure-Austausch von YYKK<sup>650</sup> zu YYKE<sup>650</sup> zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors (Webster et al., 1996; Neilson & Friesel, 1996). Die beiden Tyrosine in Nähe zum K<sup>650</sup> stellen Phosphorylierungsstellen dar, die im nicht-phosphorylierten Zustand das aktive Zentrum des Enzyms blockieren. Das Einbringen einer negativen Ladung in die Nähe dieser Tyrosinreste durch den Austausch K<sup>650</sup>E simuliert deren Phosphorylierung, wodurch es aufgrund von Konformationsänderungen zu einer Öffnung des aktiven Zentrums kommt (Webster et al., 1996; Neilson & Friesel, 1996). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine vergleichbare Mutation auch bei SmFGFR1 zu einer konstitutiv aktiven Kinase-Domäne. SmFGFR2 besitzt an gleicher Stelle hingegen die Aminosäureabfolge GYME<sup>781</sup>, welche bereits durch das Glutamat eine negative Ladung enthält (siehe Abb.3.24). Hieraus ergibt sich die Frage, ob SmFGFR2 bereits *in vivo* über eine konstitutiv aktive TyrKc-Domäne verfügt? Eine entsprechende Antwort hierauf könnte über eine Expression der SmFGFR2-TyrKc-Domäne im *Xenopus* GVBD-Assay erfolgen. Möglicherweise gleicht die SmFGFR2-Aktivierung damit der von EGF-Rezeptoren, welche ebenfalls eine schwach konstitutiv aktive TyrKc-Domäne besitzen (Wedegaertner & Gill, 1989; Bose & Zhang 2009). Eine vollständige Aktivierung nach Rezeptordimerisierung erfolgt hier nicht über Phosphorylierung der Aktivierungsschleife sondern betrifft Tyrosine außerhalb der TyrKc-Domäne in C-Terminus von EGFR (Bose & Zhang, 2009). Inwieweit SmFGFR2 allerdings neben der Homologie zu FGFRs auch Sequenzähnlichkeiten zu EGFRs in sich vereint, müssen zukünftige Sequenzanalysen klären. Möglicherweise stellt SmFGFR2 einen gemeinsamen Vorläufer von FGFRs und EGFRs dar, ein Phänomen, welches analog auch schon für die Src/Abl-Hybridkinase SmTK6 beschrieben wurde (Beckmann et al., 2011). Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass BIBF1120 SmFGFR1 im heterologen System inhibieren kann, wurden *S. mansoni*-Pärchen *in vitro* mit dem Inhibitor behandelt. Inhibitorkonzentrationen von 5 µM und 10 µM hatten dabei dramatische Effekte auf die Vitalität der Würmer. Bei diesen Konzentrationen kam es nach 72 h bzw. 24 h zu einer vollständigen Entpaarung behandelter *S. mansoni* und nach 96 h bzw. 48 h zum Tod der meisten Würmer. Um unabhängig dieser systemischen Schädigungen einen Einfluss des Inhibitors auf die Fortpflanzung zu untersuchen, wurde zusätzlich eine niedrigere Konzentration von 1 µM ausgewählt. Während die behandelten Pärchen eine stabile Paarung über den gesamten Versuchszeitraum zeigten, kam es bereits nach 24 h zu einer drastischen Reduktion der Eizythese um ca. 50 %. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf einen

spezifischen Effekt des Inhibitors auf die Reproduktion von *S. mansoni*. Anschließende konfokalmikroskopische Analysen offenbarten deutliche Effekte von BIBF1120 (1  $\mu$ M) auf die Morphologie von Testes und Ovarien gepaarter *S. mansoni*. Die Testesloben waren in ihrem Durchmesser deutlich reduziert und die Samenblase enthielt kaum reife Spermien. In den Ovarien erschienen immature Oocyten degeneriert und ohne deutliche Abgrenzungen zueinander. Dies lässt sich eventuell auf apoptotische Prozesse in diesen Zellen zurückführen. Die hier beobachteten Phänotypen in den Gonaden gehen damit möglicherweise auf eine spezifische Schädigung von Spermatogonien und Oogonien mit Stammzellcharakter durch den Inhibitor zurück. Dies deckt sich wiederum mit der Annahme, dass FGFRs in *S. mansoni* (Collins et al. 2013) wie in anderen Organismen auch an der Stammzellregulation und -aufrechterhaltung beteiligt sind (Dvorak et al., 2006; De Felici et al., 2009; Eiselleova et al., 2009; Gotoh, 2009; Dalton, 2013). Darüber hinaus sind FGFRs auch direkt in die Spermatogenese und Oogenese involviert (Cancilla et al. 2000, Zhang et al., 2010). Ungeklärt bleibt der Einfluss des Inhibitors auf die von Collins et al. (2013) beschriebenen *neoblast-like stem cells* im Parenchym adulter *S. mansoni*. Hier erscheint eine EdU-Behandlung sinnvoll, um eine Reduktion mitotisch aktiver Zellen nach BIBF1120-Anwendung zu untersuchen.

Der Einsatz höher Inhibitorkonzentrationen hatte hingegen einen drastischeren Effekt auf die Gesamtmorphologie behandelter *S. mansoni*. Vor allem im Weibchen erscheinen Zellen nicht nur im Ovar, sondern auch im Parenchym vielfach apoptotisch. Zudem ist der Darm bei beiden Geschlechtern stark geschädigt und massiv aufgebläht. Letzteres hängt möglicherweise mit einer Expression von SmFGFR2 in Darmzellen zusammen, wie sie über WISH nachgewiesen werden konnte (Collins et al., 2013). Interessanterweise zeigen Studien aus *C. elegans*, dass eine Dysregulation von FGFR-Signalprozessen einen bedeutenden Einfluss auf die Homöostase des Nematoden hat. Hier führt allerdings eine Zunahme der FGFR-Aktivität zu massiven Flüssigkeitseinlagerungen im Darm der Tiere (Huang & Stern, 2005; Birnbaum et al., 2005; Polanska et al., 2011), ein Phänotyp, der mit den hier getätigten Beobachtungen übereinstimmt. Inwieweit diese FGFR-induzierten Regulationsmechanismen denen von *S. mansoni* gleichen oder sich davon unterscheiden müssen zukünftige Studien klären.

Zusammenfassend lieferten die Inhibitorbehandlungen eine Reihe interessanter Hinweise auf mögliche physiologisch und reproduktionsrelevante Funktionen von FGFR-Signalprozessen in adulten *S. mansoni*. Allerdings sind Aussagen, die durch Inhibitorbehandlungen ganzer Organismen getroffen werden können, insofern mit Vorsicht zu betrachten, da häufig eine

unspezifische Inhibition anderer (Signal-)Moleküle nicht ausgeschlossen werden kann. So konnte über Kinaseassays gezeigt werden, dass BIBF1120 in höheren Konzentrationen auch humane Src-Kinasen inhibiert (Hilberg et al., 2008), eine Familie von CTKs, die auch bei *S. mansoni* u. a. durch SmTK3 in Reproduktionsprozesse involviert ist (siehe 1.4).

Um die beobachteten Inhibitorphänotypen auf eine spezifische Inhibition der FGFRs zurückführen zu können, wurden daher zusätzlich RNAi-Experimente gegen SmFGFR1 und SmFGFR2 durchgeführt. qPCR-Analysen offenbarten fünf Tage nach dsRNA-Behandlung eine deutliche Reduktion der Transkriptionsrate von SmFGFR1 und SmFGFR2 auf 5 % bzw. 10 % im Vergleich zu den Kontrollen. Hingegen zeigten konfokalmikroskopische Analysen keine morphologischen Veränderungen in den FGFR-*knock down*-Pärchen. Hieraus ergibt sich die Frage, warum ein RNAi-*knock down* im Vergleich zur Inhibitorbehandlung in keinem der Fälle zu einem Phänotyp geführt hat? Vorausgesetzt, die morphologischen Veränderungen der BIBF1120-Behandlung gehen auf eine spezifische Inhibierung der FGFRs zurück, so greift der Inhibitor direkt in FGFR-vermittelte Signalwege ein, während der RNAi-Ansatz wiederum auf Ebene der posttranskriptionellen Regulation ansetzt. Hierbei bleibt u.a. unklar, wie viele Tage nach Elektroporation ein nennenswerter Effekt auf die Transkriptionsrate von SmFGFR1 bzw. SmFGFR2 tatsächlich erfolgt? Darüber hinaus ist nicht vorhersehbar, wie hoch die Halbwertszeit des Proteins ist, dessen Neusynthese durch den RNAi-Effekt auf Basis der Translation verhindert wird. Zum Zeitpunkt eines einsetzenden RNAi-Effekts könnte somit noch FGFR-Protein vorhanden gewesen sein, dessen Präsenz die betreffenden Signalprozesse weiter aufrecht erhält. Möglicherweise führte dies dazu, dass der FGFR-Inhibitor aufgrund seiner direkten Wirkung effizienter einen morphologischen Phänotyp etablieren konnte.

Ein weiterer Unterschied beider Ansätze liegt zudem darin, dass der Inhibitor vermutlich sowohl auf SmFGFR1 als auch SmFGR2 wirkt, während die RNAi-Experimente jeweils spezifisch gegen einen der beiden Rezeptoren gerichtet sind. Möglicherweise sind beide Rezeptoren in ihren biologischen Funktionen teilweise redundant und können so den Verlust eines Rezeptors durch die Präsenz des anderen kompensieren. Aus Studien an Vertebraten ist bekannt, dass FGFRs innerhalb von Zellen häufig komplexe Signalnetzwerke bilden, welche sich in ihren Funktionen teilweise auch überlagern (Xu et al., 2013). So gibt es z. B. Hinweise auf redundante Funktionen von FGFRs bei der Entwicklung des ZNS bei Mäusen, da verschiedene FGFR-*knock out* Mutanten phänotypisch unauffällig blieben (Blak et al., 2007). Um diese Hypothese in Bezug auf SmFGFR1 und SmFGFR2 zu untersuchen, könnten RNAi-

Experimente mit kombinierten dsRNAs durchgeführt werden, um einen gleichzeitigen *knock down* beider Rezeptoren zu bewirken. Außerdem sollten behandelte *S. mansoni* über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, um der möglichen zeitabhängigen Etablierung eines Phänotyps Rechnung zu tragen.

Zusammenfassend liefern die hier erhaltenen Resultate weitere Hinweise auf eine bedeutsame Rolle von FGFR-Signalwegen in adulten *S. mansoni*. Neben dem von Collins et al. (2013) festgestellten Einfluss auf die Regulation somatischer Stammzellen konnte in dieser Arbeit eine mögliche Beteiligung von FGFR-Rezeptoren an reproduktionsrelevanten und physiologischen Prozessen ausgemacht werden. Zukünftige Studien sollten auch zum Ziel haben, mögliche Liganden und Interaktionspartner wie Co-Rezeptoren oder *downstream* gelegene Signalmoleküle zu identifizieren um detailliertere Einblicke in FGFR-ermittelte Signalwege zu erhalten. Eine interessante Frage wird dabei sein, ob ihre Aktivierung möglicherweise durch Wirts-FGF erfolgt oder endogene Liganden im Parasiten vorhanden sind. Erste eigene Datenbankrecherchen führten zu keiner Identifizierung von FGF-Genen in *S. mansoni*. Mit Hinblick auf den bekannten Einfluss von FGFRs auf Embryogenese und Organentwicklung (De Moerlooze et al., 2000; Turner & Grose, 2010) erscheint zudem eine Ausweitung funktioneller Studien auf weitere Entwicklungsstadien von *S. mansoni* sinnvoll, wie es bereits für Frz-Rezeptoren diskutiert wurde (siehe 4.3.3). Ihre Assoziation mit Stammzellen macht beide FGFRs darüber hinaus als potentielle Stammzellmarker für die Entwicklung schistosomaler Zelllinien interessant.

Abseits dieser für die Erforschung der Entwicklungsbiologie von *S. mansoni* relevanten Punkte liefern die Inhibitorexperimente mit BIBF1120 eventuell eine neue interessante Komponente auf der Suche nach alternativen Therapeutika, wie es bereits für andere Krebsmedikamente wie Imatinib diskutiert wird (Beckmann & Grevelding, 2010; Dissous & Grevelding, 2011; Beckmann et al., 2012a).

### **4.3.5 Charakterisierung zweier potentieller transmembranen Progesteron-Rezeptoren aus *S. mansoni***

Das Steroidhormon Progesteron spielt eine bedeutende Rolle bei Reproduktionsprozessen von Vertebraten (Penzlin, 1996; Scarpin et al., 2009), wie z. B. der Reifung von Oocyten sowie der Vitellogenese (Custodia-Lora & Callard, 2002; Thomas, 2012). Hingegen sind biologische Funktionen von Progesteron bei Invertebraten kaum bekannt. Erst in den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, dass Wirbeltiersteroide auch bei Vertretern anderer

Tiergruppen wie Insekten, Nematoden und Plattwürmern verschiedene biologische und häufig mit Entwicklung oder Fortpflanzung verbundene Prozesse beeinflussen (Kashian & Dodson, 2004; Lafont & Mathieu, 2007; Coccia et al., 2010). So konnten neben Sexualhormonen wie Progesteron, Östrogen oder Testosteron, auch Homologe von Stoffwechsellenzymen der Steroidsynthese und steroidhormonbindende Rezeptoren aus Wirbeltieren in verschiedenen Invertebraten nachgewiesen werden (Köhler et al., 2007; Mimoto et al., 2007; Keay & Thornton, 2009; He, et al., 2010). Dennoch ist bisher unklar, ob diese Steroide natürlich vorkommende Hormone in diesen Tierarten darstellen oder ob sie möglicherweise aus der Umwelt in den Organismus gelangen (Lafont & Mathieu, 2007; Scott, 2012; Scott, 2013). Eine Sonderstellung hierbei nehmen parasitierende Helminthen von Wirbeltieren ein, die natürlicherweise mit Sexualsteroiden in Kontakt kommen und in ihren Entwicklungsprozessen vielfach von Wirtskomponenten beeinflusst werden (Escobedo et al., 2005; Brehm, 2010; Oliveira et al., 2012). So konnten positive Effekte von Progesteron auf die Entwicklung und Reproduktion von Nematoden- und Plathelminthen-Arten beobachtet werden (Escobedo et al., 2004; Escobedo et al., 2010; Hernandez-Bello et al. 2011).

Während die „klassische“ Detektion von Steroidhormonen häufig über intrazelluläre Rezeptoren der *nuclear steroid receptor*-Superfamilie erfolgt, welche als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren wirken (Tsai & O'Malley, 1994; Tsai et al., 2004), sind in neuerer Zeit auch verschiedene transmembrane Rezeptoren mit Progesteron-bindenden Eigenschaften identifiziert worden, deren Signalwege häufig über *sec. messenger* laufen (Thomas, 2008). Viele Progesteron-induzierte Prozesse bei Wirbeltieren wie die Oozytenreifung konnten mittlerweile mit Vertretern dieser Transmembranrezeptoren in Verbindung gebracht werden (Thomas, 2012). Ihre Funktionen bei Invertebraten sind bisher hingegen kaum erforscht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Genom von *S. mansoni* zwei Rezeptoren mit Homologie zu Progesteron-bindenden Transmembranrezeptoren aus Vertebraten identifiziert. Transkripte der als SmProgesterinR1 und SmPMRC1 bezeichneten Rezeptoren konnten über gonadenspezifische RT-PCRs in Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni* nachgewiesen werden. Zudem zeigten qPCR-Analysen eine paarungsinduzierte Zunahme der Transkriptionsrate beider Rezeptoren sowohl bei einer Betrachtung ganzer Würmer als auch bei einer Fokussierung auf die Gonaden. Besonders deutlich war dieser Effekt bei dem Vergleich der Transkriptlevel in Ovarien paarungserfahrener und -unerfahrener Weibchen zu erkennen. Hier führte die Paarung zu einer mehr als 3-fachen Zunahme der Transkriptmenge bei SmProgesterinR1 bzw. 8-fach bei SmPMRC1. Anschließende Sequenzanalysen ordneten

beide Rezeptoren unterschiedlichen Proteinfamilien zu. SmProgesterinR1 zeigt Homologie zu Progesteron-bindenden Vertretern der *progesterone and AdipoQ* (PAQ)-Rezeptorfamilie und verfügt über eine 7TMH-Struktur, wohingegen SmPMRC1 Homologie zu *progesterone membrane receptor component* (PMRC)-Proteinen anderer Organismen aufweist. Obwohl ihre biologischen Funktionen bisher kaum erforscht sind, werden beide Rezeptorgruppen in Säugetieren in einer Reihe unterschiedlicher Organe und Gewebe einschließlich der Reproduktionsorgane, der Muskulatur und dem zentralen Nervensystem exprimiert und entsprechend diesen vielfältigen Lokalisationen mit vielen Progesteron-induzierten Prozessen in Verbindung gebracht (Thomas, 2008). Progesteron-bindende PAQRs wurden darüber hinaus als die entscheidenden Rezeptoren bei dem durch Progesterone induzierten *germinal vesicle breakdown* (GVBD) von Oocyten verschiedener Fischarten identifiziert (Thomas, 2012), während es für MPRCs auch erste Hinweise auf eine Beteiligung an Reproduktionsprozessen von Invertebraten gibt (Preechaphol et al., 2010; Stout et al., 2010). Dies macht SmProgesterinR1 und SmPMRC1 als zwei Vertreter dieser unterschiedlichen Rezeptorfamilien zu interessanten Kandidaten für diverse Funktionen in der Fortpflanzung von *S. mansoni*. Obwohl PAQRs und MPRCs eine bedeutende Rolle bei der Entstehung verschiedener Tumore spielen (Rhoe et al., 2009; Ahmed et al., 2010b; Thomas, 2012), sind derzeit noch keine kommerziellen Inhibitoren gegen diese Proteinklassen erhältlich. Aufgrund deren theoretischen Eigenschaft Progesteron binden zu können, wurden Pärchen von *S. mansoni* in einem ersten Experiment mit dem Steroidhormon *in vitro* behandelt, um gegebenenfalls die Aktivität der Rezeptoren zu stimulieren. Hierbei zeigte sich, dass Progesteron einen positiven Einfluss auf die Eizytoplastik der Pärchen hatte.

Der stärkste Effekt trat 72 h nach Behandlungsbeginn auf. Zu diesem Zeitpunkt legten die behandelten Pärchen unter Progesteron-Einfluss ca. dreimal (10 ng/ml; ~0,03 µM), bzw. vier- bis (1 µg/ml; ~3 µM) fünfmal (100 ng/ml; ~0,3 µM) so viele Eier im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollpärchen. Besonders bei höheren Konzentrationen wurden vermehrt S4-Vitellinzellen im Medium beobachtet, was auf eine Überproduktion hindeutet. Nach diesem Peak kam es 96 h nach Behandlungsbeginn wieder zu einer Angleichung der Eizytoplastikraten. Dies lässt vermuten, dass die Zugabe des Steroidhormons zunächst einen stimulierenden Effekt auf die Eizytoplastik hat, dieser aber nach längerer Kultivierung von anderen Faktoren überlagert wird. Möglicherweise kommt zu diesem Zeitpunkt das als *in vitro*-Regression bezeichnete Phänomen zum Tragen, welches eine De-Differenzierung des Vitellariums gepaarter Weibchen unter *in vitro*-Kulturbedingungen beschreibt (Galanti et al., 2012). Konfokalmikroskopische Analysen behandelter Pärchen, offenbarten morphologische

Veränderungen bei höheren Progesteron-Konzentrationen (100 ng/ml; ~0,3  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$ ; ~3  $\mu\text{M}$ ) im Vitellarium in Form von stark vergrößerten Vitellinloben, was möglicherweise mit einer S4-Überproduktion zusammen hängt. Hingegen konnten keine Effekte auf Testes und Ovarien beobachtet werden, jenen Organen in denen Transkripte beider potentiell Progesteron-bindenden Transmembranrezeptoren lokalisiert worden waren. Dies spricht dafür, dass die positiven Effekte des Steriodhormons auf die Eilegerate gepaarter *S. mansoni* möglicherweise auf eine Stimulation der Vitellinzellsynthese im Weibchen zurückzuführen sind. Bereits bei anderen Invertebraten konnten Progesteron und weitere Wirbeltiersteroiden mit der Vitellogenese in Verbindung gebracht werden. So konnte z. B. gezeigt werden, dass Progesteron die Transkription von Vitellogenin, einem Marker für die Vitellogenese während der Reproduktion von *Cherax albidus* erhöht (Coccia et al., 2010). In *C. elegans* hingegen führten Behandlungen mit Östrogen zu einer Überexpression an Vitellogenin-Genen, während Progesteron in diesem Fall einen negativen Einfluss auf die Vitellogenese zeigte (Custodia et al., 2001). Bei dem Rädertierchen *B. manjavacas* wurde darüber hinaus eine Bindung von Progesteron neben den Ovarien vor allem im Vitellarium detektiert (Stout et al., 2010). Um den Einfluss von Progesteron auf das Vitellarium von gepaarten *S. mansoni* Weibchen weiter zu untersuchen, könnte analog zu obigen Studien der Einfluss des Steroidhormons auf die Transkription vitellariumassoziiierter Gene wie p14 (Köster et al., 1988), fs800 (Reis et al., 1989; Dewalick et al., 2011) oder die Tryrosinasen SmTyr1 und SmTyr2 (Fitzpatrick et al., 2007) untersucht werden. Entsprechende Gene werden vernehmlich im ausgereiften Vitellarium als Folge der Paarung exprimiert (Reis et al., 1989; Grevelding et al., 1997; Fitzpatrick et al., 2007; Cogswell et al. 2012) und sind Eischalenbestandteile (p14, fs800) oder an der Eischalenbildung (SmTyr1, SmTyr2) beteiligt. Progesteron-spezifische Antikörper könnten zusätzlich Aufschluss darüber geben, ob sich in der *in vitro*-Kultur aufgenommenes Progesteron über den gesamten Wurmkörper verteilt oder in spezifischen Geweben aufgrund von Rezeptorinteraktionen akkumuliert. Zudem sind *in situ*-Hybridisierungen zu SmProgesterinR1 und SmPMRC1 notwendig, um zu überprüfen, ob einer oder beide Rezeptoren über die Gonaden hinaus auch mit dem Vitellarium assoziiert ist. Alternativ könnte dies zukünftig bei erfolgreicher Etablierung der Vitellariumisolierung (siehe 4.1) auch über einen RT-PCR-basierten Transkriptnachweis mit organspezifischer RNA erfolgen.

Bisher gibt es wenige Hinweise auf die Rolle von Steroidhormonen auf die Biologie von *S. mansoni*. Im Rahmen einer Studie von Morrison et al. (1986) konnte ein negativer Einfluss von Progesteron auf die Eiproduktion von *S. mansoni* nachgewiesen werden. Allerdings

waren die eingesetzten Konzentrationen des Steroidhormons, bei denen eine signifikante Reduktion der Eiproduktion festgestellt wurde, mit 100  $\mu\text{M}$  wesentlich höher als die hier verwendeten Konzentrationen. Möglicherweise spielen bei höheren Progesteron-Konzentrationen unspezifische Nebenwirkungen eine negative Rolle.

So bleibt die Frage, ob Progesteron eine natürliche biologische Funktion in *S. mansoni* besitzt oder aber aufgrund ähnlicher Struktur die Wirkung anderer Steroide imitiert. Zudem bleibt unklar, welche Rezeptoren letztlich durch das *in vitro* hinzu gegebene Progesteron stimuliert werden. Die Konzentrationen von Progesteron im Blut erwachsener Menschen liegt bei bis zu 2 ng/ml (Behrends et al., 2010). Während des Menstruationszyklus kann dieser Wert bei Frauen auf über 12 ng/ml ansteigen und erreicht während der Schwangerschaft ein Maximum von 90 bis 130 ng/ml (Schwegler & Lucius, 2011). Die im Rahmen der *in vitro*-Versuche eingesetzten Konzentrationen liegen daher zumindest teilweise (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) noch in Konzentrationsbereichen, die auch *in vivo* eine Rolle spielen könnten. Zwar gibt es Hinweise auf höhere Eiproduktionen in infizierten weiblichen Mäusen, allerdings können diese Unterschiede auch auf immunmodulatorische Eigenschaften von Testosteron zurückgeführt werden, womit der Nachweis einer direkten Rolle von Wirbeltiersteroiden auf die *in vivo*-Entwicklung von *S. mansoni* bisher nicht erbracht werden konnte (Nakazawa et al., 1997; De Mendonca et al., 2000). Zugleich verdeutlicht dieses Phänomen die prinzipielle Problematik, die weitaus komplexere *in vivo*-Situation innerhalb des Wirtes mit der *in vitro*-Kultur zu vergleichen. Da auch ein direkter Nachweis von Progesteron in *S. mansoni* bisher nicht erfolgt ist, gehen die hier beobachteten Effekte von Progesteron möglicherweise auf eine unspezifische Reaktion zwischen dem Hormon und Steroidrezeptoren aus *S. mansoni* zurück.

Dennoch werden Steroide als mögliche entwicklungsrelevante Faktoren in Schistosomen diskutiert. So könnten Steroidhormone einen entscheidenden Faktor bei der männcheninduzierten Reifung von *S. mansoni* Weibchen darstellen (De Mendonca et al., 2000; Kunz, 2001). Zu den bisher in Schistosomen nachgewiesenen Steroiden gehören Ecdysteroiden und Östradiol-ähnliche Verbindungen. Auch hier ist allerdings unklar, ob diese Steroide endogenen Ursprungs sind (De Mendonca et al., 2000; Botelho et al., 2009). Hingegen sind neben den beiden hier identifizierten potentiell Progesteron-bindenden Transmembranrezeptoren SmProgesterinR1 und SmPMRC1 eine Reihe weiterer nukleärer Steroidrezeptoren im Genom von *S. mansoni* kodiert (Freebern et al., 1999; Fantappie et al., 2001; Wu & LoVerde, 2008). Interessanterweise sind zwei dieser Rezeptoren, SmRXR1 und



SmRXR2, beides Homologe der RXR-Unterfamilie innerhalb der Steroidrezeptor-Superfamilie, u. a. im Vitellarium gepaarter Weibchen lokalisiert und möglicherweise durch eine Bindung an die Promoterregion von p14 an der Transkriptionsregulation des Eischalenvorläuferproteins beteiligt (Fantappie et al., 2001). Damit stellen die beiden Rezeptoren ebenfalls potentielle Kandidaten bei einer Vermittlung der hier beobachteten Progesteron-Effekte dar.

Um Hinweise auf eine Rolle von SmProgesterinR1 und SmPMRC1 bei Reproduktionsprozessen adulter *S. mansoni* zu erhalten, wurden zusätzlich RNAi-Experimente gegen beide Rezeptoren durchgeführt. Hierbei konnte nach Ende des Behandlungszeitraums von fünf Tagen eine Transkriptreduktion auf 5 % (ProgesterinR1) bzw. 16 % (SmPMRC1) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Hingegen zeigten behandelte Pärchen keine morphologischen Veränderungen unter dem KLSM, und zwar werden in den Gonaden noch im Vitellarium. Wie unter 4.3.4 ausführlicher erläutert ist eine Erklärung hierfür eine möglicherweise hohe Stabilität der Proteine, so dass während der Behandlungsdauer noch keine relevante Inhibition von SmProgesterinR1- bzw. SmPMRC1-vermittelten Signalwegen erfolgen konnte, die sich in veränderten Phänotypen hätte niederschlagen können. Sollten beide Rezeptoren weiterhin in die postulierte, Progesteron-induzierte Stimulation der Vitellinzellsynthese involviert sein, so wäre im Falle eines *knock downs* ein negativer Effekt auf die Vitellogenese zu erwarten, welcher möglicherweise durch die *in vitro*-Regression des Vitellariums überlagert wird (Galanti et al., 2012)

Eine weitere Erklärung bietet ein Szenario, in dem beide Rezeptoren zwar in Testes und Ovarien transkribiert, aber im Sinne einer mRNA-Speicherung in reifen Spermien und Oocyten nicht im adulten Wurm, sondern erst während der Embryogenese im Ei exprimiert werden. Dementsprechend sollten neben einer Bestimmung der Eizahlen auch die Embryogenese der Eier in zukünftige RNAi-Versuche mit eingeschlossen werden.

Sollten sich die Ergebnisse der Progesteron-*in vitro*-Versuche verifizieren lassen, würden Steroidhormone und ihre Rezeptoren wieder verstärkt in den Fokus für reproduktions- und entwicklungsrelevante Signalprozesse adulter *S. mansoni* rücken.

Interessante Ansätze für weitere Untersuchungen wäre auch der Einsatz von Progesteron-Analoga wie z. B. RU486 (Escobedo et al., 2010) zur Behandlung von *S. mansoni*-Pärchen, oder RNAi-Ansätze gegen SmRXR1 und SmRXR2. Zudem sollte ein weiterer Schwerpunkt auf der Identifikation natürlicher Liganden potentieller Progesteron-bindender Rezeptoren liegen.



## 5. Zusammenfassung

Motiviert durch die enormen sozioökonomischen Folgen der Schistosomiasis in tropischen und subtropischen Endemiegebieten weltweit werden derzeit große Anstrengungen unternommen, die Verbreitung der parasitären Infektionskrankheit einzudämmen. Auf der Suche nach alternativen Behandlungsmethoden zu den gegenwärtig limitierten Therapieansätzen ist u.a. ein fundiertes Wissen über die Entwicklungsbiologie von Schistosomen unerlässlich. Ziel meines Promotionsvorhabens war es daher, einen Beitrag zur Aufklärung zentraler Signalprozesse aus *S. mansoni* zu leisten, die im Zusammenhang mit der Entwicklung und Differenzierung des Parasiten stehen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf den molekularen Mechanismen, welche der paarungsinduzierten Reifung adulter Schistosomen zugrunde liegen. Diese sind im Hinblick auf die Fortpflanzung und Aufrechterhaltung des Lebenszyklus, aber auch wegen der Rolle der Eier bei der Induktion pathologischer Prozesse von besonderer Bedeutung. Im Fokus meiner Untersuchungen standen verschiedene Transmembranrezeptoren, die aufgrund ihrer Homologie zu entwicklungsbiologisch relevanten Genen anderer Organismen möglicherweise bereits beschriebenen gonadenspezifischen Signalwegen aus *S. mansoni* voran gestellt sind.

Die Untersuchung gewebespezifischer Genfunktionen in adulten *S. mansoni* wird allerdings durch einen eingeschränkten Zugriff auf innere Organe wie die Gonaden erheblich erschwert. Ein erstes Ziel war es daher, ein Protokoll zur Isolation von Testes und Ovarien aus adulten *S. mansoni* zu etablieren, um Transkriptionsanalysen auf der Ebene von Organen durchführen zu können. Über eine Kombination aus Detergenzien- und Proteasebehandlung gelang es, Testes und Ovarien aus paarungserfahrenen und -unerfahrenen *S. mansoni* zu erhalten. Hieran anknüpfende Analysen zeigten weiterhin, dass die isolierten Gonaden vitale Zellen und RNA in ausreichender Menge und Qualität für nachfolgende molekularbiologische Anwendungen enthielten. Um eine Anwendbarkeit der Methode für gewebespezifische Transkriptionsanalysen zu belegen, wurden erste RT-PCRs mit RNA aus Testes und Ovarien paarungserfahrener *S. mansoni* durchgeführt. Die hierbei erzielten Resultate bestätigten und/oder ergänzten frühere Studien ausgewählter Gene bezüglich einer Transkription in den Gonaden und lieferten außerdem erste Hinweise auf die Transkription weiterer, bisher nicht untersuchter Gene in diesen Organen. Damit erwies sich dieser Ansatz als geeignet, Ergebnisse anderer, wesentlich zeitaufwendigerer Lokalisationsmethoden, wie *in situ*-Hybridisierungen zu verifizieren und aufgrund der höheren Sensitivität organspezifischer RT-PCRs zu ergänzen oder zu ersetzen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher gonadenspezifische RT-PCRs in Kombination mit *in situ*-Hybridisierungen angewendet, um die Transkription ausgewählter Transmembranrezeptoren in Testes und Ovarien adulter *S. mansoni* nachzuweisen. Zusätzlich wurden erstmals Transkriptionsanalysen mittels qPCRs durchgeführt, um Hinweise auf paarungsabhängige Transkriptionsmuster verschiedener Rezeptorgene auf Ebene der Gonaden zu untersuchen. Die erhaltenen Ergebnisse belegten erstmals den Einfluss des Paarungskontakts auf die Genexpression von Testes und Ovarien adulter *S. mansoni*. So konnten eine Reihe interessanter Kandidaten identifiziert werden, deren Transkriptionsraten teilweise erheblich durch die Paarung beeinflusst werden, wie das *Frizzled*-Homolog SmFrz1 und der Neuropeptidrezeptor SmNPYR1.

Den dritten Teil der Arbeit bildeten weiterführende Charakterisierungen einiger dieser Rezeptorgene in adulten *S. mansoni* mittels funktioneller Analysen wie Inhibitorstudien oder RNAi-Experimenten. So konnten das transmembrane Mucin SmTmMuc1 und SmNPYR1 aufgrund von morphologischen Veränderungen in Ovarien bzw. Testes nach RNAi-*knock down*-Experimenten mit einer Beteiligung an der Gametogenese adulter *S. mansoni* in Verbindung gebracht werden. Ebenfalls an gonadenspezifischen Signalwegen beteiligt sind darüber hinaus möglicherweise die FGFR-Homologe SmFGFR1 und SmFGFR2, deren Inhibition zu einer Reduktion der Eiproduktion adulter *S. mansoni* führte. SmFrz1 hingegen scheint morphologischen Eianalysen nach Inhibitor- und RNAi-Experimenten zufolge für frühe Entwicklungsprozesse von Bedeutung zu sein, da entsprechende Behandlungen mit Defekten in der Embryogenese einhergingen. Darüber hinaus ergaben die Identifizierung potentiell Progesteron-bindender Transmembranrezeptoren und erste *in vitro*-Behandlungen mit diesem Steroidhormon Hinweise auf eine reproduktionsrelevante Rolle von Progesteron oder verwandten Verbindungen in adulten *S. mansoni*.

Zusammengefasst erweitern die vorliegenden Ergebnisse bisher untersuchte Signalprozesse in den Gonaden adulter *S. mansoni* um weitere Signalmoleküle in Form von Transmembranrezeptoren unterschiedlicher Proteinfamilien. Aufgabe zukünftiger Studien wird es u.a. sein, *downstream*-Interaktionspartner dieser Rezeptoren zu identifizieren und sie so in das Gesamtbild gonadenspezifischer Signalwege zu integrieren. Unter Berücksichtigung der Sonderstellung von Transmembranrezeptoren bei der Vermittlung extra- und intrazellulärer Signale und ihrer medizinischen Relevanz als potentielle *drug targets* eröffnen

sich durch eine Identifizierung ihrer Liganden sowie weiterer Aufklärung ihrer biologischen Funktionen neue Perspektiven zur Bekämpfung der Schistosomiasis.

### Summary

Motivated by the tremendous socioeconomic consequences of schistosomiasis in tropic and sub-tropic endemic areas worldwide, many efforts are currently made to control this disease. Searching for alternative medical treatments to complement or replace present therapies requires fundamental knowledge of the schistosome biology. Therefore, the aim of my PhD thesis was to contribute to the elucidation of central signaling processes involved in development and differentiation of the parasite. Those molecular mechanisms were of main interest, which are part of the pairing-induced sexual maturation of adult schistosomes. This phenomenon is of outstanding relevance with respect to the role of eggs for maintaining the life cycle but also for inducing pathogenesis. My work concentrated on different classes of transmembrane receptors which, due to their homology to developmentally important genes of other organisms, are interesting candidates for interactions with molecules already described to be involved in gonad-specific signaling pathways of *S. mansoni*.

The investigation of tissue-specific gene activities in *S. mansoni* is limited by the restricted access to inner organs like the gonads. Therefore, the first aim of my study was the establishment of a protocol suitable for the isolation of testes and ovaries of adult *S. mansoni* to perform transcriptional analyses at the organ level. Using a combination of detergent and protease treatment it was possible to get access to ovaries and testes of pairing-experienced and -unexperienced worms. Subsequent analyses showed that isolated gonads contained vital cells and RNA in sufficient amounts and quality for subsequent molecular applications. To confirm the usefulness of the method for tissue-specific transcriptional analyses first RT-PCRs with RNA from isolated testes and ovaries of pairing-experienced *S. mansoni* were performed. First, the results confirmed and/or completed former localization studies of selected genes with respect to their transcription in the gonads. Secondly, first hints were obtained for gonad-specific transcriptional activity of genes, which had not been characterized so far. Taken together, this approach is suitable to verify results of more time-consuming localization methods such as *in situ* hybridization, and even to complete or replace them due to the high sensitivity of the organ RNA-based RT-PCR reactions.

In the second part of this work a combination of gonad-specific RT-PCRs and *in situ* hybridizations was used to detect the localization of transcripts of different transmembrane

receptor genes in testes and ovaries of adult *S. mansoni*. Additionally, first transcriptional analyses by qPCRs were performed to investigate pairing-dependent transcription patterns of different receptor genes at the gonad level. The obtained results proved the influence of the pairing contact on gene expression in testes and ovaries of adult schistosomes for the first time. This led to the identification of several interesting candidates whose transcriptional profiles were in part considerably influenced by pairing, like the Frizzled-homolog SmFrz1 and the neuropeptide receptor SmNPYR1.

The third part of this study dealt with further characterizations of some of these transmembrane receptor genes in adult *S. mansoni* by functional analyses such as inhibitor treatments or RNAi experiments. The transmembrane mucin SmTmMuc1 and SmNPYR1 were found to be involved in gametogenesis since morphological changes were observed in ovaries or testes upon RNAi knockdowns. The two FGFR homologs SmFGFR1 and SmFGFR2 are possibly also part of gonad-specific signaling pathways as an inhibition of FGFR-signaling in *S. mansoni* couples led to a reduction of egg synthesis. In contrast to this, SmFrz1 seems to be an important factor for early processes in development as the results of egg-morphology analyses following inhibitor studies and/or RNAi experiments pointed to incomplete embryogenesis. Additionally, the identification of two potential progesterone-binding transmembrane receptors as well as an initial *in vitro* treatment with this steroid hormone provided first hints of a role of progesterone, or closely related compounds, on processes involved in sexual reproduction of the parasite.

Summarizing the present results of this work, interesting new transmembrane receptor genes representing different protein families were identified, which extends the knowledge about known signaling processes in the gonads of adult *S. mansoni*. Among others, future challenges are to identify downstream interaction-partners of those receptors to integrate them in the overall picture of gonad-specific signaling pathways. With respect to the exceptional position of transmembrane receptors in the mediation of extracellular and intracellular signaling processes and their medical relevance as potential drug targets, the identification of their ligands and further elucidation of their biological functions may open new perspectives for fighting schistosomiasis.



## 6. Anhang

### 6.1 SmTmMuc1-Sequenz

Die CDS von SmTmMuc1 geht auf den GeneDB-Eintrag Smp\_073450 zurück und besitzt eine Gesamtlänge von 11.250 bp. Hiervon konnten im Rahmen dieser Arbeit 1.622 bp des 5'-Endes und 4.875 bp des 3'-Endes amplifiziert werden. Die Amplifikation eines Bereiches von 4.771 bp steht noch aus (grau unterlegt). In der nachfolgenden Sequenz sind weiterhin über das Programm Repfind (Betley, et al., 2002) nachgewiesene repetitive Sequenzen in rot dargestellt (Mindestlänge 12 bp).

```

ATGGCTACTGAAAGTCTTCAAGCTCGACTGACTGATTTTCGAGCGTCAAGCACGTGGTGTATGTATAGGTGTGAAT
CATTTAGCGCTTGACAGTGAACGTGTTAGACAAGCTGAATTATTACAAAAATTATACAACCTAGAAAAAGATATT
CAACAATCGAGTGCACAAAAATCCCATTTACCTGAAGCAGCAGCTGAGATTCGTGATGATGTGAAGAAATAATACA
TCGGCATTACGTTACTTAGAAAACAATATCTCAATTGGAGAATTCATTTACAGTTCCTAACAGAAAAATGTCACTGAA
ACTTCTGTACAACCTAAGTGCACCTAAAGAGTTAAAAGATGAAGTTCATGTGAAAAAGGAATTAAGTGGTAATGTG
AAAAGTTGTTGGACATATGTTTCTCAATTGGCCCCGATTAAGTCAAGTACACATTAGGAATGCCGCTGAATACCAT
CAGTTTCATCATGCAGTTAATGAAGCTGAAGCCAGTTTGAAAGCACGTGTACGGATGACAGAACCGAGAAATACA
AGAGCATTACCTGCAACTTTGAAAAACTGTACAATTTTGCCCAATGAATTGAGGGAACATCTTAATCATATGATT
CATTTATGGGGTCGATCAGGCAATTTACTTGAAGAAAGCCGACGTATTGTTTCTGTTCACTTAAGACTAGGTGGT
GTTATTGATGGTCTGAGTACTAATACAGAATCCGCTAGCCAGTTATGGCTCGTATGTTAACTTCATTGACAGGA
CCAAATTATGAATTAAGAAGGTGAAGAAGTACGCGTTATATCGAATAAAGATGATCAACACTTTTGGACAGTG
CAAACAATAATGGTATAGTAAAAATACCATCTGTTTGTGTTATGGATAAGTATCCAGATTTAGAAAGCTGTA
CGATCAGTGATACTTCGTGAAAAATGATTGAATCATGGGATTTACTTGTGGAAAGATCACGTGAACGACTAAGA
TCCTATTACAGTTGTTTATTAATCAAATGGCAGAAAATGGAGATATTCAATATCAGCATAAAAATAGCTATGGAT
AATTTTCTAGAAGATTTAAGAGGTCTTCTCTTACCCAATGATACAAGAGCAACTGAATTAAGCCAAGCTATATAT
GCATTTACAGATAGATTGAAAATGACAGATATTAATCGACAACCGCAGTCCACATGGTGGAGTATTTTGGAGAGAA
CAAGATATTGTTTGTATGCATAGTCCATTGTTAAGACTACGTGATCATGAACGTCAAATGGACCATTTACGTGCA
CAATCTGAACTGGCTGGAACCTCATATGACAAATTTTACGTGAAATTGATGCAGATCAAAAACGAGTTGATCAG
GAATTATCGTTGATAGATCAGTTACAACATGAGAGTCAGTCTCAGTTGGATCAATTGATAAATCGTGTGAAAAGA
TGGAGTAGCCGATATGAGCATGAACCGAATGTTGATTCTAGCATATCCAATTCAGAAATGAGTTCTAGTTTAAAA
TCTAGTACAATATCTGACAATTTGGGCAGGTAATAATCAAATGTATCCAATAGATGCAAGATCACCTCAATCTATA
GTTAGAGAAACATCGCGATTATCGTCTAGAACAAGATCAGAATCAATCCCACGTCCAGTACTTGATGCCATTACA
CAAATTTGGTGTTACAACCAAAACAACAGGAACTCAAATTTCTCATGACGACGGTGTGGTGGTTCGTAATGAAATA
GATTTATCTATATCTAAAAGACACTTTATGCCAGCGACGATTCCTGAAAGAAAACAAGTAAGAAATGCAATAACT
CAAATTTGGAGTATCAAAAGTCGATGCAGGCACACAAGATGACTATCATGGATACAGTCCCTAAGCGTTCAAGTTAAA
GAAGTATATGTCAAATAGGTCAAATTCAGACAAAATGCTTCTCATGTGACAGACATTAGAACAATCAAACTACAACAA
ACACTTAAAAAACCCACTTTAGATGCTGTAGTTCAATCTGGTGTATCACTAAGAATAATTCACACTCAGTCGGAA
TACATCACAGAAACCGTTCGTGAAAATGGACATACCTGAATCACAAAAAGCTGCACGAAAAATATAGCGTACTAGAT
GCCATCTGTCAAATAGGACAGGTTACACAAAACAATGGAAACACAAAACAGAAAGTAAAGAATACTGAAAGAAATAAG
AAAAATCTCGGTGTACAAGCAGAAATGAAAAAGGCATGGCAGCACACAGTAAACACAAAATGAGGCCGATGTCAA
ATAGGTAGGATAACAATTAACGCTAGCACAGAGATGTCACCAATGATGGTCAGTAAGGAAGAAAGTATAAAAACA
GATATTAAGAAAGTATATAATATGTCAAATAGGCAAGGTTGAAATGACAAATCAACACAAAATAACGCAACA
GAAAAGTTAAAAACTACAACAATTAACATTCAGCAAACCAATACGAAATCCAAAAAGCTTCAACCTCTAGTCAG
GTAGATGTTTTAACGAAAAGACATATAAACGTACGCTTAAATCTGTCAACGATGTTATATGTCAAAGTCCGGACAG
GTAAACCATGAAGTATCCACACAGTCAGTTGAATACGTCACTACTAGACCCGGCACACAAGGATACTGGCATTGAT
CCGATTCACGTGTGGGAAAAGAAAACGGCCAACGATGTGTCGTGACGCAAAACAGGAATTTGTTACACATCGAAAAGTA
ACACAGGCTGAACTGATACAAGAACAACCGGTATATGTGAAAGCAATAGAAACTCAGGATGTACCGATTACATCG
TACAGAAACACTGTAGATGCCTACCAACAGGCTGACTTAATTAAGCATATGCTACGCAAAACCATCATCTGATGTA
GTATGTCAAGTAGGAAGTGTATGGAATCCTCAGGGATCCAGATAGATGAACCCATAAAAATTCATGCTACTA
GCGGGAACCTCAAAGTGCCAAAACACCAACACACACCAAGGAGATTCAGACAGATATGGGATTCGAAATGGAAACCG
AAGTTTGTGTCAAGGCTGTCAACGACGTTATATGTCAAGTCCGACAGGTAACCATGAAGTATCCACACAGTCA
GTTGAATACGTCACTACTAGACCCGGCACACAAGGATACTGGCATTGATCCGATTCACGTGTGGGAAAAGAAAACG
GCCAACGATGTGTCGACGCAACAGGAATTTGTTACACATCGAAAGTAACACAGGCTGAACTGATACAAGAACAA

```



CCGGTATATGTGAAAGCAATAGAACTCAGGATGTACCGATTACATCGTACAGAAACACTGTAGATGCCTACCAA  
CAGGCTGACTTAATTAAGCATATGCTACGCAAACCATCATCTGATGTAGTATGTCAAGTAGGAAGTGTATATGGAA  
TCCTCAGGGATCCAGATAGATGAACCCCATAAAACCTTCAATGCTACTAGCGGGAACCTCAAAGTGCCAAAACACCA  
ACACACACCAAGGAGATTCAGACAGATATGGGATTCCGAATGGAACCGAAGTTTGTGTGCGAAGGCTGTCAACGAT  
GTTATATGTGAGGTCGGACAGGTAAACCATGAAGTATCCACACAACAGGGATTCTTCAACTATATCAGTGGGA  
GTAGATCCAAGACCAGAAGTTCCAGTAAGGCACCTGGGTTTCATACCAAGTACCACCAAACATAGAGCAAGAAAAGT  
AGACAAGTACAGGCAGATATCAAACAGACGTTGAAACATATAGATATGCAAACAGAAGCGATAACAAGAGAAAAGT  
TTAATATCAACGAACCTCGTGAAAGAGAAAACAGGTAGAAAATATTTGATGTAACAACCTCAATTCGATATAGTAACT  
AAAGAAAAGACGTTCAAACATTCGTAACATGCAGGTCAAAAGAAAACAAAACAATAGAAAAGTTCACCGGAATCT  
GAAGTAAAAATGAGGAGCCAAACAAACATTCACCTCGAATCAGAAGTAAGAATTATGACGTACAAAACACAGTCAGGG  
ACGATAAATATCTCCCAAGCATTCCAGACATTATTAGATTACAAGCCAACAACAGAAAAACGATCAACTGGAATG  
CAGCACGAAGTGATAAAGGAGTGGTGGAAACTACCTATCATGAACCACAAAACAAGAAAACACCAACACAAACT  
GAAAGAGCGAGAATAAAGATCAACAAAACATTTACGTCAATTGAATTGAAAACATTCGATGTTTACAGCCCAGTTT  
GGAAGTATACTTAAGACACAGGCAGCACAAAACGCCAGGTGAACAGAAGACCGTTGTGCGAAGTGAGAGACATGACT  
ATGCAACACCACAAAAGTCCAGAGCCAATTGTACACAAAAGCTACAAGCAATAGTACAACCACCGACAATTAAC  
ACTGAGACTCAGACGATGGTAGAGAGACCACCACCGATTATCTTGCCACAAAAGTATTCGACGTTCAAACACAA  
TCAGGATCAGTCACGGTAAATTCAGAAAACAAAACACCACAAGAACATAGGCCAGTGGTTGCGACTAAAAGATGCG  
AGTGTGTATCATGAAACAAGACCTGTTCAATCCGTTCCCAAGAAGTTACAGGCTATAGTCGTCGACCACCTAGAG  
AACATGGCTACACAAAACAGATTTCTTAGCACAGCCTGTTGTTATGCCTATGGTGCAAACGACACATCATGAACCA  
CAACACAAAGAAACACCAACACAAACTGAAAGAGCGAGAATAAAGATCAACAAAACATTTACGTCAATTGAATTTG  
AAAACATTCGATGTTTACAGCCCAGTTTGGAAAGTATACTTAAGACACAGGCAGCACAAAACGCCAGGTGAACAGAAG  
ACCGTTGTGCGAAGTGAGAGACATGACTATGCAACACCACAAAAGTCCAGAGCCAATTGTACACAAAAAGCTACAA  
GCAATAGTACAACCACCGACAATTAACACTGAGACTCAGACGATGGTAGAGGGACCACACCCGGTTATCTTGCCA  
CCAAAAGTATTCGACGTCCAAACACAATCAGGAACAGTCACGATAAATTCAGAAAACAAAACACCACAAGAACAT  
AGGCCAATAATCGAAGTGAAGATTTGATTACACAACACGAGAAAACGTCAGAGCCAATTGTACACAAAAACTA  
CAGCAATAATCGAACCACCGACAATTAACACTGAGACTCAGACGATGGTAGAGAGACCACCCGATTTATCTTG  
CCACAAAAGTATTCGACGTCCAAACACAATCAGGATCAGTCACGATAAATTCAGAAAACAAAACACCACAAGAA  
CATAGGCCAATAATCGAAGTGAAGATTTGATTACACAACACGAGAAAACGTCAGAGCCAATTGTACACAAAAAA  
CTACAAGCAATAGTACAACCACCGACAATTAACACTGAGACTCAGACGATGGTAGAGAGACCAACACCCGGTTATC  
TTGCCACAAAAGTATTCGACGTCCAAACACAATCAGGATCAGTCACGATAAATTCAGAAAACAAAACACCACAC  
GAACCGAAAATAATCCAGCTATAAAGGATGCGAGTGTGATTTCATGAACCACATCAGTACACACAGTCAACAAAG  
AAACTTCAAGCTGTGGTATATCATCCATCTGACGATGTTTGTGTTGCAAACCGATGAAGTAACAGTACAACCTGTC  
AAACCCGTTCTCAGGCGTTCTCTCGAGCTCCGCAAGTCGAACATAAGCAAACACAAGCAGAATGGCTAAAGACT  
AAGACAAAACATTTGATATACAAGCACAATCAGGTATAGTAGTCAAGACACAGTCCACACAAAATATTTCTAGAA  
GAACGACCAATGTTCCATACTGCAGACGTCAGTGTGATTACAGTGAAAAATCACCTTTGCTGGTGAATTAAGAAA  
CTTCAAGTAACCATAGGTCATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACTGTA  
CTACAAAACACCGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTTACAGACTATTCCA  
GAGGAACAACCAGTATTCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAAATCACCTTCATTAGTAGGCAAG  
AAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCTACT  
GTACTACAAAACACCATTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTTACAGACTATT  
CCAGAGGAACAACCAGTATTCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAAATCACCTTCATTAGTAGGC  
AAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCCCT  
ACTGTACTACAAAACACCGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTTACAGACT  
ATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCACACTGTCAAGTGTAGGACTGATAGTACTTACTGGGAAATACAGTCCGTATTA  
TACGAGAATGTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAAGTCC  
CCTACTGTACTACAAAACACCGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTTTACAG  
ACTATTCCAGAGGAACAACCAGTATTCACACTGTCAATGTAGGACTTGATCATACTGAGAAAATCACCTTCATTAG  
GTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCTCAA  
GTCCCTACTGTACTACAAAACACCGTTTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCAGTT  
CAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTCACACTGTCAAGTGTAGGACTTGATCATACTGAGAAAATCACCTTCA  
TTAGTAGGCAAGAAGCTTCAGGCGACAATGCGTCAATCAGTTGAGAACACGAGCACACAGACTGATCCGATGGCT  
CAAGTCCCTACTGTACTACAAAACACCATTCGATGTTGTGACTCAATCTGGTACTGTCCACTGTGCACAGTCA  
GTTTACAGACTATTCCAGAGGAACGACCAGTATTTTGCAGTGTGATGTAAGCGTTGATCATGTTGATAATGCCCT  
ATTGTTTCGATCAACAGTGTTCATCGACAATGCATACTCTTCCAAATACATCACAATCAACACAAAACATTCCTACT  
AAACTGGCTGATACATTCTGTCAAACAACGTTATCTTCTATCACATACGATGTCCAAATTCAGTCTGGAGTAATA  
CATTTCAGTAGATGGAACACAAAACGTCGATTTAACTCCACCTATTGCGATGAAAGAAAATGAGTGTGCTACATGAA  
AAGGAACCAACTATTTTGAAGGGGAAGAAAACCTCAGGTTTCGTTGTGATTCCACTGATTTGGGAATCCAAAACAGAT  
CAAATTACTCCAATTGTTTACGCAACAATCTCATCGACAATGCATACTCTTCCAAATACATCACAATCAACACAAA  
ACCATTCCCACTAAACTGGCTGATACATTCTGTCAAACAACGTTATCTTCTATCACATACGATGTCCAAATTCAG  
TCTGGAGTAATACATTTCAGTAGATGGAACACAAAACGTCGATTTAACTCCACCTATTGCGATGAAAGAAAATGAGT  
GTCGTACATGAAAAGGAACCAACTATTTTGAAGGGGAAGAAAACCTCAGGTTTCGTTGTGATTCCACTGATTTGGGA  
GTCCAAAACAGATCACACTATGTCTACTGTTCACTTGGACAGTAATAAATCAACTCAACTGCTTTAGTTTCATTATACG

GATGTATCATGTGCAGTATACTGAACTCACGAAGCCTTCATCAACTAGTCATGTAGTAACGTCCAGAGTTGTTAGC  
ATTCAAACAGATGTGCCTTTTTCAACAAACATACGTGTGGATCAACGAAACAAGAAATTTCAAGTAAATCTAATA  
TCTCCTTCATCACCGAAGACTCCAACAAATGTAGCTTCTATAGGAACACAAACCTCAGATTATAGATATCAGGAT  
ATAAGTATTGAACAGGTTGATAAAAACAACAGTTTTCATCAGTGGATGCATATATGGTTTCATGATTCAGTGTCTAAC  
GTGACAAGCACTTCACAAGCAATACCAAAAAATAAAAAATAGATCAAGAGTGCCAAGTAAAAATAACTCCTCAACAA  
TATCAAAGAAACTTCAGTGTGGTCCCTCATTTTTCTACATTAATAAATACATCTTCTCAAACATATACAGGATAGT  
TGTCTACGTGACCATCAGAGAACTTCTTTGTCGTCAAGTATTGGAGTTCAGGTGAGTAATGTACGACCAGTAGTT  
ACAGTAGATACAGGGACTCAAGAAACAAGACCAAGTGAGACTTCTCCATCACCTTTACAAGTTAAGAACAAAAA  
CTACAGGTCTACCCATCTAAACTTGGTGAACAAGTAGAAGAATAATTTATACATCCTCAAGAGACAATCTGCAAA  
GGAATGTCCACCTCATTAACCTGAGATAACACAGACAGATGAGTGTTTATTAATAAATACTGAATGTTTCAAGTGT  
ATATCACGGGGAGGTGATAAGAAAACGATTGATAAAGACGTGCAATCGGAAGAAAAATCAATAAGAACAAAAACA  
ACAGCGTCCAGTACAGTGAATCAAACACTACTTTACACGTATTCTCCAAATGGAAACTATTCTCTGACAAGCCAAAA  
GCACCAGACACATCCGATGTGCTGAAACTATAACAGAGAGTCCGGTTACAGAGCTAAGGGTGAATCAAGGGATGTT  
CAAACCTGATGCGTTTTTTGTTGGGAAGTATTCAATTACCTGAAAGTAAGGAAGTTGATGGCGTGGGAAAAATTTTCG  
AAAAAAACCACAATTGTTCAATTGGAAAAGTTAACTACGGATAAGTGTGTAGATACTATGCCCTTTGAAAAAGGA  
CTTATAGAATCTCAAACATCCTATCATGATATCCAGACATCTGAAAGGAGAAAATGTAAGGTTACCAAAAAGAAACA  
CCATGGCCAGAAGCACAAGCAACAAATGTTCTACAAGATATTGAGTTTGAATAAGACATCTCAAATGATAGAT  
TCAAGTGGGAGTTACTCACCTCAACAAAATTCAGTTTTCAGTTAGTGCACGACCAACTACTCATATGCTTACTCAT  
GCAGAATCAACAAGCAGAAATGGAAATGGAAAGGTCAAGACACCGTATCAATATTTAAACCAGATGTTGTAAGT  
TGGGGAGTACAATTTGCACCAGTAACACTTACTGGAGTAACGCAACCCTGAATCTTCGAAAGCATAAGTTAGCT  
ATCGATTTCATCAGTAAACATAAGTGTACAACTGATGCAGTTGAAGATGACTATTATATAAAAAAGAGTTGTGACG  
ACAATAGCTAGGAAAGGTCTGTCTATTATTGTCGTGAGGTCCAGTAGCCAAAAAAATTTGTCGAACACACCCGAT  
CTATTGACATCAAGTTTACCTAGTAACCTAGATGAAGAGTTTGTGTAAGAAAACAACATTTGGACCAAGAACAACG  
AAGGTCACAACATGCAAAAACGTGGAGATCGTCGAGTAGTACATGAAGAATTACTTACAGAGGACTATAGGGAA  
AGAGGAAGTTCACCTTGACTCTCGTGTGGCCACGGACAGTTTCCAAGAGAAAACACCCACAGGATATAGATTTG  
CATGAAATGCATGAACATGAGACAGACATATATACTGATGCTGAGATTTGTTTGCAGAATTTACTGAAAGTATGG  
GGAGCAATACTTCTGTTCTAGATTACGACAGTACGGTAGACTACTCAGAGCTTTTCAAGTGTGATCGAAGT  
ATACATACAGCAGAAAAATCACGGCTGGTTGAAGCGAAGACACAGTTTACTTCAACGGGTAACCTTAGTGAGTCAA  
ATCAGAAATCTTGAGAATATAGGAACACAGACTAGTATATTCTCCTTATCACTCGACCTCCACAAAAATAAA  
AGGATACAACGTGGCCGTAGCTTCAATTTCTGGAGGAACAAATCAGCCACCACCGACGCGTAGTGGCTCGGTAGTA  
AGTCCACTGTGCGCCGACAACAGAAGAACTGACAAGTCATCATCGTCAACACGGGATAACAAGTATGCAGACACGT  
ACTTCCCATCCATTTAATTTGGCCACTACCACATTTACAGAGACTACACAAGAGCAATCGACATTCAGTATTGAA  
CATAAGTCCAGACTTATACATGTCCAACATGTGGGAGTCAAGCTAACATTCAGTGACCGTTTCAATTCACAAATA  
CAACCTCAAACACTACCAATAACGCAATTTAAAAGACGCCCAATCACAAACTCGGTTTATGGGGCAGATGACAAC  
GATAATAACTGCACATATCTACCAACTTACCTAAGTGTGAAAGTAATTCGCATAAATCAGAGCCAGAAAAT  
GAAGACAGAGAATTTTCGATGGTGCATGGCATCCAGCAGAAAATACGAGATACAGAACGCCGTAGGGATAGCGAC  
ACAAGTAACCAGATACGAGATGAAGTTTGGGTTGATAGTCTGGGAAATTTGCTGGAACATAAATAACTGGAGTA  
ATAGTACCTGGAACAAGCGAAATCGTTAGCGCAAGTGAAGCATTTTACCGTGGTCTACTAAGAGTAGTATACTGG  
GATTATGAAAACTTGGACCTAGACAATCATCAGTAGATTCAACAGTTTCCATACCCTCGCAGATGCAGTGATT  
TCTAAGGCAGTTCGGTTAGCTAGTATAGAAATATCGACAGAAACGCAGCCATCATTTGGATGCCAAAAATAGTTTGG  
AGGACACCAGAGATACAACGAAGTAGGTATCTAGTACATTTCAATTAGACCTGATGCAGGTCAAAAACAAGCATAAC  
CCAATTAATCTGGACGTTGCATCTGCAATACGAGCTGGTCTAATTGACAAAAGAAACCGGTCAAATGTTGTTTACA  
CATTCTGTTTACGAGTCACCATTTAGTACTGATTCACCGATAAGTAAAAAAGGTGATAGTAGCTCTGACCAAAC  
GAACGATTGTGAGTACAGAGAAGCAATTTGACGTGGATTTTTAGTTGCGGAATTAATAGAACCAGAAATCATCGTAT  
ATAACAAAGCAAAGTTTACCATTTATTGTTCCAAGTACAAGTTATTACACTCTCCAACCTGATGTTGACATTTGA

## 6.2 SmNPYR1-Sequenz

Bei der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen CDS von SmNPYR1 handelt es sich um ein 1.005 bp langes Fusionsprodukt der beiden Datenbanksequenzen Smp\_132220 (grau unterlegt) und Smp\_080820. Die entsprechenden Start- und Stopp-Codons sind rot hervorgehoben. Eine SMART-Analyse der Aminosäuresequenz offenbarte allerdings das Fehlen einer siebten TMH. Eine *in silico*-Analyse des 5'-UTR-Bereiches zeigte, dass der ORF

in 5'-Richtung um 309 bp (graue Buchstaben) bis zu einem alternativen Start-Codon (Fettdruck, unterstrichen) erweitert werden kann.

ATGAATGAATCAATAATACAAAATAATCAATCAATATATTCAATTTATAATCAAAAATAATAATAATAACAATA  
 AATGATATACAATTAATTTTACAATGGAGTTTAACTAATCTTTCAACCAAAAAATACATCACAAACAAATTTATTAT  
 TTTTTTAATAAATTATGTGAATACATTATTAATAAAATCCTTATAAAAAGAGTATTATTATCATTGTATATAATAATA  
 TTAATATTTGGTACATTTATTAATTTATTATTAATATATACAATTAATAAAATACGTAATCCAAAATCATTAGCT  
 AATAGAAGA**ATG**TTATTAATACGTGTATTATGTGATTTAGCATTAGCATGGTTTGGTGTACCATATACAGCCTAT  
 ACAGCTGTATATAAAAATTGGTTATTAGGCAATATAATGTGTAATAATTTTACAGCATTCTTATTTATTTATTGTT  
 GCATTAATAAATTTTCTACTTGGTGTATATGTTTAAATCGTAGTGTAGGTATTAGTCAAAAATGGCAAACATTTA  
 ACTGATCCAACAGTTAGTGTACCATGTGCGAGTAAAATGTTTATTAGTTGCAGCTGGATTATTAGCATTGATTATT  
 GCATTTTCTGGTGGAAATTTAGTGAACAAGTACAGATTAAATTAACCTGAAAACAATGAAAATATATTTTGGATTTA  
 AATACAGATATATCTGAAATGATACCTATGATATGCATGGATTCTGGTCTCGTGAAGCTCAACTTGCATGATGAT  
 GTTATTTTAATAGTAGCAATTTATGTTTTTACCAGTATAGTTGTGTGTTTAAAGTCAACATGTTGTCACAGTGCAC  
 TTGAAACAGTACAAAGACTATTAATGCTTTCTGGATATCGTAATACAACAGCATGGACAAGAAGACGACAGCGT  
 CTGACAAGACTATGCGTGTAAATGGCAGCACTGTTTGTGTTTATCTTGGTCAACCAACCATGTATGTAATCTGTTG  
 ACAAAAACATTTTATATTAATTAATCCAGTAACTGAAATTTTACTTGGATTATTCAATGTGTTTAGCTATGTCAAAT  
 GCTGTCACAGGTCCATTATTATTAATTTGCTACATGCTCAAACATATCATCGTTATATATTTTCGCTTCTTCTATCGA  
 TCATCAATGACAAGCCATTCAACCGCAAGTTATTCAATGCCCGTCAATTCTATACATTTCGTCAACTGGAATAGGT  
 TCACCAATCGAAACATTTCCAACATTTTATAATCGTGTGCGCAAAACAAAACAAAATTTTCGTTGAGAATTCACGT  
 ACATTAGAAATGGTGGGAAATGAATGTGATTCTAAT**TAA**

### 6.3 SmFrz1-Sequenz

Bei der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen CDS von SmFrz1 handelt es sich um ein 2.091 bp langes Fusionsprodukt der beiden Datenbanksequenzen Smp\_1173940 (grau unterlegt) und Smp\_118970. Die entsprechenden Start- und Stopp-Codons sind rot hervorgehoben.

**ATG**TGTTTGAGGGCTCTCTTCATCGTGTACATATTTTCTCTCACTCTAACTGCTACATACAGCGGGGTTGGAA  
 GATCCATATGCTGAAACACCTAAATGTGAACCTATACGTATAAAGGCTTGTGAGGATCTACCATATAACATCACT  
 ATATTTCCAAATGATATGGGACATGCTACTCAAGACGATGCCGCCAGGAAATAGGTCAATATACACCATTAGTT  
 CGAACTACTTGCAGTCTCTCCTTAAAGTTGTTTTATGCTCCTTATTTTTCCCTGTCTGCATGGAATGAAAAA  
 CCATTACCTCTTGTCTATCTTTGTGTGAACAAAACCGTAAAGGACTGTGAACCACTTATGCGGGGTTTTCATTTT  
 GAGTGGCCAAAAATGAATTAATGATCGTTTTCCAGAAAGATTCGTTGTGTATAGCTGAAAAATAAGACGAAAA  
 CGGCCTTCTAAGGAACCTTCGTTTCGTTGTCCTGTTTATATGAAAGTTCTCCGAGTTTTCGAATTCGCGTAAGA  
 ATGGGCAGGAATCAATAATTCAGGACTGTGGAATTCCTTGCAGGATTTCTCTTCGGAGATTCTTCTTCCAGG  
 AAGTTTTCTCGCTTATGGATCGGTCTCTGGAGTTTCTTGTGTGCAGCATCGACGTCATTTACAGTTCTCACCTTC  
 CTCATTGATATGCCTCGTTTTTTCAGTACCCCGAGAGACCGATAATATTCTTGTGAGCTTGTACCTAATGGTGGCT  
 CTCACATACGTTGCAGGCTTTATTTTAAATGACAGTGTGCTTGTCTGGGCCTTTTCCAGCACCACAATCTCTT  
 AGTGGTCAAATGAAATGCCGCGACTCGTTACTCAGGGCACAAAATTTGAAGGATGCATCGTTTTATTCATGTTG  
 CTTTACTTCTTTTCTATGGCTAGTTCTATTTGGTGGGTGGTTTTGACAATCACTGGTATTTAGCTGCTAAATGT  
 CATTGGGCACATGAAGCTATATCACGTAATGCACAGTATTTACACTTTGCTGCATGGGCTATTCCAGCTGCTAAA  
 ACAATTTGGGATATTAGCTTTGGGAAAGGTTGACGGCGATCCACTATCTGGTGTATGCTTCACCGGATTAACAGAT  
 CCAGTTATACTGAGAGCATTTTTAATTGCCCCATTATGTTTGTATCTTCTGATTGGAACGTGTTTCTGTTTGTCT  
 GGTTTTGTATCATTATTTAAATCCGTACAATCATCAAAAACCGGAGGTTCAAAAACAGATGACCTAGAGAAAATTA  
 ATTATGCGAATGGTGTATTTAGTTTACTGTACATTGTTCCAGCATTAGTAGTTATCGCCTGTTATTTACATGAA  
 TCTAGAATGTCTGAAAAATGGATGCTTACATGGTATAACAATGAAGTATGTGCTAAAGTAGATCCTAATCAACTA  
 GCCGATTCTATATGTCCTGGACATTTCAAACGACTGGTTGAAGCCGGTAGTTCAACATCCCGATCAGATAATTC  
 GATATTTCTGTTAGTCAAAACATATTTGCAAAAATACCTGCATTAGAAAAACCGAATTTGAATTTATTTATGATT  
 AAATATCTTATGACATTTGGTTGTGCGTATAACAAGTGGTGTCTGGATATGGAGTGGTAAAAACGCTTGTATCATGG  
 AAGCGTTTTCTTCGCACGAGTTTTTTCGTCGTCGTAAGTTTGTGTGATAACAATAAATAATCGATCTAATGTTTCAAGT  
 ACGCGTTCCGGTCTTGTGTCGCTAGACGAGGCGTTTCAGTCAATGCTCTACCACCTGGTGTAGCTCAAATCCT  
 GGTTCTGTTCCGCTGTTAACACGTACAATACAATCATCTCACCCAGTACAACCGTATATTTTTCAGTCAAGATACA

## 6. Anhang

---

ACAACAAC TACTAGTGGATGGGCATCGAGAGGTGCACCGTCTGGAGTAACTGCACCACCAGATATTTTCGTCAACT  
CCCGTGAGTTATGCTGCCCAACCTAACTGGTTAGCTGCTAGTCCAAATTCAGTTCAGATTAATGCTGGCCTACAA  
ACTGGTATGATAAATACAAATGCACAAAGTGTCGTACCCGCTAATTCTGGTCTAGGCTTACTG**TAG**

## 7. Literatur

- Abdel-Latif, M., Meyering-Vos, M., Hoffmann, K.H. (2004)** Type-A allatostatins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: Molecular cloning, expression and tissue-specific localization. *Arch Insect Biochem Physiol.* 56(3): 120-132. doi: 10.1002/arch.20003.
- Adell, T., Cebria, F., Salo, E. (2010)** Gradients in planarian regeneration and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(1): a000505. doi: 10.1101/cshperspect.a000505.
- Adler, P.N. (2002)** Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2(5): 525-535. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00176-4.
- Ahier, A., Khayath, N., Vicogne, J. et al. (2008)** Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite.* 15(4): 573-579. doi: 10.1051/parasite/2008154573.
- Ahier, A., Rondard, P., Gougnard, N. et al. (2009)** A new family of receptor tyrosine kinases with a Venus Flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids. *PLoS One.* 4(5): e5651. doi: 10.1371/journal.pone.0005651.
- Ahmed, I.S., Rohe, H.J., Twist, K.E. et al. (2010a)** Pgrmc1 (progesterone receptor membrane component 1) associates with epidermal growth factor receptor and regulates erlotinib sensitivity. *J Biol Chem.* 285(32): 24775-24782. doi: 10.1074/jbc.M110.134585.
- Ahmed, I.S., Rohe, H.J., Twist, K.E. et al. (2010b)** Progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1): A heme-1 domain protein that promotes tumorigenesis and is inhibited by a small molecule. *J Pharmacol Exp Ther.* 333(2): 564-573. doi: 10.1124/jpet.109.164210.
- Almuedo-Castillo, M., Sureda-Gomez, M., Adell, T. (2012)** Wnt signaling in planarians: New answers to old questions. *Int J Dev Biol.* 56(1-3): 53-65. doi: 10.1387/ijdb.113451ma.
- Armstrong, J.C. (1965)** Mating behavior and development of schistosomes in the mouse. *J Parasitol.* 51: 605-616. doi: n.v.
- Andrade, L.F., Nahum, L.A., Avelar, L.G. et al. (2011)** Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics.* 12: 215. doi: 10.1186/1471-2164-12-215.
- Atkinson, L.E., McVeigh, P., Kimber, M.J. et al. (2010)** A PAL for *Schistosoma mansoni* PHM. *Mol Biochem Parasitol.* 173(2): 97-106. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.05.009.
- Austin, J., Kimble, J. (1987)** Glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell.* 51(4): 589-599. doi:10.1016/0092-8674(87)90128-0.

- Avelar, L.G., Nahum, L.A., Andrade, L.F. et al. (2011)** Functional diversity of the *Schistosoma mansoni* tyrosine kinases. J Signal Transduct. 2011: 603290. doi: 10.1155/2011/603290.
- Basch, P.F. (1981)** Cultivation of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. J Parasitol. 67(2): 179-185. doi: n.v.
- Bateman, J., Reddy, R.S., Saito, H. et al. (2001)** The receptor tyrosine phosphatase Dlar and integrins organize actin filaments in the *Drosophila* follicular epithelium. Curr Biol. 11(17):1317-1327. doi 10.1016/S0960-9822(01)00420-1.
- Beckmann, S., Wipperstegg, V., El-Bahay, A. et al. (2007)** *Schistosoma mansoni*: germ-line transformation approaches and actin-promoter analysis. Exp Parasitol. 117(3): 292-303. doi: 10.1016/j.exppara.2007.04.007.
- Beckmann, S. (2008)** *Schistosoma mansoni*: Tyrosinkinase-Signalwege in den Reproduktionsorganen und Aktin-Promotoranalysen im Transgenmodell. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Beckmann, S., Buro, C., Dissous, C. et al. (2010a)** The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. PLoS Pathog. 6(2): e1000769. doi: 10.1371/journal.ppat.1000769.
- Beckmann, S., Quack, T., Burmeister, C. et al. (2010b)** *Schistosoma mansoni*: Signal transduction processes during the development of the reproductive organs. Parasitology. 137(3): 497-520. doi: 10.1017/S0031182010000053.
- Beckmann, S., Grevelding, C.G. (2010)** Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Int J Parasitol. 40(5): 521-526. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.007.
- Beckmann, S., Hahnel, S., Cailliau, K. et al. (2011)** Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem. 286(49): 42325-42336. doi: 10.1074/jbc.M110.210336.
- Beckmann, S., Grevelding, C.G. (2012)** Paving the way to transgenic schistosomes. Parasitology. 139(5): 651-668. doi: 10.1017/S0031182011001466.
- Beckmann, S., Leutner, S., Gougnard, N. et al. (2012a)** Protein kinases as potential targets for novel anti-schistosomal strategies. Curr Pharm Des. 18(24): 3579-3594. doi: 10.2174/138161212801327310.
- Beckmann, S., Quack, T., Dissous, C. et al. (2012b)** Discovery of platyhelminth-specific  $\alpha/\beta$ -integrin families and evidence for their role in reproduction in *Schistosoma mansoni*. PLoS One. 7(12):e52519. doi: 10.1371/journal.pone.0052519.
- Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R. et al. (2010)** Physiologie - Duale Reihe. Thieme Verlag. Stuttgart.

- Bendena, W.G., Donly, B.C., Tobe, S.S. (1999)** Allatostatins: A growing family of neuropeptides with structural and functional diversity. *Ann. NY Acad. Sci.* 897:311-329. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07902.x
- Bentley, G.N., Jones, A.K., Parra, W.G.O. et al. (2004)** ShAR1 alpha and ShAR1 beta: Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunits from the platyhelminth blood fluke *Schistosoma*. *Gene*. 329: 27-38. doi: 10.1016/j.gene.2003.12.009.
- Bernard, P., Harley, V.R. (2007)** Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1): 31-43. doi: 10.1016/j.biocel.2006.06.007.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T. et al. (2009)** The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460(7253): 352-358. doi: 10.1038/nature08160.
- Betley, J.N., Frith, M.C., Graber, J.H. (2002)** A ubiquitous and conserved signal for RNA localization in chordates. *Curr Biol.* 12(20): 1756-1761. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01220-4.
- Bhanot, P., Fish, M., Jemison, J.A. et al. (1999)** Frizzled and DFizzled-2 function as redundant receptors for Wingless during *Drosophila* embryonic development. *Development*. 126(18): 4175-4186. doi: n.v.
- Bhardwaj, R., Krautz-Peterson, G., Da'dara, A. et al. (2011)** Tegumental phosphodiesterase SmNPP-5 is a virulence factor for schistosomes. *Infect Immun.* 79(10): 4276-4284. doi: 10.1128/IAI.05431-11.
- Bhat, K.M. (1998)** Frizzled and Frizzled 2 play a partially redundant role in wingless signaling and have similar requirements to wingless in neurogenesis. *Cell*. 95(7): 1027-1036. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81726-2.
- Biason-Lauber, A., Konrad, D. (2008)** Wnt4 and sex development. *Sex Dev.* 2(4-5): 210-218. doi: 10.1159/000152037.
- Birnbaum, D., Popovici, C., Roubin, R. (2005)** A pair as a minimum: The two fibroblast growth factors of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn.* 232(2): 247-255. doi: 10.1002/dvdy.20219.
- Blak, A.A., Naserke, T., Saarimäki-Vire, J. et al. (2007)** Fgfr2 and Fgfr3 are not required for patterning and maintenance of the midbrain and anterior hindbrain. *Dev Biol.* 303(1): 231-243. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.008.
- Bos, D.H., Mayfield, C., Minchella, D.J. (2009)** Analysis of regulatory protease sequences identified through bioinformatic data mining of the *Schistosoma mansoni* genome. *BMC Genomics* 10: 488. doi: 10.1186/1471-2164-10-488.
- Bose, R., Zhang, X. (2009)** The ErbB kinase domain: Structural perspectives into kinase activation and inhibition. *Exp Cell Res.* 315(4): 649-658. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.031.

- Bothelo, M.C., Crespo, M., Almeida, A. et al. (2009)** *Schistosoma haematobium* and *Schistosomiasis mansoni*: Production of an estradiol-related compound detected by ELISA. doi: 10.1016/j.exppara.2009.04.001.
- Boyer, A., Hermo, L., Paquet, M. et al. (2008)** Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in sertoli cells. Biol Reprod. 79(3):475-485 doi: 10.1095/biolreprod.108.068627.
- Boyle, J.P., Zaide, J.V., Yoshino, T. (2000)** *Schistosoma mansoni*: Effects of serotonin and serotonin receptor antagonists on motility and length of primary sporocysts *in vitro*. Exp. Parasitol. 94(4): 217-226. doi: 10.1006/expr.2000.4500.
- Brady-Kalnay, S.M., Flint, A.J., Tonks, N.K. (1993)** Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. J Cell Biol. 122(4): 961-972. doi: n.v.
- Braschi, S., Curwen, R.S., Ashton, P.D. et al. (2006)** The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. Proteomics. 6(5): 1471-1482. doi: 10.1002/pmic.200500368.
- Brehm, K. (2010)** The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. Med Microbiol Immunol. 199(3): 247-259 doi: 10.1007/s00430-010-0154-1.
- Brooks, A.N., Kilgour, E., Smith, P.D. (2012)** Molecular pathways: Fibroblast growth factor signaling: A new therapeutic opportunity in cancer. Clin Cancer Res. 18(7): 1855-1862. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0699.
- Browaeys-Poly, E., Cailliau, K., Vilain, J.P. (2000)** Signal transduction pathways triggered by fibroblast growth factor receptor 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes after fibroblast growth factor 1 addition. Role of Grb2, phosphatidylinositol 3-kinase, Src tyrosine kinase, and phospholipase Cgamma. Eur J Biochem. 267(20): 6256-6263. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01710.x.
- Bruno, A., Costantino, G., de Fabritiis, G. et al. (2012)** Membrane-sensitive conformational states of helix 8 in the metabotropic Glu2 receptor, a class C GPCR. PLoS One. (8): e42023. doi: 10.1371/journal.pone.0042023.
- Buro, C. (2013)** Molekulargenetische Effekte nach Inhibitorbehandlungen sowie Charakterisierung gonadenspezifisch exprimierter Gene von *Schistosoma mansoni*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Buro, C., Oliveria, K.C., Lu, Z. et al. (2013)** Transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosome females provide evidence for cooperating Src-kinase and TGF $\beta$  receptor pathways controlling mitosis and eggshell formation. PLoS Pathogen. 9(6): e1003448. doi: 10.1371/journal.ppat.1003448.



- Cahill, M.A.** Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 105(1-5): 16-36. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.02.002.
- Calamita, G., Mazzone, A., Choe, Y.S. et al. (2001)** Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in the rat testis. *Biol Reprod.* 64(6): 1660-1666. doi: 10.1095/biolreprod64.6.1660.
- Camacho, M., Agnew, A. (1995)** *Schistosoma*: Rate of glucose transport is altered by acetylcholine interaction with tegumental acetylcholine receptors and acetylcholinesterase. *Exp. Parasitol.* 81(4): 584-591. doi: 10.1006/expr.1995.1152.
- Caminos, J.E., Nogueira, R., Gaytan, F. et al. (2008)** Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 149(7): 3390-3402. doi: 10.1210/en.2007-1582.
- Cancilla, B., Davies, A., Ford-Perriss, M. et al. (2000)** Discrete cell- and stage-specific localisation of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development. *J Endocrinol.* 164(2): 149-195. doi: 10.1677/joe.0.1640149.
- Cardoso, F.C., Pinho, J.M., Azevedo, V. et al. (2006)** Identification of a new *Schistosoma mansoni* membran-bound protein through bioinformatic analysis. *Genet Mol Res.* 5(4): 609-618. doi: n.v.
- Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y. et al. (2000)** The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(17): 9585-9590. doi: 10.1073/pnas.160274797.
- Castro-Borges, W., Simpson, D.M., Dowle, A. et al. (2011)** Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. *J Proteomics.* 74(9) 1519-1533. doi: 10.1016/j.jprot.2011.06.011.
- Cebria, F. (2008)** Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: An immunocytochemical study. *Neurosci Res.* 61(4):375-384. doi: 10.1016/j.neures.2008.04.005.
- Chabrolle C., Tosca, L., Crochet, S. et al. (2007)** Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in the chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol.* 33(4): 480-487. doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.08.002.
- Cheever, A.W., Macedonia, J.G., Mosimann, J.E. et al. (1994)** Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. *Am J Trop Med and Hyg.* 50(3): 281-295. doi: n.v.
- Chen, L.L., Rekosh, D.M., LoVerde, P.T. (1992)** *Schistosoma mansoni* p48 eggshell protein gene: Characterization, developmentally regulated expression and comparison to the p14 eggshell protein gene. *Mol BiochemParasitol.* 52(1): 39-52. doi: 10.1016/0166-6851(92)90034-H.

- Chen, C.M., Struhl, G. (1999)** Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of *Drosophila*. *Development*. 126(23): 5441-5452. doi: n.v.
- Cheng, A., Xiong, W., Ferrell, J.R. et al. (2005)** Identification and comparative analysis of multiple mammalian Speedy/Ringo proteins. *Cell Cycle*. 4(1): 155-165. doi.org/10.4161/cc.4.1.1347.
- Clarke, H.J. (2012)** Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. *Results Probl Cell Differ*. 55: 1-21. doi: 10.1007/978-3-642-30406-4\_1.
- Clough, E.R. (1981)** Morphology and reproductive organs and oogenesis in bisexual and unisexual transplants of mature *Schistosoma mansoni* females. *J Parasitol*. 67(4): 535-539. doi: n.v.
- Coccia, E., De Lisa, E., Di Cristo, C. et al. (2010)** Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus*. *Biol Bull*. 218(1): 36-47. doi: n.v.
- Cogswell, A.A., Collins, J.J., Newmark, P.A. et al. (2011)** Whole mount *in situ* hybridization methodology for *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 178(1-2): 46-50. 10.1016/j.molbiopara.2011.03.001.
- Cogswell, A.A., Kommer, V.P., Williams, D.L. (2012)** Transcriptional analysis of a unique set of genes involved in *Schistosoma mansoni* female reproductive biology. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(11): e1907. doi: 10.1371/journal.pntd.0001907.
- Collins, J.J., Hou, X., Romanova, E.V. et al. (2010)** Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biol*. 8(10): e1000509. doi: 10.1371/journal.pbio.1000509.
- Collins, J.J., Wang, B., Lambrus, B.G. et al. (2013)** Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 494(7438): 476-479. doi: 10.1038/nature11924.
- Cullen, P.J. (2011)** Post-translational regulation of signaling mucins. *Curr Opin Struct Biol*. 21(5): 590-596. doi: 10.1016/j.sbi.2011.08.007.
- Custodia, N., Won, S.J., Novillo, A. et al. (2001)** *Caenorhabditis elegans* as an environmental monitor using DNA microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 948: 32-42. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03984.x.
- Custodia-Lora, N., Callard, I.P. (2002)** Progesterone and progesterone receptors in reptiles. *Gen Comp Endocrinol*. 127(1): 1-7. doi: 10.1016/S0016-6480(02)00030-8.
- Dalton, S. (2013)** Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 25(2): 241-6. doi: 10.1016/j.ceb.2012.09.005.
- Dalzell J.J., McVeigh, P., Warnock, N.D. et al. (2011)** RNAi effector diversity in nematodes. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(6): e1176. doi: 10.1371/journal.pntd.0001176.

- Dann, C.E., Hsieh, J.C., Rattner, A. et al. (2001)** Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*. 412(6842): 86-90. doi: 10.1038/35083601.
- Davies, S.J., Pearce, E.J. (1995)** Surface-associated serine-threonine kinase in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 70(1-2): 33-44. doi: 10.1016/0166-6851(95)00002-I.
- Davies, S.J., Grogan, J.L., Blank, R.B. et al. (2001)** Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. *Science*. 294(5545): 1358-1361. doi:10.1126/science.1064462.
- Day, T.A., Maule, A.G. (1999)** Parasitic peptides! The structure and function of neuropeptides in parasitic worms. *Peptides*. 20(8): 999-1019. doi: 10.1016/S0196-9781(99)00093-5.
- De, A. (2011)** Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: A brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 43(10):745-56. doi: 10.1093/abbs/gmr079.
- De Bont, J., Vercruyse J., (1998)** Schistosomiasis in cattle. *Adv Parasitol*. 41: 285-364. doi: n.v.
- De Felici, M., Farini, D., Dolci, S. (2009)** In or out stemness: Comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 4(2): 87-97. doi: 10.2174/157488809788167391.
- De Moerlooze, L., Spencer-Dene, B., Revest, J.M. et al. (2000)** An important role of the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signaling during mouse organogenesis. *Development*. 127(3): 483-492. doi: n.v.
- De Mendonca, R.L., Escriva, H., Bouton, D. et al. (2000)** Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol Today*. 16(6): 233-240. doi: 10.1016/S0169-4758(00)01641-0.
- De Nadal, E., Real, F.X., Posas, F. (2007)** Mucins, osmosensors in eukaryotic cells? *Trends Cell Biol*. 17(12): 571-574. doi: 10.1016/j.tcb.2007.10.001.
- Degrave, W.M., Melville, S., Ivens, A. et al. (2001)** Parasite genome initiatives. *Int J Parasitol*. 31(5-6): 532-536. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00144-8.
- Delon, I., Brown, N.H. (2007)** Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 19(1): 43-50. doi: 10.1016/j.ceb.2006.12.013.
- Den Hollander, J.E., Erasmus, D.A. (1985)** *Schistosoma mansoni*: male stimulation and DNA synthesis by the female. *Parasitology*. 91 (3): 449-457. 10.1017/S0031182000062697.

- Dettmann, C.D., Higgins-Opitz, S.B., Saikoolal, A. (1989)** Enhanced efficacy of the paddling method for schistosome infection of rodents by a four-step pre-soaking procedure. *Parasitol Res.* 76(2): 183-184. doi: 10.1007/BF00930846.
- Dewalick, S., Bexkens, M.L., van Balkom, B.W. et al. (2011)** The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. *Int J Parasitol.* 41(5): 523-532. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.12.005.
- Dillon, G.P., Feltwell, T., Skelton, J.P. et al. (2006)** Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 36(1): 1-8. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.10.008.
- Dissous, C., Ahier, A., Khayath, N. (2007)** Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays* 29(12): 1281-1288. doi: 10.1002/bies.20662.
- Dissous, C., Grevelding, C.G. (2011)** Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: A tangible perspective? *Trends Parasitol.* 27(2):59-66. doi: 10.1016/j.pt.2010.09.001.
- Doenhoff, M.J., Pica-Mattoccia, L. (2006)** Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: Its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 4(2): 199-210. doi: 10.1586/14787210.4.2.199.
- Dollar, G.L., Weber, U., Miodzik, M. et al. (2005)** Regulation of Lethal Giant Larvae by Dishevelled. *Nature.* 437(7063): 1376-1380. doi: 10.1038/nature04116.
- Dong, H.F., Chen, X.B., Ming, Z.P. et al. (2002)** Ultrastructure of cultured cells from *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop.* 82(2): 225-234. doi: 10.1016/S0001-706X(02)00014-1.
- Dorner, A.J., Wasley, L.C., Raney, P. et al. (1990)** The stress response in chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J Biol Chem.* 265(35): 22029-22034. doi: n.v.
- Dorak, M.T. (2008)** Real-time PCR; BIOS Advanced Methods. Taylor & Francis Group, New York.
- Dowal, L., Sim, D.S., Dilks, J.R. et al. (2011)** Identification of an antithrombotic allosteric modulator that acts through helix 8 of PAR1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(7): 2951-2956. doi: 10.1073/pnas.1014863108.
- Duvall, R.H., DeWitt, W.B. (1967)** An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16(4): 483-486. doi: n.v.
- Dvorak, P., Dvorakova, D., Hampl, A. (2006)** Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett.* 580(12): 2869-2874. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.095.

- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H. et al. (2005)** Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart.
- Eiselleova, L., Matulka, K., Kriz, V. et al. (2009)** A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. 27(8): 1847-1857. doi: 10.1002/stem.128.
- Eisenmann, D.M. (2005)** Wnt signaling. WormBook: 1-17. doi: 10.1895/wormbook.1.7.1.
- El-Bahay, A. (2003)** Identifizierung und Charakterisierung von Promotoren aus *Schistosoma mansoni* und Experimente zur Etablierung einer Zellkultur. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- El-Shehabi, F., Vermeire, J.J., Yoshino, T.P. et al. (2009)** Developmental expression analysis and immunolocalization of a biogenic amine receptor in *Schistosoma mansoni*. Exp Parasitol. 122(1): 17-27. doi: 10.1016/j.exppara.2009.01.001.
- El-Shehabi, F., Ribeiro, P. (2010)** Histamine signalling in *Schistosoma mansoni*: Immunolocalisation and characterisation of a new histamine-responsive receptor (SmGPR-2). Int J Parasitol. 40(12):1395-1406. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.04.006.
- El-Shehabi, F., Taman, A., Moali, L.S. et al. (2012)** A novel G protein-coupled receptor of *Schistosoma mansoni* (SmGPR-3) is activated by dopamine and is widely expressed in the nervous system. PLoS Neg Trop Dis. 6(2):e1523. doi: 10.1371/journal.pntd.0001523.
- Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A. et al. (2002)** The global epidemiological situation of Schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Tropica 82(2): 139-146. doi: 10.1016/S0001-706X(02)00045-1.
- Erasmus, D.A. (1973)** A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. Parasitology 67(2): 165-183. doi: 10.1017/S0031182000046394.
- Erasmus, D.A. (1975)** *Schistosoma mansoni*: Development of the vitelline cell, its role in drug sequestration, and changes induced by Astiban. Exp Parasitol. 38(2): 240-256. doi: 10.1016/0014-4894(75)90027-2.
- Erasmus, D.A., Popiel, I. (1980)** *Schistosoma mansoni*: Drug induced changes in the cell population of the vitelline gland. Exp Parasitol. 50(2): 171-187. doi: 10.1016/0014-4894(80)90018-1.
- Escobedo, G., Larralde, C., Chavarria, A. et al. (2004)** Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. J Parasitol. 90(6): 1235-1244. doi: 10.1645/GE-297R.

- Escobedo, G., Roberts, C.W., Carrero, J.C., et al. (2005)** Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol.* 21(12): 588-593. doi: 10.1016/j.pt.2005.09.013.
- Escobedo, G., Camacho-Arroyo, I., Hernandez, O.T. et al. (2010)** Progesterone induces scolex evagination of the human parasite *Taenia solium*: Evolutionary implications to the host-parasite relationship. *J Biochem Biotechnol.* 2010:591079. doi: 10.1155/2010/591079.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I., Schlessinger, J. (2005)** Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2): 139-149. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.001.
- Faghiri, Z., Skelly, P.J. (2009)** The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J.* 23(8): 2780-2789. doi: 10.1096/fj.09-130757.
- Faghiri, Z., Camargo, S.M., Huggel, K. et al. (2010)** The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: The surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. *PLoS One.* 5(5): e10451. doi: 10.1371/journal.pone.0010451.
- Fantappie, M.R., Freebern, W.J., Osman, A. et al. (2001)** Evaluation of *Schistosoma mansoni* retinoid X receptor (SmRXR1 and SmRXR2) activity and tissue distribution. *Mol Biochem Parasitol.* 115(1): 87-89. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00274-2.
- Fanto, M., McNeill, H. (2004)** Planar polarity from flies to vertebrates. *J Cell Sci.* 117(4): 527-33. doi: 10.1242/jcs.00973.
- Fatima, R. (2011)** *Drosophila* Dynein intermediate chain gene, Dic61B, is required for spermatogenesis. *PLoS One.* 6(12): e27822. doi: 10.1371/journal.pone.0027822.
- Fauser, B.C., Laven, J.S., Tarlatzis, B.C. et al. (2011)** Sex steroid hormones and reproductive disorders: Impact on women's health. *Reprod Sci.* 18(8): 702-712. doi: 10.1177/1933719111405068.
- Fenwick, A., Savioli, L., Engels, D. et al. (2003)** Drugs for the control of parasitic diseases: Current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 19(11): 509-515. doi:10.1016/j.pt.2003.09.005.
- Finken, M., Sobek, A., Symmons, P. et al. (1994)** Characterisation of the complete protein disulfide isomerase gene of *Schistosoma mansoni* and identification of the tissues of its expression. *Mol Biochem Parasitol.* 64(1): 135-144. doi: 10.1016/0166-6851(94)90141-4.

- Fitzpatrick, J.M., Johnston, D.A., Williams, G.W. et al. (2005)** An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *MolBiochem Parasitol.* 141(1): 1-13. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.01.007.
- Fitzpatrick, J.M., Hoffmann, K.F. (2006)** Dioecious *Schistosoma mansoni* express divergent gene repertoires regulated by pairing. *Int J Parasitol.* 36(10-11): 1081-1089. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.007.
- Fitzpatrick, J.M., Hirai, Y., Hirai, H. et al. (2007)** Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. *FASEB J.* 21 (3): 823-835. doi: 10.1096/fj.06-7314com.
- Fitzpatrick, J.M., Peak, E., Perally, S., et al. (2009)** Anti-schistosomal intervention targets identified by lifecycle transcriptomic analyses. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(11):e543. doi: 10.1371/journal.pntd.0000543.
- Forrester, S.G., Warfel, P.W., Pearce, E.J. (2004)** Tegumental expression of a novel type II receptor serine/threonine kinase in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 136(2): 149-156. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.03.007.
- Fotiadis, D., Kanai, Y., Palacin, M., (2013)** The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.* 34(2-3): 139-158. doi: 10.1016/j.mam.2012.10.007.
- Frederiksson, R., Schiöth, H.B. (2005)** The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol.* 67(5): 1414-1425. doi: 10.1124/mol.104.009001.
- Freebern, W.J., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (1999)** RXR-2, a member of the retinoid x receptor family in *Schistosoma mansoni*. *Gene.* 233(1-2): 33-38. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00161-4.
- Freitas, T.C., Jung, E., Pearce, E.J. (2007)** TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogen.* 3(4):e52. doi: 10.1371/journal.ppat.0030052.
- Fujii-Taira, I., Yamauchi, S., Iijima, R. et al. (2009)** Suppression of the ecdysteroid-triggered growth arrest by a novel *Drosophila* membrane steroid binding protein. *FEBS Lett.* 583(4): 655-660. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.056.
- Fukushima, M., Funabiki, I., Hashizume, T. et al. (2008)** Detection and changes in levels of testosterone during spermatogenesis in the freshwater planarian *Bdellocephala brunnea*. *Zoolog Sci.* 25(7): 760-765. doi: 10.2108/zsj.25.760.
- Galanti, S.E., Huang, S.C., Pearce, E.J. (2012)** Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(2): e1509. doi: 10.1371/journal.pntd.0001509.

- Gao, C., Chen, Y.G. (2010)** Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal.* 22(5): 717-727. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.11.021.
- Gallup, J.M. (2011)** qPCR inhibition and Amplification of difficult templates. In: **Kennedy, S., Oswald, N.** PCR troubleshooting and optimization - the essential guide. Caister Academic Press.Norfolk, UK.
- Geadkaew, A., von Bülow, J., Beitz, E. et al. (2011)** Functional analysis of novel aquaporins from *Fasciola gigantica*. *Mol Biochem Parasitol.* 175(2): 144-153. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.10.010.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J.B., Doe, C.Q. et al. (1996)** Heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 10(23): 3003-3017. doi: 10.1101/gad.10.23.3003.
- Ghosh, K., Thompson, A.M., Goldbeck, R.A. et al. (2005)** Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p. *Biochemistry.* 44(50): 16729-16736. doi: 10.1021/bi0511585.
- Golestaneh, N., Beauchamp, E., Fallen, S. et al. (2009)** Wnt signaling promotes proliferation and stemness regulation of spermatogonial stem/progenitor cells. *Reproduction.* 138(1): 151-162. doi: 10.1530/REP-08-0510.
- Gordon, M.D., Nusse, R. (2006)** Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281(32): 22429-22433. doi: 10.1074/jbc.R600015200.
- Gotoh, N. (2009)** Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 4(1): 9-15. doi: 10.2174/157488809787169048.
- Gougnard, N., Vanderstraete, M., Cailliau, K. et al. (2012)** *Schistosoma mansoni*: Structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Exp Parasitol.* 132(1): 32-39. doi: 10.1016/j.exppara.2011.05.007.
- Graham, J.D., Clarke, C.L. (1997)** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 18(4): 502-519. doi: 10.1210/er.18.4.502.
- Graham, M.K., Fairweather, I., McGeown, J.G. (1997)** The effects of FaRPs on the motility of isolated muscle strips from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* 114(5): 455-465. doi: 10.1017/S0031182096008712.
- Grandy, D., Shan, J., Zhang, X. et al. (2009)** Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *J Biol Chem.* 284(24): 16256-16263. doi: 10.1074/jbc.M109.009647.



- Greveling, C.G. (1995)** The female-specific W1 sequence of the Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni* occurs in both genders of a Liberian strain. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71(2): 269-272. doi: 10.1016/0166-6851(94)00058-U.
- Greveling, C.G., Sommer, G., Kunz, W. (1997)** Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology* 115(6): 635-640. doi: n.v.
- Greveling, C.G. (2004)** *Schistosoma*. *Current Biology* 14(14): R545. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.006.
- Griebler, M., Westerlund, S.A., Hoffmann, K.H. et al. (2008)** RNA interference with the allatopregulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *Journal of Insect Physiology* 54(6): 997-1007. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.04.019.
- Grimmelikhuijzen, C.J., Hauser, F. (2012)** Mini-review: The evolution of neuropeptide signaling. *Regul Pept.* 177 Suppl: S6-9. doi: 10.1016/j.regpep.2012.05.001.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. et al. (2006)** Human schistosomiasis. *Lancet.* 368(9541): 1106-1118. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69440-3.
- Gubb, D., Garcia-Bellido, A. (1982)** A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol.* 68: 37-57. doi: n.v.
- Haccard, O., Lewellyn, A., Hartley, R.S. et al. (1995)** Induction of *Xenopus* oocyte meiotic maturation by MAP kinase. *Dev Biol.* 168(2): 677-682. doi: 10.1006/dbio.1995.1112.
- Haerberlein S., Haas, W. (2008)** Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol. Res.* 102(4): 657-662. doi: 10.1007/s00436-007-0807-1.
- Hahnel, S. (2010)** Identifizierung, Klonierung und erste Untersuchungen von Transmembranrezeptoren aus *Schistosoma mansoni*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Hahnel, S., Lu, Z., Wilson, R.A. et al. (2013)** Whole-organ isolation approach as a basis for tissue-specific analyses in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(7): e2336. doi:10.1371/journal.pntd.0002336.
- Halton, D.W., Maule, A.G. (2004)** Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis. *Can J Zool.* 82(2): 316-333. doi: n.v.
- Hamdan, F.F., Abramovitz, M., Mousa, A. et al. (2002)** A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine. *Mol Biochem Parasitol* 119(1): 75-86. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00400-5.

- Hanna, R., Pang, Y., Thomas, P. et al. (2006)** Cell-surface expression, progesterin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progesterin receptors alpha and beta in transfected cells. *J Endocrinol.* 190(2): 27-60. doi: 10.1677/joe.1.06694.
- Harmer, N.J., Ilaq, L.L., Mulloy, B. et al. (2004)** Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. *J Mol Biol.* 339(4): 821-834. doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.031.
- He, H., Xi, G., Lu, X. (2010)** Molecular cloning, characterization and expression analysis of an estrogen receptor-related receptor homologue in the cricket *Teleogryllus emma*. *J Insect Sci.*10:188. doi: 10.1673/031.010.18801.
- Hellberg, D. (2012)** Sex steroids and cervical cancer. *Anticancer Res.* 32(8): 3045-3054. doi: n.v.
- Hernandez-Bello, R., Ramirez-Nieto, R., Muniz-Hernandez, S. et al. (2011)** Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. *J Biomed Biotechnol.* 2011:625380. doi: 10.1155/2011/625380.
- Hikita, S.T., Kosik, K.S., Clegg, D.O. et al. (2008)** MUC1\* mediates the growth of human pluripotent stem cells. *PLoS One.* 3(10): e3312. doi: 10.1371/journal.pone.0003312.
- Hilberg, F., Roth, G.J., Krssak, M. et al. (2008)** BIBF 1120: Triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res.* 68(12):4774-82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6307.
- Hoffmann, K.F., Johnston, D.A., Dunne, D.W. (2002)** Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biol.* 3(8): research0041. doi:10.1186/gb-2002-3-8-research0041.
- Hofmann, K., Stoffel, W. (1993)** Tmbase - a database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 347: 166. doi: n.v.
- Hokke, C.H., Fitzpatrick, J.M., Hoffmann, K.F. (2007)** Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. *Trends Parasitol.* 23(4): 165-174. doi:10.1016/j.pt.2007.02.007.
- Holland, J.D., Klaus, A., Garratt, A.N. et al. (2013)** Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* 25(2): 254-264. doi: 10.1016/j.ceb.2013.01.004.
- Hollingsworth, M.A., Swanson, B.J. (2004)** Mucins in cancer: Protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.* 4(1): 45-60. doi:10.1038/nrc1251.
- Holmes, S.D., Fairweather, I. (1984)** *Fasciola hepatica*: The effects of neuropharmacological agents upon *in vitro* motility. *Exp Parasitol.* 58(2): 194-208. doi: 10.1016/0014-4894(84)90035-3.

- Howley, P.M., Israel, M.F., Law, M.F. et al. (1979)** A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes. *J Biol Chem.* 254(11): 4876-4883. doi: n.v.
- Huang, H.C., Klein, P.S. (2004)** The Frizzled Family: Receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 5(7):234. doi: 10.1186/gb-2004-5-7-234.
- Huang, P., Stern, M.J. (2005)** FGF signaling in flies and worms: More and more relevant to vertebrate biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2): 151-158. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.03.002.
- Huang, C.G., Lamitina, T., Agre, P. et al. (2007)** Functional analysis of the aquaporin gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(5): C1867-1873.
- Huang, Z., Fragouli, E., Wells, D. (2012)** Biomolecules of human female fertility - potential therapeutic targets for pharmaceutical design. *Curr Pharm Des.* 18(3): 310-324. doi: 10.2174/138161212799040439.
- Huang, S.C., Freitas, T.C., Amiel, E. et al. (2012)** Fatty acid oxidation is essential for egg production by the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 8(10): e1002996. doi: 10.1371/journal.ppat.1002996.
- Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L. et al. (1994)** Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature.* 372(6508): 746-754. doi:10.1038/372746a0.
- Hubbard, S.R., Till, J.H. (2000)** Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 69: 373-398. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373.
- Ingram, J.R., Rafi, S.B., Eroy-Reveles, A.A. et al. (2012)** Investigation of the proteolytic function of an expanded cercarial elastase gene family in *Schistosoma mansoni*. *PloS Negl Trop Dis.* 6(4): e1589. doi: 10.1371/journal.pntd.0001589.
- Irie, Y., Tanaka, M., Yasuraoka, K. (1987)** Degenerative changes in the reproductive organs of female schistosomes during maintenance *in vitro*. *J Parasitol.* 73(4): 829-835. doi: n.v.
- Itoh, N., Ornitz, D.M. (2011)** Fibroblast growth factors: From molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem.* 149(2): 121-130. doi: 10.1093/jb/mvq121.
- Jelen, F., Oleksy, A., Smietana, K. et al. (2003)** PDZ domains - common players in the cell signaling. *Acta Biochim Pol.* 50(4): 985-1017. doi: n.v.
- Jolly, R.E., Chin, C., Miller, S. et al. (2007)** Gene expression patterns during adaption of a helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biol.* 8(4):R65. doi: 10.1186/gb-2007-8-4-r65.

- Josefsberg Ben-Yehoshua, L., Lewellyn, A.L., Thomas, P. et al. (2007)** The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Mol Endocrinol.* 21(3): 664-673. doi: 10.1210/me.2006-0256.
- Jurberg, A.D., Goncalves, T., Costa, T.A. et al. (2009)** The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: Proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol.* 219(5):219-34. doi: 10.1007/s00427-009-0285-9.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T. (2005)** Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26(3): 439-451. doi: 10.1210/er.2005-0005.
- Kampinga, H.H., Craig, E.A. (2010)** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(8): 579-592. doi: 10.1038/nrm2941.
- Kampkötter, A., Ridgers, I., Johnston, D.A. et al. (1999)** *Schistosoma mansoni*: Cloning and characterization of the Ras homologue. *Exp Parasitol.* 91(3): 280-283. doi: 10.1006/expr.1998.4377.
- Kapp, K., Schüssler, P., Kunz, W. et al. (2001)** Identification, isolation and characterization of a Fyn-like tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 122(3): 317-327. doi: 10.1017/S0031182001007430.
- Kapp, K., Knobloch, J., Schüssler, P. et al. (2004)** The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol Biochem Parasitol.* 138(2): 171-182. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.07.010.
- Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y. et al. (2006)** Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol.* 20(7): 1519-1534. doi: 10.1210/me.2005-0243.
- Kashian, D.R., Dodson, S.I. (2004)** Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem.* 23(5): 1282-1288. doi: 10.1897/03-372.
- Khayath, N., Viscogne, J., Ahier, A. et al. (2007)** Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS J.* 274(3): 659-676. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05610.x.
- Keay, J., Thornton, J.W. (2009)** Hormone-activated estrogen receptors in annelid invertebrates: Implications for evolution and endocrine disruption. *Endocrinology.* 150(4): 1731-1738. doi: 10.1210/en.2008-1338.
- Kibbe, W.A. (2007)** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35 (webserver issue): May 25. doi: 10.1093/nar/gkm234.

- Kilian, B., Mansukoski, H., Barbosa, F.C. et al. (2003)** The role of Ppt/Wnt5 in regulating cell shape and movement during zebrafish gastrulation. *Mech Dev.* 120(4): 467-476. doi: 10.1016/S0925-4773(03)00004-2.
- Kim, J.J., Chapman-Davis, E., (2010)** Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod Med.* 28(1): 81-90. doi: 10.1055/s-0029-1242998.
- Kimble, J., Crittenden, S.L. (2007)** Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 23: 405-433. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123326.
- Klaus, A., Birchmeier, W. (2008)** Wnt signaling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 8(5): 387-398. doi: 10.1038/nrc2389.
- Knobloch, J., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2002a)** Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. *Dev Growth Differ.* 44 (6): 559-563. doi: 10.1046/j.1440-169X.2002.00667.x
- Knobloch, J., Winnen, R., Quack, M. et al. (2002b)** A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294(1-2): 87-97. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00760-6.
- Knobloch, J., Rossi, A., Osman, A. et al. (2004)** Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbetaR-I in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 138(2): 227-236. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.09.006.
- Knobloch, J., Kunz, W., Grevelding, C.G. (2006)** Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 36(12): 1261-1272. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.004.
- Knobloch, J., Beckmann, S., Burmeister, C. et al. (2007)** Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol.* 117(3): 318-336. doi: 10.1016/j.exppara.2007.04.006.
- Köhler H.R., Kloas, W., Schirling, M. et al. (2007)** Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology.* 16(1) 131-143. doi: 10.1007/s10646-006-0111-3.
- Köster, B., Dargatz, H., Schroder, J. et al. (1988)** Identification and localization of the products of a putative eggshell precursor gene in the vitellarium of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 31(2): 183-198. doi: 10.1016/0166-6851(88)90169-7.
- Krauss, G. (2008)** *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

- Krautz-Peterson, G., Camargo, S., Huggel, K. et al. (2007)** Amino acid transport in schistosomes: Characterization of the permease heavy chain SPRM1hc. *J Biol Chem.* 282(30): 21767-21775. doi: 10.1074/jbc.M703512200.
- Krautz-Peterson, G., Bhardwaj, R., Faghiri, Z. et al. (2010a)** RNA interference in schistosomes: Machinery and methodology. *Parasitology.* 137(3): 485-495. doi: 10.1017/S0031182009991168.
- Krautz-Peterson, G., Simoes, M., Faghiri, Z. et al. (2010b)** Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS Pathog.* 6(6):e1000932. doi: 10.1371/journal.ppat.1000932.
- Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M. et al. (2001)** Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 114(20): 3663-3672. doi: n.v.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. et al. (2001)** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305(3): 567-580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kunz, W. (2001)** Schistosome male-female interaction: Induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol.* 17(5): 227-231. doi:10.1016/S1471-4922(01)01893-1.
- Lafont, R., Mathieu, M. (2007)** Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology.* 16(1): 109-130. doi: 10.1007/s10646-006-0113-1.
- Lamb, E.W., Walls, C.D., Pesce, J.T. et al. (2010)** Blood fluke exploitation of non-cognate CD4+ T cell help to facilitate parasite development. *PLoS Pathog.* 6(4): e1000892. doi: 10.1371/journal.ppat.1000892.
- Lee, M.H., Klein, R.L., El-Shewy, H.M. et al. (2008)** The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry* 47(44): 11682-11692. doi: 10.1021/bi801451f.
- Lee, H.J., Zheng, J.J. (2010)** PDZ domains and their binding partners: Structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal.* 8: 8. doi: 10.1186/1478-811X-8-8.
- Leutnic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012)** SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue): D302-305. doi: 10.1093/nar/gkr931.
- Leutner, S., Oliveira, K.C., Rotter, B. et al. (2013)** Combinatory microarray and Super-Sage analyses identify pairing-dependently transcribed genes in *Schistosoma mansoni* males, including follistatin. (Eingereicht).
- Li, Y., Ren, J., Yu, W. et al. (2001)** The epidermal growth factor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src und beta-catenin. *J Biol Chem.* 276(38): 35239-35242. doi: 10.1074/jbc.C100359200.

- Li, H.F., Wang, X.B., Jin, Y.P. et al. (2010)** Wnt4, the first member of the Wnt family identified in *Schistosoma japonicum*, regulates worm development by the canonical pathway. *Parasitol Res.* 107(4): 795-805. doi: 10.1007/s00436-010-1933-8.
- Liao, W.H., Cheng, C.H., Hung, K.S. et al. (2013)** Protein tyrosine phosphatase receptor type O (Ptpro) regulates cerebellar formation during zebrafish development through modulating FGF signaling. *Cell Mol Life Sci.* 70(13):2367-2381. doi: 10.1007/s00018-013-1259-7.
- Long, T., Cailliau, K., Beckmann, S. et al. (2010)** *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *Int J Parasitol.* 40(9): 1075-1086. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.03.002.
- Long, T., Vanderstraete, M., Cailliau, K. et al. (2012)** SmSak, the second Polo-like kinase of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*: conserved and unexpected roles in meiosis. *PLoS One.* 7(6): doi: 10.1371/journal.pone.0040045.
- Lottspeich, F., Engels, J.W. (2006)** *Bioanalytik*, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- LoVerde, P.T., Niles, E.G., Osman, A. et al. (2004)** *Schistosoma mansoni* male - female interactions. *Can J Zool.* 82 (2): 357-374. doi: 10.1139/z03-217.
- LoVerde, P.T., Osman, A., Hinck, A. (2007)** *Schistosoma mansoni*: TGF-beta signaling pathways. *Exp Parasitol.* 117(3): 304-317. doi: 10.1016/j.exppara.2007.06.002.
- LoVerde, P.T., Andrade L.F., Oliveira, G. (2009)** Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Curr Opin Microbiol.* 12(4): 422-428. doi: 10.1016/j.mib.2009.06.005.
- Lucius, R., Loos-Frank, B. (2008)** *Biologie von Parasiten*, 2. Auflage. Springer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Lungchukiet, P., Zhang, J., Tobe, S.S. et al. (2008)** Quantification of allatostatin receptor mRNA levels in the cockroach *Diploptera punctata*, using real-time PCR. *J Insect Physiol* 54(6): 981-987. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.04.018.
- Luo, R., Zhou, C., Lin, J. et al. (2012)** Identification of *in vivo* protein phosphorylation sites in human pathogen *Schistosoma japonicum* by a phosphoproteomic approach. *J Proteomics* 75(3): 868-877. doi: 10.1016/j.jprot.2011.10.003.
- Luttrell, L.M. (2008)** Reviews in molecular biology and biotechnology: Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol.* 39(3): 239-264. doi: 10.1007/s12033-008-9031-1.
- Ma, L., Wang, H.Y. (2007)** Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca<sup>2+</sup> non-canonical pathway. *J Biol Chem.* 282(39): 28980-28990. doi: 10.1074/jbc.M702840200.

- Machado-Silva, J.R., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H.L. et al. (1998)** Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93 Suppl1: 303-307. doi: n.v.
- Maller, J.L. (2001)** The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 98(1): 8-10. doi: 10.1073/pnas.98.1.8.
- Mathieson, W., Wilson, R.A. (2010)** A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: The miracidium, hatch fluid and secretions. Int J Parasitol. 40(5): 617-628. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.10.014.
- Maule, A.G., Halton, D.W., Allen, J.M., et al. (1989)** Studies on motility *in vitro* of an ectoparasitic monogenean *Diclidophora merlangi*. Parasitol. 98(1): 85-93. doi: 10.1017/S0031182000059722.
- Maule, A.G., Mousley, A., Marks, N., et al. (2002)** Neuropeptide signaling systems - potential drug targets for parasite and pest control. Curr Top Med Chem. 2(7): 733-758. doi: 10.2174/1568026023393697.
- Mayoral, J.G. Nouzova, M., Brockhoff, A. et al. (2010)** Allatostatin-C receptors in mosquitoes. Peptides. 31(3): 442-450. doi: 10.1016/j.peptides.2009.04.013.
- McClelland, M., Nelson, M. (1992)** Effect of site-specific methylation on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. Nucleic Acids Res. 11; 20 Suppl: 2145-2157. doi:10.1093/nar/20.suppl.2145.
- McKerrow, J.H., Salter, J. (2002)** Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. Trends Parasitol. 18(5): 193-195. doi:10.1016/S1471-4922(02)02309-7.
- McManus, D.P., Loukas, A. (2008)** Current Status of Vaccines for schistosomiasis. Clin Microbiol Rev. 21(1): 225-242. doi: 10.1128/CMR.00046-07.
- McManus, D.P. (2012)** Schistosomiasis in 2012: Current status and key research priorities required for control leading to elimination. Expert Rev Anti Infect Ther. 10(11) 1233-1236. doi: 10.1586/eri.12.121.
- McVeigh, P., Kimber, M.J., Novozhilova, E. et al. (2005)** Neuropeptide signaling systems in flatworms. Parasitology. 131 Suppl: S41-55. doi: 10.1017/S0031182005008851.
- McVeigh, P., Mair, G.R., Akinson, L. et al. (2009)** Discovery of multiple neuropeptide families in the phylum *Platyhelminthes*. Int J Parasitol. 39 (11): 1243-1252. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.03.005.
- McVeigh, P., Mair, G.R., Novozhilova, E. et al. (2011)** Schistosome I/L amides - a new family of bioactive helminth neuropeptides. Int J Parasitol. 41(8): 905-913. doi: 10.1016/j.ijpara.2011.03.010.



- Mecozzi, B., Rossi, A., Lazzaretti, P. et al. (2000)** Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* calcineurin subunits and immunolocalization to the excretory system. *Mol Biochem Parasitol.* 110(2): 333-343. doi: 10.1016/S0166-6851(00)00287-5.
- Mehlhorn, H., Piekarski, G. (2002)** Grundriß der Parasitenkunde, 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Melman, S.D, Steinauer M.L., Cunningham, C. et al. (2009)** Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(8): e504. doi: 10.1371/journal.pntd.0000504.
- Menrath, M., Michel, A., Kunz, W. (1995)** A female-specific cDNA sequence of *Schistosoma mansoni* encoding a mucin-like protein that is expressed in the epithelial cells of the reproductive duct. *Parasitology* 111(4): 477-483. doi: 10.1017/S0031182000065987.
- Merrill, B.J. (2012)** Wnt pathway regulation of embryonic stem cell self-renewal. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(9): a007971. doi: 10.1101/cshperspect.a007971.
- Messerli, S.M., Kasinathan, R.S., Morgan, W. et al. (2009)** *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Mol Biochem Parasitol.* 167(1): 54-59. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.007.
- Meyering-Vos, M. Merz, S., Sertkol, M. et al. (2006)** Functional analysis of the allatostatin-A type gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* and the armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem. Mol Biol.* 36(6): 492-504. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.03.008.
- Michel, A., Knobloch, J., Kunz, W. (2003)** P19: A female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. *Parasitology* 127 (6): 519-524. doi: 10.1017/S0031182003004244.
- Mimoto, A., Fuji, M., Usami, M. (2007)** Identification of an estrogenic hormone receptor in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 364(4): 883-888. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.089.
- Ming, Z., Dong, H., Zhong, Q. et al. (2006)** The effect of a mutagen (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) on cultured cells from adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res.* 98(5): 430-437. doi: 10.1007/s00436-005-0083-x.
- Minshall, R.D., Pavcnik, D., Browne, D.L. et al. (2002)** Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J Appl Physiol.* 92(2): 701-708. doi: 10.1152/jappphysiol.00689.
- Mohammadi, M., Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A. (2005)** Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(2): 107-137. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.01.008.

- Mohebiany, A.N., Nikolaienko, R.M., Bouyain, S. et al. (2013)** Receptor-type tyrosine phosphatase ligands: Looking for the needle in the haystack. *FEBS J.* 280(2): 388-400. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08653.x.
- Moneypenny, C.G., Kreshchenko, N., Moffett, C.L. et al. (2001)** Physiological effects of FMRFamide-related peptides and classical transmitters on dispersed muscle fibres of turbellarian, *Procerodes littoralis*. *Parasitol.* 122(4): 447-455. doi: 10.1017/S0031182001007508.
- Moller, S., Croning, M.D.R., Apweiler, R. (2001)** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 17(7): 646-653. doi: 10.1093/bioinformatics/17.7.646.
- Moore, D.V., Sandground, J.H. (1956)** The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Am J Trop Med Hyg.* 5(5): 831-840. doi: n.v.
- Morrison, D.D., Vande Waa, E.A., Bennett, J.L. (1986)** Effects of steroids and steroid synthesis inhibitors on fecundity of *Schistosoma mansoni in vitro*. *J Chem Ecol.* 12(8): 1901-1908. doi: 10.1007/BF01022391.
- Mourao, M.M., Grunau, C., LoVerde, P.T. et al. (2012)** Recent advances in *Schistosoma* genomics. *Parasite Immunol.* 34(2-3): 151-162. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01349.x.
- Mousley, A., Moffett, C.L., Duve, H. et al. (2005)** Expression and bioactivity of allatostatin-like neuropeptides in helminths. *Int J Parasitol* 35(14): 1557-1567. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.08.002.
- Mueller, O., Lightfoot, S., Schroeder, A. (2004)** RNA integrity number - standardization of RNA quality control. Agilent Technologies. Publication number: 5989-1165EN.
- Müller H.A., Samanta, R., Wieschaus, E. (1999)** Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: Zygotic requirements and the role of the frizzled genes. *Development.* 126(3) 577-586. doi: n.v.
- Nagahama, Y., Yamashita, M. (2008)** Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev Growth Differ.* 50(S1):S195-219. doi: 10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x.
- Nakamura, Y., Ishii, J., Kondo, A. (2013)** Rapid, facile detection of heterodimer partners for target human G protein-coupled receptors using a modified split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. *PLoS One.* 8(6): e66793. doi:10.1371/journal.pone.0066793.
- Nakazawa, M., Fantappie M.R., Freeman, G.L. et al. (1997)** *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp Parasitol.* 85(2): 233-240. doi: 10.1006/expr.1997.4148.

- Nawaratna, S.S., McManus, D.P., Moertel, L. et al. (2011)** Gene atlas of digestive and reproductive tissues in *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 5(4): e1043. doi: 10.1371/journal.pntd.0001043.
- Nässel, D.R., Wegener, C. (2011)** A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: Any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? Peptides. 32(6): 1335-1355. doi: 10.1016/j.peptides.2011.03.013.
- Ndegwa, D., Krautz-Peterson, G., Skelly, P.J. (2007)** Protocols for gene silencing in schistosomes. Exp. Parasitol. 117(3): 284-291. doi: 10.1016/j.exppara.2007.07.012.
- Neilson, K.M., Friesel, R. (1996)** Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptors by point mutations in the extracellular, transmembrane, and kinase domains. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.271.40.25049.
- Neumann, S., Ziv, E., Lantner, F. et al. (1992)** Cloning and sequencing of an hsp 70 gene of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol. 56(2): 357-360. doi: 10.1016/0166-6851(92)90188-P.
- Neves, R.H., de Lamare Biolchini, C., Machado-Silva J.R. et al. (2005)** A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. Parasitol Res. 95(1): 43-49. doi: 10.1007/s00436-004-1241-2.
- Nicol, B., Guiquen, Y. (2011)** Expression profiling of Wnt signaling genes during gonadal differentiation and gametogenesis in rainbow trout. Sex Dev. 5(6): 318-329 doi: 10.1159/000334515.
- Noce, T., Okamoto-Ito, S., Tsunekawa, N. (2001)** Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. Cell Struct Funct. 26(3): 131-136. doi: 10.1247/csf.26.131.
- Novozhilova, E., Kimber, M.J., Qian, H. et al. (2010)** FMRamide-like peptides (FLPs) enhance voltage-gated calcium currents to elicit muscle contraction in the human parasite *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 10;4(8):e790. doi: 10.1371/journal.pntd.0000790.
- Nusse, R. (2003)** Wnts and Hedgehogs: Lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. Development. 130(22): 5297-5305. doi: 10.1242/dev.00821.
- Nusse, R. (2008)** Wnt signaling and stem cell control. Cell Res. 18(5): 523-527. doi: 10.1038/cr.2008.47.
- Ocon-Grove, O.M., Krzysik-Walker, S.M., Maddineni, S.R. et al. (2008)** Adiponectin and its receptors are expressed in the chicken testis: Influence of sexual maturation on testicular AdipoR1 and AdipoR2 mRNA abundance. Reproduction. 136(5): 627-638 doi: 10.1530/REP-07-0446.

- Ogawa, K., Wakayama, A., Kunisada, T. et al. (1998)** Identification of a receptor tyrosine kinase involved in germ cell differentiation in planarians. *Biochem Biophys Res Commun* 248(1): 204-209. doi.org/10.1006/bbrc.1998.8915.
- Ogawa, K., Kobayashi, C., Hayashi, T. et al. (2002)** Planarian fibroblast growth factor receptor homologs expressed in stem cells and cephalic ganglions. *Dev Growth Differ.* 44(3): 191-204. doi: 10.1046/j.1440-169X.2002.00634.x.
- Ojopi, E.P., Oliveira, P.S., Nunes, D.N. et al., (2007)** A quantitative view of the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult-worms using SAGE. *BMC Genomics.* 8: 186. doi: 10.1186/1471-2164-8-186.
- Oliveira, G. (2007)** The *Schistosoma mansoni* transcriptome: An update. *Exp Parasitol.* 117(3): 229-235. doi: 10.1016/j.exppara.2007.06.001.
- Oliveira, K.C., Carvalho, M.L., Verjovski-Almeida, S. et al. (2012)** Effect of human TGF- $\beta$  on the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* adult worms. *Mol Biochem Parasitol.* 183(2): 132-139. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.02.008.
- Osman, A., Niles, E.G., LoVerde, P.T. (2004)** Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: Role in ERK-mediated transforming growth factor beta (TGF-beta) down-regulation. *J Biol Chem.* 279(8): 6474-6486. doi: 10.1074/jbc.M310949200.
- Osman, A., Niles, E.G., Verjovski-Almeida, S. et al. (2006)** *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: Role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog.* 2(6): e54. doi: 10.1371/journal.ppat.0020054.
- Pandey, P., Kharbanda, S., Kufe, D. (1995)** Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res.* 55(18): 4000-4003. doi: n.v.
- Parker-Manuel, S.J., Ivens, A.C., Dillon, G.P. et al. (2011)** Gene expression patterns in larval *Schistosoma mansoni* associated with infection of the mammalian host. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(8): e1274. doi: 10.1371/journal.pntd.0001274.
- Penzlin, H. (1996)** Lehrbuch der Tierphysiologie, 6. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena. Stuttgart.
- Petersen, C.P., Reddien, P.W. (2009)** Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell.* 139(6): 1056-68. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.035.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. et al. (2011)** SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 8(10): 785-786. doi: 10.1038/nmeth.1701.
- Pica-Mattoccia, L., Doenhoff, M.J. Valle, C. et al. (2009)** Genetic Analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 111(1): 82-85. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.01.012.

- Pietersen, A.M., van Lohuizen, M. (2008)** Stem cell regulation by polycomb repressors: Postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol.* 20(2): 201-207. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.004.
- Pochampalli, M.R., Bejjani, R.M., Schroeder, J.A. (2007)** MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene* 26(12): 1693-1701. doi: 10.1038/sj.onc.1209976.
- Polanska, U.M., Edwards, E., Fernig, D.G., et al. (2011)** The cooperation of FGF receptor and Klotho is involved in excretory canal development and regulation of metabolic homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 286(7):5657-5666. doi: 10.1074/jbc.M110.173039.
- Popiel, I., Coili, D., Erasmus, D.A. (1984)** The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *Int J Parasitol* 14(2): 183-190. doi: 10.1016/0020-7519(84)90047-X.
- Popiel, I. (1986)** Male-stimulated female interaction in *Schistosoma*: a review. *J Chem Ecol.* 12 (8): 1745-1754, doi: 10.1007/BF01022380.
- Powers, C.J., McLeskey, S.W., Wellstein, A. (2000)** Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 7(3): 165-197. doi: 10.1677/erc.0.0070165.
- Preechaphol, R., Klinbunga, S., Yamano, K. et al. (2010)** Molecular cloning expression of progesterin membrane receptor component 1 (Pgmrc1) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Gen Comp Endocrinol.* 168(3): 440-9. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.06.002.
- Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A. et al. (2012)** A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(1): e1455. doi: 10.1371/journal.pntd.0001455.
- Qi, M., Elion, E.A. (2005)** MAP kinase pathways. *J Cell Sci.* 188(16): 3569-3572. doi: 10.1242/jcs.02470.
- Qiagen (2001)** Qiagen PCR Cloning Handbook - [www.Qiagen.com](http://www.Qiagen.com).
- Quack, T., Beckmann, S., Grevelding, C.G. (2006)** Schistosomiasis and the molecular biology of the male-female interaction of *S. mansoni*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119 (9-10): 365-372. doi: n.v.
- Quack, T., Knobloch, J., Beckmann, S. et al. (2009)** The formin-homology protein SmDia interacts with the Src kinase SmTK3 and the GTPase SmRho1 in the gonads of *Schistosoma mansoni*. *PLoS One.* 4(9): e6998. doi: 10.1371/journal.pone.0006998.
- Quack, T., Wippersteg, V., Grevelding, C.G. (2010)** Cell culture for schistosomes - changes of success or wishful thinking? *Int J Parasitol.* 40(9): 991-1002. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.04.013.

- Quack, T., Hahnel, S., Lu, Z. et al. (2012)** Novel organ and cell-isolation approaches for differential sub-proteome and sub-transcriptome analyses in *Schistosoma mansoni*. 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP) in Heidelberg, 14.-17.03. 2012, Abstract P23; **Poster.**
- QuickChange Mutagenesis Manual**, Stratagene.
- Rachagani, S., Macha, M.A., Ponnusamy, M.P. et al. (2012)** MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through stabilization of fibroblast growth factor receptor 1. *Carcinogenesis* 33(10): 1953-1964. doi: 10.1093/carcin/bgs225.
- Rahman, M.S., Mettrick, D.F., Podesta, R.B. (1985)** *Schistosoma mansoni*: Effects of *in vitro* serotonin (5HT) on aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism. *Exp Parasitol.* 60(1):10-17. doi: 10.1016/S0014-4894(85)80018-7.
- Raina, D. Ahmad, R., Kumar, S. et al. (2006)** MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *EMBO J.* 25(16): 3774-3783. doi: 10.1038/sj.emboj.7601263.
- Ramachandran, H., Skelly, P.J., Shoemaker, C.B. (1996)** The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol Biochem Parasitol.* 83(1): 1-10. doi: 10.1016/S0166-6851(96)02731-4.
- Rebscher, N., Deichmann, C., Sudhop, S. et al. (2009)** Conserved intron positions in FGFR genes reflect the modular structure of FGFR and reveal stepwise addition of domains to an already complex ancestral FGFR. *Dev Genes Evol.* 219(9-10): 455-468. doi: 10.1007/s00427-009-0309-5.
- Reis, M.G., Kuhns, J., Blanton, R. et al. (1989)** Localization and pattern of expression of a female specific mRNA in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 32(2-3): 113-119. doi: 10.1016/0166-6851(89)90062-5.
- Ren, J., Raina, D., Chen, W. et al. (2006)** MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Mol Cancer Res* 4(11) 873-883. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0204.
- Ribeiro, P., El-Shehabi, F., Patocka, N., (2005)** Classical transmitters and their receptors in flatworms. *Parasitology.* 131 Suppl: S19-40. doi: 10.1017/S0031182005008565.
- Riddiford, N., Olson, P.D. (2011)** Wnt gene loss in flatworms. *Dev Genes Evol.* 221(4): 187-197. doi: 10.1007/s00427-011-0370-8.
- Rinaldi, G., Eckert, S.E., Tsai, J. et al. (2012)** Germline transgenesis and insertional mutagenesis in *Schistosoma mansoni* mediated by murine leukemia virus. *PLoS Pathog.* 8(7): e1002820. doi: 10.1371/journal.ppat.1002820.

- Roberts, S.M., MacGregor, A.N., Vojvodic, M. et al. (1983)** Tegument surface membranes of adult *Schistosoma mansoni*: Development of a method for their isolation. *Mol Biochem Parasitol.* 9(2): 105-127. doi: 10.1016/0166-6851(83)90104-4.
- Rofatto, H.K., Tararam, C.A., Borges, W.C. et al. (2009)** Characterisation of phosphodiesterase-5 as a surface protein in the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 166(1): 32-41. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.02.006.
- Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C. et al. (2008a)** Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (SmPoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 157(2): 217-227. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.11.015.
- Roger, E., Grunau, C., Pierce, R.J. et al. (2008b)** Controlled chaos of polymorphic mucins in a metazoan parasite (*Schistosoma mansoni*) interacting with its invertebrate host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl Trop Dis.* 2(11): e330. doi: 10.1371/journal.pntd.0000330.
- Rohe, H.J., Ahmed, I.S., Twist, K.E. et al. (2009)** PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): A targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther.* 121(1): 14-19. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.006.
- Rohlfing, A.K., Miteva, Y., Moronetti, L. et al. (2011)** The *Caenorhabditis elegans* mucin-like protein OSM-8 negatively regulates osmosensitive physiology via the transmembrane protein PTR-23. *PLoS Genet.* 7(1): e1001267. doi: 10.1371/journal.pgen.1001267.
- Roskoski, R. (2004)** Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 324(4): 1155-1164. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.171.
- Ross, A.G., Bartley, P.B., Sleight, A.C. et al. (2002)** Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 346(16): 1212-1220. doi: 10.1056/NEJMra012396.
- Rossi, A., Pica-Mattoccia, L., Cioli, D. et al. (2002)** Rapamycin insensitivity in *Schistosoma mansoni* is not due to FKBP12 functionality. *Mol Biochem Parasitol.* 125(1-2): 1-9. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00207-4.
- Roth, G.J., Heckel, A., Colbatzky, F. et al. (2009)** Design, synthesis, and evaluation of indolinones as triple angiokinase inhibitors and the discovery of a highly specific 6-methoxycarbonyl-substituted indolinone (BIBF 1120). *J Med Chem.* 52(14): 4466-4480. doi: 10.1021/jm900431g.
- Rudolf, A., Hübinger, C., Hüsken, K. et al. (2013)** The *Hydra* FGFR, Kringelchen, partially replaces the *Drosophila* Heartless FGFR. *Dev Genes Evol.* 223(3): 159-169. doi: 10.1007/s00427-012-0424-6.
- Saitho, O., Yuruzume, E., Nakata, H. (1996)** Identification of planarian serotonin receptor by ligand binding and PCR studies. *Neuroreport.* 8(1): 173-178. doi: n.v.

- Saitho, O., Yuruzume, E., Watanabe, K., et al. (1997)** Molecular identification of a G protein-coupled receptor family which is expressed in planarians. *Gene* 195: 55-61. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00152-2.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2. Auflage. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, T.M., Machado, C.R., Franco, G.R. et al. (2002)** Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. *Mol Biochem Parasitol*. 125(1-2): 103-112. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00218-9.
- Sap, J., Jiang, Y.P., Friedlander, D. et al. (1994)** Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol Cell Biol*. 14(1): 1-9. doi: 10.1128/MCB.14.1.1.
- Scarpin, K.M., Graham, J.D., Mote, P.A. et al. (2009)** Progesterone action in human tissues: Regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nuc Recept Signal*. 7: e009. doi: 10.1621/nrs.07009.
- Schiöth, H.B., Fredriksson, R. (2005)** The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*. 142(1-2): 94-101. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018.
- Schroeder, J.A., Thompson, M.C., Gardner, M.M. et al. (2001)** Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary glands. *J Biol Chem*. 276(16): 13057-13064. doi: 10.1074/jbc.M011248200.
- Schulte, G. (2010)** International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev*. 62(4): 632-667. doi: 10.1124/pr.110.002931.
- Schwegler, J., Lucius, R. (2011)** *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*, 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Scott, A.P. (2012)** Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. *Steroids*. 77(13): 1450-1468. doi: 10.1016/j.steroids.2012.08.009.
- Scott, A.P. (2013)** Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. *Steroids*. 78(2): 268-281. doi: 10.1016/j.steroids.2012.11.006.
- Senapati, S., Das, S., Batra, S.K. (2010)** Mucin-interacting proteins: From function to therapeutics. *Trends Biochem Sci*. 35(4): 236-245. doi: 10.1016/j.tibs.2009.10.003.
- Shaw, J.R., Erasmus, D.A. (1981)** *Schistosoma mansoni*: An examination of the reproductive status of females from single sex infections. *Parasitology* 82(1): 121-124.



- Shaw, J.R. (1987)** *Schistosoma mansoni*: Vitelline gland development in females from single sex infections. *J Helminthol.* 61(3): 253-259. doi: 10.1017/S0022149X00010117.
- Shoemaker, C.B., Ramachandran, H., Landa, A. et al. (1992)** Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol Biochem Parasitol.* 53 (1-2): 17-32. doi: 10.1016/0166-6851(92)90003-3.
- Shotton, D.M. (1970)** Elastase. *Methods Enzymol.* 19: 113-140: doi: 10.1016/0076-6879(70)19009-4.
- Siddiqui, A.A., Siddiqui, B.A., Ganley-Leal, L. (2011)** Schistosomiasis vaccines. *Hum Vaccin.* 7(11): 1192-1197. doi: 10.4161/hv.7.11.17017.
- Sinclair, D.A., Syrzycka, M., Macauley, M.S. et al. (2009)** *Drosophila* O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (sxc). *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(32): 13427-13432. doi: 10.1073/pnas.0904638106.
- Singh, P.K., Hollingsworth, M.A. (2006)** Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 16(9): 467-476. doi: 10.1016/j.tcb.2006.07.006.
- Sirotkin, A.V. (2011)** Growth factors controlling ovarian functions. *J Cell Physiol.* 226(9): 2222-2225 doi: 10.1002/jcp.22588.
- Skinner, D.E., Rinaldi, G., Suttiaprapa, S. et al. (2012)** Vasa-like DEAD-box helicases of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(6): e1686. doi: 10.1371/journal.pntd.0001686.
- Smaghe, B.J., Stewart, A.K., Carter, M.G. et al. (2013)** MUC1\* ligand, NM23-H1, is a novel growth factor that maintains human stem cells in a more naïve state. *PLoS One.* 8(3): e58601. doi: 10.1371/journal.pone.0058601.
- Smart, D., Johnston, C.F., Curry W.J. et al. (1994)** Peptides related to the *Diploptera punctata* allatostatins in nonarthropod invertebrates: An immunocytochemical survey. *J. Comp. Neurol.* 347(3): 426-432. doi: 10.1002/cne.903470308.
- Smart, D., Johnston, C.F., Maule, A.G. et al. (1995)** Localization of *Diploptera punctata* allatostatin-like immunoreactivity in helminths: An immunocytochemical study. *Parasitology* 110(1): 87-96. . doi: 10.1017/S0031182000081087.
- Smith, J.L., Kupchak, B.R., Garitaonandia, I. et al. (2008)** Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids.* 73(11): 1160-1173. doi: 10.1016/j.steroids.2008.05.003.
- Sokol, S.Y. (2011)** Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development.* 138(20): 4341-4350. doi: 10.1242/dev.066209.

- Spiliotis, M., Mizukami, C., Oku, Y. et al. (2010)** *Echinococcus multilocularis* primary cells: Improved isolation, small-scale cultivation and RNA interference. *Mol Biochem Parasitol.* 174(1): 83-87. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.07.001.
- Spindler, K.D., Hönl, C., Tremmel, C.H. et al. (2009)** Ecdysteroid hormone action. *Cell Mol Life Sci.* 66(24): 3837-3850. doi: 10.1007/s00018-009-0112-5.
- Stay, B., Fairbairn, S., Yu, C.G. (1996)** Role of allatostatins in the regulation of juvenile hormone synthesis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32(3-4): 287-297. doi: 10.1002/(SICI)1520-6327.
- Stout, E.P., La Clair, J.J., Snell, T.W. et al. (2010)** Conservation of progesterone hormone function in invertebrate reproduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(26): 11859-11864. doi: 10.1073/pnas.1006074107.
- Svensson, E., Olsen, L., Mörck, C. et al. (2011)** The adiponectin receptor homologs in *C. elegans* promote energy utilization and homeostasis. *PLoS One.* 6(6): e21343. doi: 10.1371/journal.pone.0021343.
- Swierczewski B.E., Davies, S.J. (2009)** A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(8): e505. doi: 10.1371/journal.pntd.0000505.
- Takeo, S., Swanson, S.K., Nandan, K. et al. (2012)** Shaggy/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  and phosphorylation of Sarah/regulator of calcineurin are essential for completion of *Drosophila* female meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(17): 6382-6389. doi: 10.1073/pnas.1120367109.
- Talakhun, W., Roytrakul, S., Phaonakrop, N. et al. (2012)** Identification of reproduction-related proteins and characterization of the protein disulfide isomerase A6 cDNA in ovaries of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 7(2): 180-190. doi: 10.1016/j.cbd.2012.02.003.
- Taman, A., Ribeiro, P., (2009)** Investigation of a dopamine receptor in *Schistosoma mansoni*: Functional studies and immunolocalization. *Mol Biochem Parasitol* 168(1): 24-33. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.06.003.
- Taman, A., Ribeiro, P., (2011)** Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Mol Biochem Parasitol.* 176(1): 42-50. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.12.001.
- Tang, Y.T., Hu, T., Arterburn, M. et al. (2005)** PAQR Proteins: A novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol.* 61(3): 372-380. doi 10.1007/s00239-004-0375-2.
- Tanwar, P.S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L. et al. (2010)** Constitutive WNT/beta-catenin signaling in murine Sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis. *Biol Reprod.* 82(2): 422-432 doi: 10.1095/biolreprod.109.079335.

- Tatosyan, A.G., Mizenina, O.A. (2000)** Kinases of the Src family: Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*. 65(1): 49-58. doi: n.v.
- Thomas, P. (2008)** Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front Neuroendocrinol*. 29(2): 292-312. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.01.001.
- Thomas, P., Tubbs, C., Garry, V.F. (2009)** Progesterin functions in vertebrate gametes mediated by membrane progesterin receptors (mPRs): Identification of mPRalpha on human sperm and its association with sperm motility. *Steroids*. 74(7): 614-621. doi: 10.1016/j.steroids.2008.10.020.
- Thomas, P. (2012)** Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *Gen Comp Endocrinol*. 175(3): 367-383. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.032.
- Tonks, N.K. (2013)** Protein tyrosine phosphatases - from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J*. 280(2): 346-378. doi: 10.1111/febs.12077.
- Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1994)** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*. 63: 451-486. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002315.
- Turner, N., Grose, R. (2010)** Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nat Rev Cancer*. 10(2): 116-129. doi: 10.1038/nrc2780.
- van Amerongen, R., Nusse, R. (2009)** Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 136(19): 3205-3214. doi: 10.1242/dev.033910.
- van Diepen, A., van der Velden, N.S., Smit, C.H. et al. (2012)** Parasite glycans and antibody-mediated immune responses in *Schistosoma* infection. 139(9): 1219-1230. doi: 10.1017/S0031182012000273.
- van Hellemond, J., Retra, K., Brouwers, J. et al. (2006)** Function of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. *Int J Parasitol* 36(6): 691-699. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.01.007.
- van Keulen, H., LoVerde, P.T., Bobek, L.A. et al. (1985)** Organization of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 15: 215-230. doi: 10.1016/0166-6851(85)90121-5.
- van Keulen, H., Mertz, P.M., LoVerde, P.T. et al. (1991)** Characterization of a 54-nucleotide gap region in the 28S rRNA gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 45: 205-214. doi: 10.1016/0166-6851(91)90087-M.
- van Wielendaele, P., Wynant, N., Dillen, S. et al. (2013)** Neuropeptide F regulates male reproductive processes in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem Mol Biol*. 43(3): 252-259. doi: 10.1016/j.ibmb.2012.12.004.

- Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A. et al. (2003)** Transcriptome analysis of the acelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 35(2): 148-157. doi:10.1038/ng1237.
- Verjovski-Almeida, S., Venancio, T.M., Oliveira, K.C. et al. (2007)** Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. *Exp Parasitol.* 117(3): 236-245. doi: 10.1016/j.exppara.2007.04.005.
- Vermeire, J.J., Taft, A.S., Hoffmann, K.F. et al. (2006)** *Schistosoma mansoni*: DNA microarray gene expression profiling during the miracidium-to-mother sporocyst transformation. *Mol Biochem Parasitol.*147(1): 39-47. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.01.006.
- Verrey, F., Jack, D.L., Paulsen, I.T. et al. (1999)** New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol.* 172(3): 181-192. doi: 10.1007/s002329900595.
- Verrey, F., Meier, C., Rossier, G., et al. (2000)** Glycoprotein-associated amino acid exchangers: Broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch.* 440(4):503-512. doi: 10.1007/s004240000274.
- Vicogne, J., Pin, J.P., Lardans, V. et al. (2003)** An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus flytrap module. *Mol Biochem Parasitol.* 126(1): 51-62. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00249-9.
- Vicogne, J., Cailliau, K., Tulasne, D. et al. (2004)** Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 279(36): 37407-37414. doi: 10.1074/jbc.M313738200.
- Voronkov, A., Krauss, S. (2013)** Wnt/beta-catenin signaling and small molecule inhibitors. *Curr Pharm Des.* 19(4): 634-664. doi: 10.2174/1381612811306040634.
- Waisberg, M., Lobo, F.P., Cerqueira, G.C. et al., (2007)** Microarray analysis of gene expression induced by sexual contact in *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 8: 181. doi: 10.1186/1471-2164-8-181.
- Wallar, B.J., Alberts, A.S. (2003)** The formins: Active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 13(8): 435-446. doi:10.1016/S0962-8924(03)00153-3.
- Wallingford, J.B., Habas, R. (2005)** The developmental biology of Dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development.* 132(20): 4421-4436. doi: 10.1242/dev.02068.
- Wang, W., Wang, L., Liang, Y.S. (2012)** Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. *Parasitol Res.* 111(5): 1871-1877. doi: 10.1007/s00436-012-3151-z.
- Wang, Y., Macke, J.P., Abella, B.S. et al. (1996)** A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem* 271(8): 4468-4476. doi: 10.1074/jbc.271.8.4468.

- Wang, X., Li, H., Qi, X. et al. (2011)** Characterization and expression of a novel Frizzled 9 gene in *Schistosoma japonicum*. *Gene Expr Patterns*. 11(3-4): 263-270. doi: 10.1016/j.gep.2011.01.002.
- Wansleeben, C., Meijlink, F. (2011)** The planar cell polarity pathway in vertebrate development. 240(3): 616-626. doi: 10.1002/dvdy.22564.
- Webster, M.K., D'Avis, P.Y., Robertson, S.C., et al. (1996)** Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol*. 16(8): 4081-4087. doi: n. v.
- Wedegaertner P.B., Gill, G.N. (1989)** Activation of the purified protein tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 264(19): 11346-11353. doi: n. v.
- Wei, X., Xu, H., Kufe, D. (2005)** Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell*. 7(2): 167-178. doi: 10.1016/j.ccr.2005.01.008.
- Wei, X., Xu, H., Kufe, D. (2006)** MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol Cell*. 21(2): 295-305. 10.1016/j.molcel.2005.11.030.
- WHO/TDR (2005)** Scientific working group on Schistosomiasis. Meeting report 14-16 Nov. 2005, Geneva, Switzerland.
- WHO (2013)** Schistosomiasis - Fact sheet N°115. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Zugriffsdatum: 23.07.2013.
- Williams, D.L., Sayed, A.A., Bernier, J. et al. (2007)** Profiling *Schistosoma mansoni* development using serial analysis of gene expression (SAGE). *Exp Parasitol*. 117(3): 246-258. doi.: 10.1016/j.exppara.2007.05.001.
- Wilson, R.A., Ashton, P.D., Braschi, P.D. et al. (2007)** 'Oming in on schistosomes: Prospects and limitations for post-genomics. *Trends Parasitol*. 23 (1): 14-20. doi:10.1016 /j.pt.2006.10.002.
- Wippersteg, V., Kapp, K., Kunz, W. et al. (2002)** HSP70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 120(1): 141-150. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00446-7.
- Wong, H.C., Bourdelas, A., Krauss, A. et al. (2003)** Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell*. 12(5): 1251-1260. doi:10.1016/S1097-2765(03)00427-1.
- Woodhead, A.P., Thompson, M.E., Chan, K.K. et al. (2003)** Allatostatin in ovaries, oviducts and young embryos in the cockroach *Diploptera punctata*. *J. Insect Physiol*. 49(12): 1103-1114. doi: 10.1016/j.jinsphys.2003.08.006.

- Wu, W., LoVerde, P.T. (2008)** *Schistosoma mansoni*: Identification of SmNR4A, a member of nuclear receptor subfamily 4. *Exp Parasitol.* 120(2): 208-213. doi: 10.1016/j.exppara.2008.07.005.
- Wu, X.J., Sabat, G., Brown, J.F. et al. (2009)** Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. 164(1): 32-44. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.11.005.
- Xiao, Z.L. Cao, W., Biancani, P. et al. (2006)** Nongenomic effects of progesterone on the contraction of muscle cells from the guinea pig colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(5): 1008-1015. doi: 10.1152/ajpgi.00382.2005.
- Xue, C., Bahn, Y.S., Cox, G.M. et al. (2006)** G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell.* 17(2): 667-679. doi: 10.1091/mbc.E05-07-0699.
- Xu, R., Rudd, T.R., Hughes, A.J. et al. (2013)** Analysis of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) signalling network with heparin as coreceptor: Evidence for the expansion of the core FGFR signalling network. *FEBS J.* 280(10): 2260-2270. doi: 10.1111/febs.12201.
- Young, J.C. (2010)** Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol.* 88(2): 291-300. doi: 10.1139/o09-175.
- Young, N.D., Jex, A.R., Li, B. et al. (2012)** Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nat Genet.* 44(2): 221-225. doi: 10.1038/ng.1065.
- Zamanian, M., Kimber, M.J., McVeigh, P. et al. (2011)** The repertoire of G protein-coupled receptors in the human parasite *Schistosoma mansoni* and the model organism *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics.* 12: 596. doi: 10.1186/1471-2164-12-596.
- Zerlotini, A., Heiges, M., Wang, H. et al. (2009)** SchistoDB: A *Schistosoma mansoni* genome resource. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue): D579-D582. doi: 10.1093/nar/gkn681.
- Zerlotini, A., Oliveira, G. (2010)** The contributions of the genome project to the study of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105(4): 367-369. doi: 10.1590/S0074-02762010000400003.
- Zerlotini, A., Aquiar, E.R., Yu, F. et al. (2013)** SchistoDB: An updated genome resource for the three key schistosomes of humans. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue): D728-D731. doi: 10.1093/nar/gks1087.
- Zhang, K., Hansen, P.J., Ealy, A.D. (2010)** Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence *in vitro*. 140(6): 815-826. doi: 10.1530/REP-10-0190.

- Zhou, Y., Zheng, H., Chen, Y. et al. (2009)** The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*. 460(7253): 245-351. doi: 10.1038/nature08140.
- Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P. (2003)** Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(5): 2237-2242. doi: 10.1073/pnas.0436133100.
- Zhu, M., Chen, K., Wang, Y. et al. (2008)** Cloning and partial characterization of a gene in *Bombyx mori* homologous to a human adiponectin receptor. *Acta Biochim Pol*. 55(2): 241-249. doi: n.v.
- Zon, L.I., Dorfman, D.M., Orkin, S.H. (1989)** The polymerase chain reaction colony miniprep. *Biotechniques* 7(7): 696-698. doi: n.v.

## 8. Abkürzungen und Einheiten

### 8.1 Abkürzungen

ABAM	Antibiotikum/ Antimycotikum
Abb.	Abbildung
AdipoR	Adiponektin-Rezeptoren
BLAST	Basic Local alignment search tool
BME	basal medium eagle
Bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CDS	coding sequence
Col/Dis.	Collagenase-Dispase
CRD	<i>cysteine-rich</i> Domäne
CTK	Zelluläre Tyrosinkinase
C-Terminus	Carboxyterminus
DB	Datenbank
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dsh	<i>Dishevelled</i>
dsRNA	<i>double stranded</i> RNA
Dvl	<i>Dishevelled</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
et al.	et alii
FGF(R)	<i>Fibroblast growth factor (receptor)</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat



GVBD	<i>Germinal Vesicle Breakdown</i>
GW	<i>Genome Walking</i>
HCl	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
IC50	<i>Inhibitory concentration 50</i>
IG	Immunglobulin
ITPG	Isopropylthiogalactosid
KLSM	Konfokales Laser-Scanning Mikroskop
Konz.	Konzentration
LiCl	Lithiumchlorid
LMD	Lasermikrodissektion
MA	Microarray
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mPR	<i>membrane progesterin receptor</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
N-Terminus	Aminoterminus
NCS	<i>newborn calf serum</i>
n.d.	nicht durchgeführt
NPF	<i>neuropeptide F</i>
n.v.	nicht vorhanden
NPY	<i>neuropeptide Y</i>
NSC	<i>Neoblast-like stem cells</i>
OD	optische Dichte
OGT	<i>O-linked N-acetylglucosamine-Transferasen</i>
Oligo d(T)	Oligonucleotid aus Desoxythymidin-Nukleotiden
ORF	<i>open reading frame</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
PAQR	<i>progesterone and AdipoQ</i> Rezeptor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC-3	<i>prostate cancer cell line 3</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMRC	<i>progesterone membrane receptor component</i>
qPCR	<i>quantitative real time-PCR</i>
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonucleinsäure

RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RTP	Rezeptortyrosinphosphatase
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SH	<i>Src homology domain</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
SSC	<i>Saline sodium citrate buffer</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquatus</i>
TK	Tyrosinkinase
TMH	Transmembranhelix
TP	Tyrosinphosphatase
TR	<i>tandem repeat</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TS	<i>tegument stripping</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
TWEEN	Poloxyethylenglykolsorbitol-monooleat
TyrKc	Tyrosinkinase
u.a.	unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i>
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VKR	<i>Venus Flytrap Kinase Receptor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WISH	<i>whole mount in situ</i> -Hybridisierungen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galacto-pyranosid
Y2H	<i>Yeast two Hybrid</i>

z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8.2 Einheiten

°C	Grad Celcius
cm	Zentimeter
d	Tage
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo
l	Liter
M	Molar
m	Milli
Mb	Megabasen
min.	Minuten
n	Nano
OD	optische Dichte
rpm	rounds per minute
sec.	Sekunde
t	Zeit
Tm	<i>temperature melting point</i>
U	Unit
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
μ	mikro

## 8.3 Aminosäuren

<b>A</b>	Ala	Alanin	<b>M</b>	Met	Methionin
<b>B</b>	Asx	Asparagin(säure)	<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>C</b>	Cys	Cystein	<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>D</b>	Asp	Asparaginsäure	<b>Q</b>	Gln	Glutamin

## 8. Abkürzungen und Einheiten

---

<b>E</b>	Glu	Glutaminsäure	<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin	<b>S</b>	Ser	Serin
<b>G</b>	Gly	Glycin	<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>H</b>	His	Histidin	<b>V</b>	Val	Valin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin	<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>K</b>	Lys	Lysin	<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin
<b>L</b>	Leu	Leucin	<b>Z</b>	Glx	Glutamin(säure)

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 2.1:</b>	Schematischer Aufbau eines Kapillartransfer-Blots	<b>69</b>
<b>Abb. 3.1:</b>	Testesisolation aus adulten <i>S. mansoni</i> -Männchen	<b>80</b>
<b>Abb. 3.2:</b>	Ovarisolation aus adulten <i>S. mansoni</i> -Weibchen	<b>81</b>
<b>Abb. 3.3:</b>	Vitalitätsfärbung isolierter Gonaden aus adulten <i>S. mansoni</i>	<b>82</b>
<b>Abb. 3.4:</b>	Qualitative Analyse extrahierter Gesamt-RNA aus Adulten und Gonaden	<b>83</b>
<b>Abb. 3.5:</b>	Gonadenspezifische RT-PCRs zu ausgewählten Genen	<b>87</b>
<b>Abb. 3.6:</b>	Gonadenspezifische RT-PCRs zu ausgewählten Transmembranrezeptoren	<b>90</b>
<b>Abb. 3.7:</b>	<i>In situ</i> -Lokalisation ausgewählter Rezeptoren auf Gewebeschnitten adulter <i>S. mansoni</i>	<b>93</b>
<b>Abb. 3.8:</b>	Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in adulten Männchen	<b>95</b>
<b>Abb. 3.9:</b>	Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in den Testes adulter Männchen	<b>96</b>
<b>Abb. 3.10:</b>	Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in adulten Weibchen	<b>96</b>
<b>Abb. 3.11:</b>	Transkriptionsraten ausgewählter Rezeptoren in Ovarien adulter Weibchen	<b>97</b>
<b>Abb. 3.12:</b>	Sequenzanalyse des transmembranen Mucins SmTmMuc1	<b>100</b>
<b>Abb. 3.13:</b>	Transkriptionsraten von SmTmMuc1 nach dsRNA-Behandlung adulter <i>S. mansoni</i>	<b>102</b>
<b>Abb. 3.14:</b>	Morphologische Untersuchungen von <i>S. mansoni</i> -Pärchen nach <i>in vitro</i> -Behandlung mit SmTmMuc1-spezifischen dsRNAs	<b>103</b>
<b>Abb. 3.15:</b>	Sequenzanalyse des Neuropeptidrezeptors SmNPYR1	<b>105</b>
<b>Abb. 3.16:</b>	Transkriptionsraten von SmNPYR1 nach dsRNA-Behandlung adulter <i>S. mansoni</i>	<b>107</b>
<b>Abb. 3.17:</b>	Morphologische Untersuchungen von <i>S. mansoni</i> -Pärchen nach <i>in vitro</i> -Behandlung mit SmNPYR1-spezifischer dsRNA	<b>108</b>
<b>Abb. 3.18:</b>	Sequenzanalyse des <i>Frizzled</i> -Rezeptors SmFrz1	<b>110</b>
<b>Abb. 3.19:</b>	Einfluss der 3289-8625-Behandlung auf die Embryogenese von <i>S. mansoni</i> -Eiern	<b>112</b>

<b>Abb. 3.20:</b>	Lichtmikroskopische Untersuchung von Eiern aus inhibitorbehandelten <i>S. mansoni</i>	<b>113</b>
<b>Abb. 3.21:</b>	Mikroskopische Untersuchungen von <i>S. mansoni</i> -Pärchen nach <i>in vitro</i> -Behandlung mit dem <i>Frizzled</i> -Dvl-Inhibitor 3289-8625	<b>114</b>
<b>Abb. 3.22:</b>	Mikroskopische Untersuchungen von <i>S. mansoni</i> -Pärchen nach <i>in vitro</i> -Behandlung mit 500 µM des <i>Frizzled</i> -Dvl-Inhibitors 3289-8625	<b>115</b>
<b>Abb. 3.23:</b>	Transkriptionsrate von SmFrz1 nach dsRNA-Behandlung adulter <i>S. mansoni</i>	<b>116</b>
<b>Abb. 3.24:</b>	Einfluss der SmFrz1-dsRNA-Behandlung auf die Embryogenese von <i>S. mansoni</i> -Eiern	<b>117</b>
<b>Abb. 3.25:</b>	Lichtmikroskopische Untersuchung von Eiern aus dsRNA-behandelten <i>S. mansoni</i>	<b>117</b>
<b>Abb. 3.26:</b>	Sequenzanalyse der FGF-Rezeptoren SmFGFR1 und SmFGFR2	<b>120</b>
<b>Abb. 3.27:</b>	Sequenzvergleich der TyrKc-Domänen verschiedener FGFRs mit SmFGFR1 und SmFGFR2	<b>122</b>
<b>Abb. 3.28:</b>	Einfluss von BIBF1120 auf die Paarungsstabilität adulter <i>S. mansoni</i>	<b>124</b>
<b>Abb. 3.29:</b>	Einfluss von BIBF1120 auf die Eiproduktion adulter <i>S. mansoni</i>	<b>124</b>
<b>Abb. 3.30:</b>	Mikroskopische Untersuchungen von <i>S. mansoni</i> -Pärchen nach <i>in vitro</i> -Behandlung mit dem FGFR-Inhibitor BIBF1120	<b>126</b>
<b>Abb. 3.31:</b>	Transkriptionsraten von SmFGFR1 und SmFGFR2 nach dsRNA-Behandlung adulter <i>S. mansoni</i>	<b>127</b>
<b>Abb. 3.32:</b>	Sequenzanalyse der potentielle Progesteron-Rezeptoren SmPMRC1 und SmProgesterinR1	<b>130</b>
<b>Abb. 3.33:</b>	Einfluss von Progesteron auf die Eiproduktion adulter <i>S. mansoni</i>	<b>134</b>
<b>Abb. 3.34:</b>	Mikroskopische Untersuchungen von <i>S. mansoni</i> -Pärchen nach <i>in vitro</i> -Behandlung mit Progesteron	<b>135</b>
<b>Abb. 3.35:</b>	Transkriptionsraten von SmPMRC1 und SmProgesterinR1 nach dsRNA-Behandlung adulter <i>S. mansoni</i>	<b>136</b>

## 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 3.1:</b>	Qualitative Analyse extrahierter Gesamt-RNA aus Adulten und Gonaden	<b>84</b>
<b>Tab. 3.2:</b>	Zusammenfassung der gonadenspezifischen RT-PCRs	<b>86</b>

<b>Tab. 3.3:</b>	Zusammenfassung der Lokalisationsstudien zu ausgewählten Rezeptoren	<b>91</b>
<b>Tab. 3.4:</b>	BLAST-Analyse zum transmembranen Mucin SmTmMuc 1	<b>101</b>
<b>Tab. 3.5:</b>	BLAST-Analyse zum Neuropeptidrezeptor SmNPYR1	<b>106</b>
<b>Tab. 3.6:</b>	BLAST-Analyse zum potentiellen Progesteron-Rezeptor SmPMRC1	<b>131</b>
<b>Tab. 3.7:</b>	BLAST-Analyse zum potentiellen Progesteron-Rezeptor SmProgesterinR1	<b>132</b>

## 10. Veröffentlichungen und Stipendien

### 10.1 Publikationen

Beckmann, S., **Hahnel, S.**, Cailliau, K., Vanderstraete, M., Browaeys, E., Dissous, C., Grevelding, C.G. (2011) Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem. 286(49): 42325-42336. doi: 10.1074/jbc.M110.210336.

Beckmann, S., Quack, T., Burmeister, C., Buro, C., **Hahnel, S.**, Long, T., Dissous, C., Grevelding, C.G. (2011): "Sex in Schistosomes – Signaling Mechanisms in the Female Gonads." Parasitology Research Monographs

**Hahnel, S.**, Lu, Z., Wilson, R.A. Grevelding, C.G., Quack, T. (2013) Whole-organ isolation approach as a basis for tissue-specific analyses in *Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis. 7(7): e2336. doi:10.1371/journal.pntd.0002336.

### 10.2 Kongressbeiträge

Quack, T., Knobloch, J., Beckmann, S., **Hahnel, S.**, Vicogne, J., Dissous, D., Grevelding, C.G. (2010) Rho-GTPase- and tyrosine kinase-mediated signaling pathways bridge at SmDia to regulate cytoskeletal reorganization in the gonads of *Schistosoma mansoni*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP) in Düsseldorf, 17.-20.03. 2010, Abstract p. 160; **Vortrag**

**Hahnel, S.**, Quack, T., Leutner, S., Buro, C., Grevelding, C.G. (2010) *In silico* identification and first transcriptional analyses of G protein-coupled receptors (GPCRs) in adult *Schistosoma mansoni*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP) in Düsseldorf, 17.-20.03. 2010, Abstract p. 217; **Poster**

**Hahnel, S.**, Quack, T., Leutner, S., Buro, C., Grevelding, C.G. (2011) *In silico* identification and further investigation of G protein-coupled receptors from adult *Schistosoma mansoni*. Annual Spring Meeting of the British Society for Parasitology 12-14<sup>th</sup> April 2011. Abstract Or67\*; **Poster** (Cambridge University Press Prize on behalf of Parasitology)

Grevelding, C.G., Buro, C., Quack, T., **Hahnel, S.**, Dissous, C., Oliveria, K.C., Verjovski-Almeida, S., Beckmann, S. (2011) Signaling in *Schistosoma mansoni* gonads unravelled by



inhibitor and RNAi approaches. Annual Spring Meeting of the British Society for Parasitology 12-14<sup>th</sup> April 2011. Abstract Or50; **Vortrag**

Greveling, C.G., **Hahnel, S.**, Quack, T. (2011) Stripping schistosomes to get access to organs and cells for detailed cellular and molecular analyses. Proc. of the Annual Meeting of the Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten", Berlin/Germany (4 - 6 July 2011), Abstract, Page 38. **Vortrag**

Quack, T., **Hahnel, S.**, Lu, Z., Greveling, C.G. (2012) Novel organ and cell-isolation approaches for differential sub-proteome and sub-transcriptome analyses in *Schistosoma mansoni*. 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP) in Heidelberg, 14.-17.03. 2012, Abstract P23; **Poster**

**Hahnel, S.**, Beckmann, S., Greveling, C.G. (2012) Characterization of a transmembrane mucin involved in gonad development of *Schistosoma mansoni*. 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP) in Heidelberg, 14.-17.03.2012, Abstract 75; **Vortrag**

**Hahnel, S.**, Quack, T., Beckmann, S., Greveling, C.G. (2012) Transmembrane receptor signaling in the reproductive organs of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites VII, Hydra, Greece 02-07.09.2012. **Poster**

**Hahnel, S.**, Lu, Z., Wilson, R. A., Greveling, C. G., Quack, T. (2012). Isolation of gonad-specific RNA, proteins, and cells from *Schistosoma mansoni* adults by a novel organ- and cell-isolation approach. Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites VII, Hydra, Greece, 02.-07.09.2012. **Vortrag**

**Hahnel, S.**, Lu, Z., Wilson, R. A., Greveling, C. G., Quack, T. (2012). Novel organ isolation approach as a basis for tissue-specific analyses in *Schistosoma mansoni*. International Symposium on Schistosomiasis, Belo Horizonte, Brazil, 16.-19.09.2012. **Vortrag**

### 10.3 Stipendien

Diese Promotionsarbeit wurde für ein Jahr (Juli 2010 bis Juni 2011) durch die Stiftung „der Eheleute Dr. Med. Vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann“ finanziell unterstützt.

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Steffen Hahnel, geboren am 26.12.1979 in Gießen, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 08. August 2013

---

Steffen Hahnel

## 12. Danksagung

Die finalen Seiten dieser Arbeit möchte ich darauf verwenden allen Menschen, die mich während den letzten Jahren begleitet und unterstützt haben meinen Dank auszusprechen.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Christoph Grevelding, für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu können. Er hat mir geholfen, dass Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und mich wissenschaftlich stets unterstützt.

Ebenso möchte ich mich hier bei Herrn Prof. A. W. C. Dorresteyn für die Betreuung der Arbeit innerhalb des Fachbereichs der Biologie bedanken.

Mein Dank gilt auch der Stiftung „der Eheleute Dr. Med. Vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann“, die mich im Anfangsjahr meiner Arbeit finanziell unterstützt hat.

Die nächsten Worte möchte ich an all die Menschen richten, mit denen ich die letzten Jahre den (Labor-)Alltag im Institut geteilt habe. Ihr wart stets zur Stelle wenn guter Rat oder eine helfende Hand von Nöten waren. Sowohl wissenschaftlich als auch privat seid ihr mir in dieser Zeit eine große Hilfe gewesen. Dafür möchte ich euch sehr danken.

Hervorheben möchte ich Christina Scheld, Bianca Kulick und Helena Honig sowie Jörg Hirzmann, Christine Henrich und Brigitte Hofmann, die mir vielfach mit fachlicher Unterstützung und guten Ratschlägen zur Seite standen.

Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle natürlich die Arbeitsgruppe mit allen ihren „alten“ und „neuen“ Mitgliedern. Hierzu zählen Dr. Thomas Quack und Dr. Svenja Beckmann, mit denen ich in den letzten Jahren viele wissenschaftliche Diskussionen geführt habe und die mich beide fachlich sehr inspiriert haben. Vor allem die „Raucherpausen“ mit Thomas haben so manche gute Idee hervorgebracht. Ein besonders Verhältnis verbindet mich mit meinen beiden „Leidensgenossinnen“ Christin Buro und Silke Leutner sowie Gabriele Lang. Ihr habt mich sowohl wissenschaftlich als auch menschlich sehr bereichert.

Weitere Erwähnung sollten an dieser Stelle auch Verena Gelmedin, Zhigang Lu sowie Sophie und Richard Parker-Manuel finden, die zwar bisher noch nicht so lange, aber dafür auch in Zukunft meinen wissenschaftlichen Weg begleiten werden.

Zuletzt gilt großer Dank meiner Lebensgefährtin Christina sowie meinen lieben Eltern und Geschwistern, die jederzeit für mich da waren sowie mich stets unterstützt und motiviert

haben. Außerdem sei Hanne und Reinhard Eibert herzlich gedankt, die mich während der Schreibphase mit guten Speisen versorgt haben.