

Phosphorylcholin-substituierte Proteine im Sekretom des Nematoden *Ascaris suum*, ein prototypisches Modellsystem für intestinale Infektionen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Yilmaz, Yavuz

aus Wetzlar

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. G. Lochnit

Gutachterin: Prof. Dr. E. Roeb

Tag der Disputation: 11.10.2022

**Für meine geliebte Mutter,
Gülşen Yılmaz**

&

**in Gedenken an meinem Vater,
Ali Yılmaz**

This work was supported by LOEWE Research Focus “Non-neuronal cholinergic systems” an interdisciplinary collaborative research effort funded by the State of Hessen.

Diese Arbeit wurde vom LOEWE-Forschungsschwerpunkt „Nicht-neuronale cholinerge Systeme“, einer vom Land Hessen finanzierten interdisziplinären Verbundforschung, unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nematoden und ihre medizinische Bedeutung.....	1
1.2	Morphologie und Entwicklung von Nematoden.....	3
1.3	<i>Ascaris suum</i>	6
1.3.1	Lebenszyklus.....	7
1.3.2	<i>A. suum</i> als Modellsystem.....	8
1.4	Posttranslationale Modifikationen bei Nematoden.....	8
1.4.1	Modifikation durch Glykosylierung.....	9
1.4.2	Modifikation mit Phosphorylcholin.....	9
1.4.3	Biosynthese von Phosphorylcholin.....	13
1.4.4	Immunmodulatorische Wirkung von Phosphorylcholin.....	17
1.5	Ziel der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Geräte.....	23
2.1.2	Chemikalien.....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Kultivierung von <i>A. suum</i> in Kulturflaschen.....	25
2.2.2	Lyophilisation.....	26
2.2.3	Dialyse der Probe im Dialyseschlauch.....	27
2.2.4	Acetonfällung und Methanol-Chloroform-Fällung.....	27
2.2.5	Proteinvorbereitung.....	28
2.2.6	Proteinbestimmung.....	29
2.2.7	Rehydratisieren der IPG-Strips/IPG-Streifen.....	30
2.2.8	Isoelektrische Fokussierung (IEF)- die erste Dimension der 2-D-Gelelektrophorese.....	31
2.2.9	Äquilibrierung der IPG-Strips.....	32
2.2.10	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) - die zweite Dimension der 2-D-Gelelektrophorese.....	33
2.2.11	Western Blot.....	36
2.2.12	Flamingo-Fluoreszenzfärbung.....	39
2.2.13	Spot-Gewinnung mit dem Spot Cutter.....	39
2.2.14	Automatisierter In-Gel-Verdau.....	40
2.2.15	Automatisierter On-membrane-Verdau.....	43

2.2.16	Aufreinigung über ZipTip C18 (Millipore).....	45
2.2.17	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Identifizierung der ES-Proteine.....	52
3.2	Identifizierung der PC-modifizierten ES-Proteine	86
4	Diskussion	89
4.1	Vergleich von PC-ES-Produkten mit PC-Totalextrakt (TE)-Produkten	
	sowie Vergleich von ES-Produkten im Adult- und Larvenstadium	
	von <i>Ascaris suum</i>	89
4.2	Vergleich des Sekretoms von <i>A. suum</i> mit den Sekretomen anderer Helminthen	94
4.2.1	<i>C. elegans</i>	94
4.2.2	<i>Brugia malayi</i>	96
4.2.3	<i>Schistosoma japonicum</i>	98
4.3	Mögliche Funktionen der identifizierten und teilweise PC-modifizierten	
	Proteine im Rahmen des Infektionsgeschehens	100
4.4	Methodische Diskussion.....	105
4.5	Ausblick	106
5	Zusammenfassung	107
6	Summary	108
7	Abkürzungsverzeichnis	109
8	Abbildungsverzeichnis	114
9	Tabellenverzeichnis	115
10	Literaturverzeichnis	116
11	Anhang	129
11.1	Identifizierte Proteine.....	129
11.2	PC-modifizierte identifizierte Proteine.....	136
12	Ehrenwörtliche Erklärung	137
13	Danksagung	138

1 Einleitung

1.1 Nematoden und ihre medizinische Bedeutung

Die biologische Taxonomie der Lebewesen ergibt die 3 Domänen Bakterien, Archaeen und Eukaryonten. Im Gegensatz zu den ersten beiden Domänen (Bakterien und Archaeen), welche keinen Zellkern enthalten, umfasst die Domäne der Eukaryonten alle Lebewesen mit Zellkern. Hierunter fallen u.a. Tiere (einschließlich der Menschen), Pflanzen und Pilze.

Zu den artenreichsten Stämmen des Tierreiches gehören die sog. Helminthen- gemeinhin als Würmer bezeichnet. Diese bilden 92 % der Gruppe der Urmundtiere- den sog. Protostomier. 87 % der Protostomier wiederum gehören zu den Ecdysozoen. Ein Großteil der Ecdysozoen besteht aus dem Phylum Nematoden.

60 % der Nematoden, auch Faden- oder Rundwürmer genannt, weisen parasitäre Eigenschaften auf, d.h. ihr Überleben ist von einem andersartigen Organismus, einem Wirt, abhängig. Parasiten (synonym wird auch der Begriff „Schmarotzer“ verwendet) nutzen den Wirt zur Ernährung und Fortpflanzung. Eine durch Parasiten ausgelöste Krankheit nennt man Parasitose. Vom Tier auf den Menschen übertragbare Parasitosen werden hingegen Zoonosen genannt. Es existieren diverse Wege, über die Parasiten in den menschlichen Körper gelangen können. Bei den Parasitenarten *Ascaris*, *Enterobius* und *Trichuris* erfolgt dies beispielsweise über die Aufnahme von Eiern, bei den Arten *Necator*, *Ancylostoma* und *Strongyloides* hingegen durch das aktive Eindringen von Larven. *Dracunculus* ist ein Parasit, welcher durch die Aufnahme von Flöhen aus dem Wasser oder durch Insektenstiche (Filarien) in den Wirt (Mensch) gelangen kann. Filarien sind parasitische Fadenwürmer, welche sich v.a. im oberflächlichen bzw. tiefen Bindegewebe sowie im Lymphgefäßsystem manifestieren. Infektionen mit Filarien werden als Filariose bezeichnet.

Parasiteninfektionen sind mit einer hohen Morbidität sowie einer geringen Mortalität vergesellschaftet. Evolutionäre Prozesse im Rahmen von wiederkehrenden Wirt-Parasit-Interaktionen führten zu einer zunehmenden Anpassung der Parasiten an den Wirt (1). Verschiedene posttranslationale Modifikationen ermöglichen den Parasiten das

Überleben innerhalb des Wirtes (2, 3). Zudem zeigen Studien, dass Nematoden im Laufe ihrer Entwicklung ihre Cuticula verändern (4, 5). Es wird angenommen, dass dies einer der Adaptationsmechanismen darstellt, welche das Zusammenleben von Wirt und Parasit ermöglichen(6). Auch wurde nachgewiesen, dass Parasiten Oberflächeneffektormoleküle produzieren, welche vor dem Angriff des Immunsystem schützen (7, 8). Dies gelingt in erster Linie durch molekulares Mimikry, z.B. mittels Glykosylierungen (2) und Phosphorylierungen (3) sowie Exprimierung wirtsähnlicher Oberflächenantigene (9), wodurch es wiederum zur Anpassung an den Wirt kommt.

Ein Viertel der Weltbevölkerung ist chronisch von Nematoden befallen (10). Die medikamentöse Therapie dieser Infektionen mit aktuell benutzten Antihelminthika wie z.B. Mebendazol, Praziquantel oder Albendazol ist nicht zufrieden stellend, da diese z.T. mit ausgeprägten Nebenwirkungen einhergehen. Die meisten antihelminthisch eingesetzten Medikamente weisen ein teratogenes Potential auf, d.h. sie dürfen an Schwangeren nicht angewendet werden. Zudem zeigen sich bereits erste Resistenzen, beispielsweise beim Medikament Ivermectin (11). Außerdem wirken einige der Antihelminthika nur gegen bestimmte Stadien der Nematoden. Insgesamt besteht daher der dringende Bedarf an Entwicklung neuer Medikamente mit weniger Nebenwirkungen und breiterem Anwendungsspektrum.

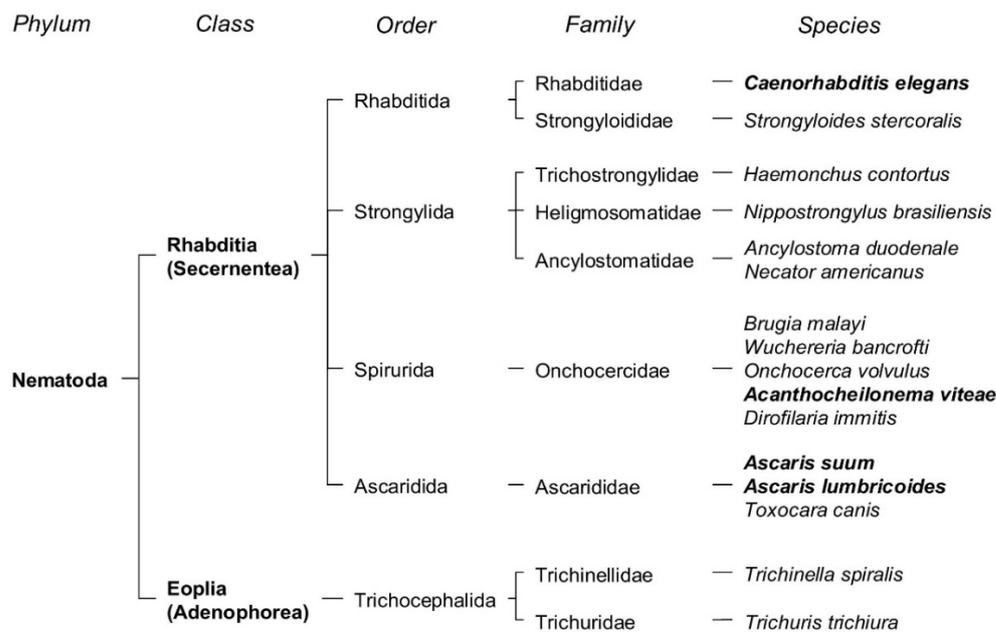


Abbildung 1: Taxonomische Klassifikation von prominenten Nematoden (12)

1.2 Morphologie und Entwicklung von Nematoden

Mit über 20000 beschriebenen Arten gehören Nematoden zu den artenreichsten Lebewesen. Man unterscheidet freilebende, räuberische und viele parasitische Arten, die Pflanzen, Tiere und auch den Menschen befallen können. Ein Großteil der Nematoden ernährt sich von Mikroben (Bakterien, Pilze, Algen usw.), aber auch von Aas, Fäkalien bis hin zu räuberisch erbeuteten Tieren. In Bezug auf die Größe liegt eine deutliche Varianz vor. Viele der freilebenden Nematoden sind mit dem bloßen Auge nicht zu sehen (mikroskopisch). Es gibt allerdings auch makroskopische, große und insbesondere lange, parasitische Nematoden, wie zum Beispiel das in der Pottwal-Plazenta lebende *Placentonema gigantissima*. Hier erreichen Weibchen eine Länge von bis zu 8,40 m bei einem Querschnittsdurchmesser von 2,5 cm (13). Charakteristisch für Nematoden ist das Fehlen eines Gefäßsystems sowie das Fehlen von Atmungsorganen. Die Weiterleitung der im Darm verarbeiteten Nährstoffe erfolgt auf direktem Wege durch die Wände zu den Körperzellen. Auch der über die Haut aufgenommene Sauerstoff diffundiert direkt zu den Körperzellen. Bei den meisten Nematoden liegen zwei getrennte Geschlechter vor, wobei die Männchen daran zu erkennen sind, dass sie kleiner sind und einen gebogenen Schwanz vorweisen. Die Fortpflanzung findet größtenteils sexuell statt, allerdings existieren auch selbstbefruchtende Arten- so genannte Hermaphroditen-, wie zum Beispiel *Caenorhabditis elegans* (14). Im Laufe ihres Lebens häuten sich Nematoden mehrmals und werden deshalb auch zu den Häutungstieren (Ecdysozoa) gerechnet. In einigen freilebenden Nematoden wurden Augenflecken, so genannte Ocellen, gefunden.

Die Anatomie der Nematoden weist einen hohen Grad an struktureller Gleichförmigkeit auf (15). Klassischerweise liegt eine länglich-zylindrische Form mit rundem Querschnitt vor. Am Vorderende findet man eine muskulöse Mundöffnung mit anschließendem Rachen (Pharynx), welches einem hohen inneren Druck ausgesetzt ist. Hier wird mittels einer neuromuskulären Pumpe die aufgenommene Nahrung zermahlen. Der Korpus enthält neben dem Darm und den Fortpflanzungsorganen das Exkretionsorgan. Kurz vor dem Hinterende liegt der Anus (siehe Abbildung 2).

Im Inneren erinnert der Aufbau einem Zweiröhrensystem, welches von einer mit Flüssigkeit gefülltem Hohlraum, dem sogenannten Pseudocoelom, getrennt wird. Das äußere System enthält neben der Kutikula und der Hypodermis das exkretorische System,

das Nervensystem sowie die Muskulatur. Das innere System wiederum beinhaltet den Pharynx, den Darm sowie das Reproduktionssystem.

Die Hypodermis besteht aus einer mehrkernigen Plasmamasse (Synzytium), welche die mehrschichtige Kutikula absondert. Die äußerste Kutikulaschicht wird auch Epikutikula genannt und ist lipidhaltig. Hierauf folgen die kortikale, mediale und basale Schicht. Die kortikale und basale Schicht enthält Kollagenfasern, welche durch Verstrebungen der flüssigkeitsgefüllten medialen Schicht unterbrochen werden. Die Kutikula bietet den Nematoden Schutz vor Austrocknung sowie anderen ungünstigen Umweltbedingungen, zum Beispiel bei parasitischen Arten vor den Verdauungssäften des Wirtes.

Das Nervensystem setzt sich zusammen aus einem circumpharyngealen Ring (20 Neurone), welcher unter der Pharynxmuskulatur liegt, und einem ventralen und dorsalen Nervenstrang (282 Neurone), welcher sich zwischen der Hypodermis und der Muskulatur befindet (16–18). Durch sie wird die Wahrnehmung und Verarbeitung einfacher Reize ermöglicht. Anders als bei vielen anderen Tierarten breiten sich bei Nematoden die Muskelstränge selbst zu den Nervenbahnen aus und nicht umgekehrt. Die Sinnesorgane der Nematoden, welche als Mechano- und Chemorezeptoren dienen, werden Sensillen bezeichnet.

Für die Fortbewegung benutzen Nematoden Längsmuskeln, welche sich vom Kopf bis zum Schwanz erstrecken. Diese bestehen aus einem kontraktilem Teil, der Aktin- und Myosinfasern enthält, und einem nicht-kontraktilem Teil, welcher sich mit anderen Muskelzellen oder Nerven verbinden kann. Neben der abwechselnden Kontraktion und Relaxation der Längsmuskeln sind für eine schlängelnde Bewegung eine starke Kutikula und ein hoher Innendruck der Pseudocoelflüssigkeit (zwischen 70 und 210 mmHg), welche eine Art Hydroskelett darstellen, essenziell.

Der Darmtrakt gliedert sich in Vorder-, Mittel- und Enddarm, wobei der Vorder- und Enddarm embryologisch aus dem Ektoderm und der Mitteldarm aus dem Endoderm entstammen. Die Darmepithelzellen tragen an der inneren Oberfläche eine Microvilli-ähnliche Schicht.

Das Exkretionsorgan kann unter den Nematoden Variationen aufzeigen und umfasst ein Drüsen- und Kanalsystem sowie eine Exkretionspore, welche unter anderem bei der Osmoregulation und Häutung der Larven eine Rolle spielen.

Das weibliche Reproduktionssystem enthält zwei Eierstöcke, welche in entgegengesetzte Richtungen ausgerichtet sind und direkt in die Gebärmutter übergehen. Die Gebärmutter wiederum mündet in der Vagina. Bei Weibchen befindet sich die Vulva in der Körpermitte. Bei Männchen formt das Rektum zusammen mit dem Samenleiter sowie dem sogenannten taxontypischen Spicular-Apparat eine Kloake. Letzteres gewährleistet nicht etwa den Samentransport, sondern hält während der Kopulation die Vulva offen und verhakt das Männchen, sodass die Spermien auf direktem Wege aus dem Samenleiter übertragen werden können (19).

Die produzierten Eier besitzen eine gut entwickelte Schale zum Schutz der eingeschlossenen Larven-Embryos in verschiedenen Umgebungen. Sie setzt sich aus drei bis fünf Schichten zusammen und enthält unter anderem Lipoproteine, Chitin, Lipide, Uterus- und Rektumsekrete.

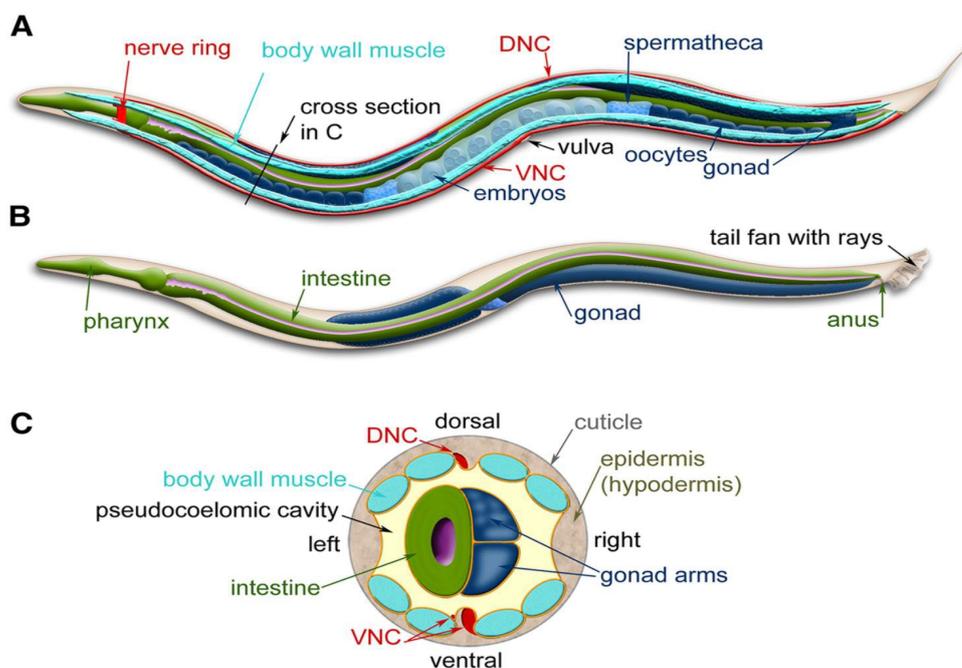


Abbildung 2: Anatomie von *C. elegans* (20)

Seitliche Betrachtung wichtiger anatomischer Merkmale eines Hermaphroditen (A) und eines *C. elegans*-Männchens (B) sowie Querschnittansicht (C) durch den vorderen Bereich des Hermaphroditen (Stelle mit einer schwarzen Linie in A markiert).

DNC: dorsal nerve cord bzw. dorsaler Nervenstrang; VNC: ventral nerve cord bzw. ventraler Nervenstrang

In Anlehnung an die Bilder auf www.wormatlas.org.

1.3 *Ascaris suum*

Ascaris suum, auch Schweinespulwurm genannt, sowie das den Menschen befallende Korrelat *Ascaris lumbricoides* sind die häufigsten Darmparasiten weltweit und Auslöser der Ascariasis-Erkrankung. Klassischerweise infiziert sich der Wirt über unsaubere Nahrungsmittel, die Wurmeier bzw. Larven enthalten. Während ihres Lebenszyklus durchwandern die Schweinespulwürmer verschiedene Organregionen (siehe Punkt 1.3.1). Daher können sie je nach derzeit betroffenem Organ diverse Krankheitszeichen verursachen, wobei ein Großteil der Infektionen symptomlos verlaufen. Adulte Schweinespulwürmer haben eine rosa-gelbliche Farbe und halten sich überwiegend im oberen Dünndarm (Jejunum) auf. Auch bei geringer Anzahl an Würmern können Magen-Darm-Beschwerden wie zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen und auch Durchfall vorkommen. Insbesondere bei infizierten Kindern besteht mit steigender Anzahl an Würmern die Gefahr einer Malnutrition und Malabsorption. Eine besonders hohe Anzahl an Würmern (>100) kann sogar einen akuten Darmverschluss (Ileus) verursachen. Infolgedessen kann es zur ischämiebedingten Darmperforation und Bauchfellentzündung (Peritonitis) kommen, welches lebensgefährlich ist und sofort operiert werden muss (21). Migrieren die Würmer über die Papilla duodeni major in Richtung der Gallenwege oder in Richtung des Ductus pancreaticus, kann es zum Auslösen einer Cholangitis, Cholezystitis oder Pankreatitis sowie in seltenen Fällen auch zur Ausbildung von intrahepatischen Abszessen kommen (22). In der Lunge kann *Ascaris suum* eine vermehrte Schleimproduktion, Bronchospasmus, trockenen Husten sowie ein Druckgefühl hinter dem Brustbein auslösen. Begleitend sind auch asthmaähnliche Anfälle, leichter Fieber, Hautausschläge (Urtikaria) und Gesichtsschwellungen (Angioödem) möglich. Kommt es zur passageren Ausbildung von eosinophilen Infiltraten im Lungenparenchym sowie einer Eosinophilie im Blut spricht man vom Vorliegen eines Löffler-Syndroms (23, 24). Diagnostiziert wird die Ascariasis durch den direkten Nachweis von Wurmeiern oder Würmern in einer Stuhlprobe sowie dem Vorliegen einer Eosinophilie. Therapie der Wahl ist aktuell die Behandlung mit Antihelminthika, insbesondere Mebendazol.

1.3.1 Lebenszyklus

Ascaris suum hat einen einfach gestrickten Lebenszyklus (siehe Abbildung 3). Adulte, geschlechtsreife Weibchen, welche im Dünndarm leben, produzieren bis zu 200000 Eier pro Tag. Diese zunächst nicht-infektiösen Eier werden mit dem Kot ausgeschieden. Im Freien reifen sie zu infektiösen Larven heran. Nach digestiver Aufnahme schlüpfen diese im Darm als Larven im L2-Stadium. L2-Larven graben sich in die Darmschleimhaut ein, durchringen Blutgefäße und erreichen in ca. 6 Stunden über die Pfortader die Leber. In der Leber erfolgt innerhalb weniger Tage die Weiterentwicklung zum L3-Stadium. Nun wandern die L3-Larven über das rechte Herz und die Pulmonalgefäße in die Lunge. Dort brechen die Larven nach etwa 7 Tagen über die Alveolen in die Atemwege ein und erreichen durch Abhusten über die Trachea den Rachenraum. Die Rachenschleimhaut wird gereizt, wodurch wiederum ein Schluckreflex ausgelöst wird. Dies führt zum Verschlucken und somit zur Repassage in den Dünndarm, wo sich die Larven erneut häuten, das adulte, geschlechtsreife Stadium erreichen und Eier produzieren. Der gesamte beschriebene Zyklus dauert etwa sechs bis acht Wochen (25).

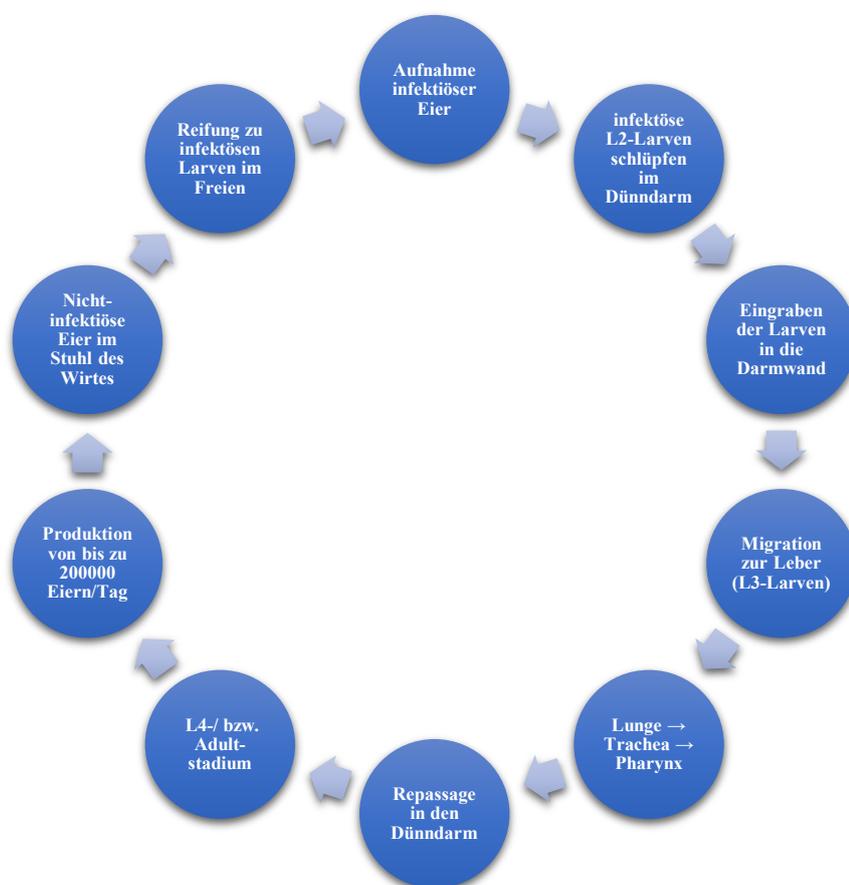


Abbildung 3: Lebenszyklus von *Ascaris suum*

1.3.2 *A. suum* als Modellsystem

Seit Jahrzehnten findet die parasitische Nematode *Ascaris suum* von einer größeren Anzahl an Wissenschaftlern als prototypischer Modellorganismus in biochemischen und neurophysiologischen Studien Verwendung. Gründe hierfür sind vielfältig. Ein bedeutsamer Punkt ist, dass *Ascaris suum* zusammen mit *Ascaris lumbricoides* den häufigsten Darmparasiten weltweit darstellt. Im Schlachthof können aus infizierten Schweinegedärmen sehr leicht große Mengen an Würmern gewonnen werden. Außerdem ist die in-vitro-Kultivierung, Analyse und Handhabung von adulten *A. suum*-Würmern aufgrund ihrer Größe (Weibchen 20-35 cm, Männchen 15-31 cm) unkompliziert. In vielen Studien wird zudem berichtet, dass sogar die in-vitro-Kultivierung von frühen adulten Würmern aus Eiern möglich ist (26–29). Des Weiteren ist zu beachten, dass die Anatomie von *Ascaris suum* sehr gut erforscht ist. Im Jahr 2011 wurde durch Jex et al die Genomsequenz von *A. suum* fertiggestellt. Diese in Datenbanken aufgenommene Genomsequenz kodiert ca. 18500 proteinkodierende Gene und stellt so für viele folgende wissenschaftliche Arbeiten eine relevante umfassende Ressource dar (30).

1.4 Posttranslationale Modifikationen bei Nematoden

Modifikation von Proteinen können Einfluss auf die Funktion, Lokalisation und Interaktion dieser mit anderen Makromolekülen haben (31). Man unterscheidet die prä-, co- und posttranslationale Modifikation. Bei der prätranslationalen Modifikation handelt es sich um die Interaktion der Aminosäure Selenocystein und/oder Pyrrolysin mit Aminosäuren der tRNA. Bei der cotranslationalen Modifikation findet die Modifikation während der Polypeptidsynthese an den Ribosomen statt (32). Die am häufigsten vorkommende posttranslationale Modifikation erfolgt erst nach der Proteinfaltung (31, 33). Hierbei kommt es entweder zur Verknüpfung mit chemischen Gruppen (Glykosyl- oder Phosphorylgruppen), zur Proteolyse (exemplarisch Entfernung von C- bzw. N-terminalen Aminosäuren) oder zur Bildung von Inter- bzw. Intraeptidbindungen (exemplarisch Disulfidbrückenbindung) (34–36).

Bei Nematoden spielen posttranslationale Proteinmodifikationen für den eigenen Stoffwechsel sowie für das Überleben im Wirt eine große Rolle. Die Steuerung lebenswichtiger Vorgänge wie Signaltransduktion, Differenzierung, Entwicklung und

Metabolismus erfolgt über Phosphorylierung/Dephosphorylierung sowie Glykosylierungen (37). Kinasen, Phosphatasen bzw. Glykosyltransferasen oder Glykosidasen sind die Enzyme, die dies ermöglichen (38).

1.4.1 Modifikation durch Glykosylierung

Je nach Bindungsort an der Peptidkette werden Glykosylierungen in O- und N-Glykane unterschieden. Bei den O-Glykanen findet eine Bindung mit der Hydroxylgruppe von Serin und Threonin statt (39, 40). Bei den N-Glykanen hingegen zeigt sich eine Bindung an der Amidgruppe von Asparagin (40). Untersuchungen ergaben, dass Abweichungen in der O-/N-Glykosylierung zu Entwicklungsstörungen führen können (41–44). Stadienspezifische N-Glykosylierungen sowie PC-Substitution dieser N-Glykane sind exemplarisch bekannt für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* (45).

1.4.2 Modifikation mit Phosphorylcholin

Klassischerweise ist Phosphorylcholin als Zwischenprodukt in der Biosynthese von Phosphatidylcholin (auch Lecithin genannt) bekannt, welche wiederum zur Gruppe der Phospholipide gehören und einen wichtigen Bestandteil der Zellmembran von Tieren und Pflanzen darstellen.

Resultate vieler Untersuchungen zeigten jedoch, dass Phosphorylcholin auch als kleines Hapten, welches an Proteine, Glykoproteine und Glykolipide gebunden ist, für eine Vielzahl von immunmodulatorischen Vorgängen beispielsweise bei Parasiteninfektionen verantwortlich ist (siehe hierzu 1.4.4). Sie kann so unter anderem eine langanhaltende Persistenz der Parasiten im Wirt ermöglichen.

In zahlreichen Arbeiten gelang es, in verschiedenen Prokaryonten Phosphorylcholin-Substitutionen an Proteinen und Glykosphingolipiden nachzuweisen. Bei Pneumokokken beispielsweise fungieren diese als Pathogenitätsfaktor auf Zellwand-Polysacchariden (46, 47). *Haemophilus influenzae* hingegen weißen Phosphorylcholin an Zuckern von Lipopolysacchariden auf (48). An Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren grampositiver Bakterien wurden ebenfalls PC-Modifikationen detektiert (49, 50).

Neben Prokaryonten fanden sich auch PC-Modifikationen in zahlreichen Eukaryonten, insbesondere den Helminthen, exemplarisch bei dem Cestoden *Bothriocophalus scorpii* (51) und dem Trematoden *Schistosoma mansoni* (52).

Auch unter den freilebenden und parasitären Nematoden wurden bereits mehrfach PC-Modifikationen an Proteinen, Glykoproteinen und Glykosphingolipiden festgestellt (53–58).

Im Jahr 1987 entdeckte man in adulten *Trichinella spiralis*-Würmern sowie ihren Muskellarven erste PC-Proteine, wobei interessanterweise bei fetalen und neugeborenen Larven keine PC-modifizierte Strukturen auffindbar waren (59, 60). Bei der Filarie *Acanthocheilonema viteae* entdeckte man neben den PC-Substitutionen in Eiern, Uterus und Darm auch das 62 kDa schwere, PC-modifizierte, exkretorisch-sekretorische Protein ES-62 (61). Im Jahre 2006 identifizierten Lochnit et al in der freilebenden Nematode *C. elegans* erstmals das PC-modifizierte Protein Aspartylprotease 6 (ASP-6) (53). Hierbei zeigte sich eine mit fortschreitender Wurmentwicklung verstärkte Expression von ASP-6, wobei das Maximum mit Beginn des adulten Stadiums erreicht wurde (3). Die PC-Bindung erfolgt hier mutmaßlich entweder direkt über die Polypeptidketten oder über eine O-Glykan-Bindung (53). Grabitzki et al gelang in weiterführenden Untersuchungen an *C. elegans* die Identifizierung von 69 PC-substituierten Proteinen (55). Timm et al konnten 2016 in diversen Organen/Geweben wie Zellwand, Darm und Fortpflanzungstrakt von *Ascaris suum* 59 PC-modifizierte Proteine und Glykolipide identifizieren (56). Die meisten unter diesen sind am Energie- und Redox-Metabolismus beteiligt, eine kleine Anzahl wiederum an der Signalweiterleitung und der Proteinsynthese. Somit wird die Relevanz, Funktion und Komplexität der PC-Modifikation anhand der verschiedenen „Funktionsklassen“ eindeutig.

Bei einem Großteil der bisher beschriebenen PC-Epitope erfolgt die Bindung über N-Glykane. Selten zeigen die PC-Epitope auch eine Bindung über O-Glykane oder eine direkte Bindung über die Polypeptidketten.

1993 stellten Harnett et al fest, dass auch bei ES-62 aus *A. viteae* die PC-Modifikation an N-Glykanen stattfindet (54). Weiterführende massenspektrometrische Strukturanalysen führten zum Ergebnis, dass bei ES-62 drei große N-Glykan-Klassen vorhanden sind, von denen nur eine N-Glykan-Klasse eine PC-Substitution aufweist (62).

Letzteres besteht aus fucosylierten oder unfucosylierten Trimannosylkernstrukturen, welche eins bis vier N-Acetylglucosamin-Reste (GlcNAc) tragen kann, an denen wiederum PC-Substitutionen erfolgen. 2002 zeigte Haslam et al, dass eine PC-Substitution auch am C6-Ende von GlcNAc stattfindet (63). Ähnliche PC-haltige N-Glykane wurden auch bei *O. volvulus* und *O. gibsoni* gefunden (siehe Abbildung 4). Im Vergleich ergaben sich bei *A. viteae* und *O. gibsoni* fucosylierte Kernstrukturen und bei *O. volvulus* unfucosylierte Kernstrukturen (64).

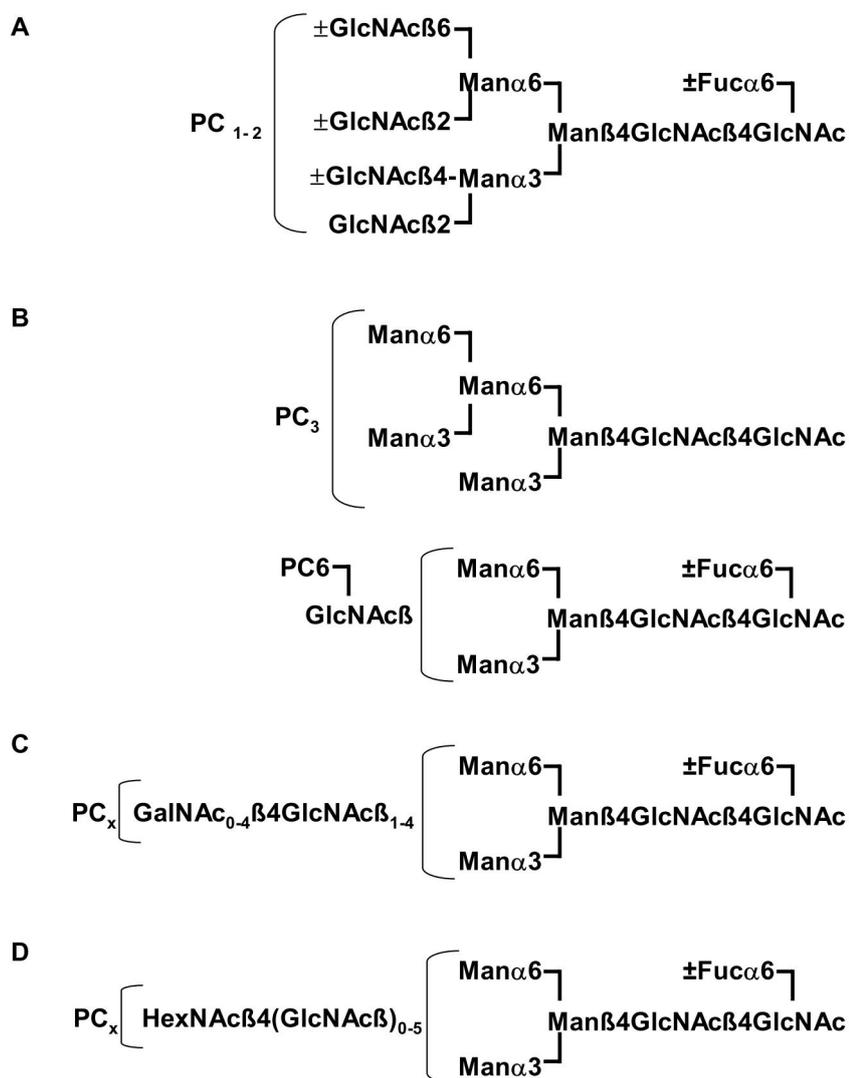


Abbildung 4: Postulierte Struktur für PC-haltige N-Glykane von *A. viteae* (A), *C. elegans* (B), *T. spiralis* (C), *O. gibsoni* und *O. volvulus* (D) (12)

Bei *O. gibsoni* wurden zusätzlich ES-Produkte nachgewiesen, bei denen das PC-Epitop über ein O-Glykan verbunden ist (65).

Neben PC-Konjugationen an Proteinen und Glykoproteinen detektierten Forscher bei mehreren freilebenden und parasitären Nematoden auch PC-modifizierte Glykosphingolipide, welche als phylogenetische Marker betrachtet werden können (53, 58, 66, 67).

Bei *A. suum* fand man neutrale, saure und zwitterionische Glykolipide, wobei die neutralen und zwitterionischen Glykolipide der Arthroserie GlcNAc(β1-3)Man(β1-4)Glc-Ceramid als Kernstruktur haben (68). Die sauren Glykolipide tragen Phosphoinositol- und sulfathaltige Glykosphingolipide. Die zwitterionischen Glykolipide wiederum sind die PC- bzw. Phosphorylethanolamin-substituierten Glykolipide, wobei die PC-Bindung wie bei den N-Glykanen an das C6 des N-Acetylglucosamins (GlcNAc) und die Phosphorylethanolamin-Bindung an das C6 der Mannose erfolgen (58). Wie in Abbildung 5 zu sehen, konnten ähnliche Glykosphingolipide auch in *C. elegans* und *O. volvulus* gefunden werden.

	<i>C. elegans</i>	<i>A. suum</i>	<i>O. volvulus</i>
PC-6 ₁ GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer		+	+
PC-6 ₁ GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer	+	+	+
PC-6 ₁ Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer	+	+	+
PC-6 ₁ Galβ3Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer	+	+	
PC-6 ₁ Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer		+	
PC-6 ₁ Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer			+

Abbildung 5: Vorkommen PC-haltiger Glykosphingolipide der Arthroserie (69)

1.4.3 Biosynthese von Phosphorylcholin

Zum genaueren Verständnis der posttranslationalen Phosphorylcholin-Modifikation wurden u.a. multiple Untersuchungen am exkretorisch-sekretorischen Protein ES-62 von *A. viteae* durchgeführt (70). Exemplarisch konnte mittels Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung von Proteinen, eine PC-Bindung an ES-62 verhindert werden (71, 72). Die Verhinderung einer PC-Modifikation von ES-62 konnte auch durch Einsatz von Brefeldin A (blockiert den Molekültransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat), durch 1-Deoxynorjirimycin (verhindert die Glukosidaseaktivität im endoplasmatischen Retikulum) sowie durch 1-Deoxymannojirimycin (hemmt die Mannosidase I im cis-Golgi) erreicht werden (73). Hemicholinium-3, ein Cholin-Kinase-Inhibitor, stellte sich als weiteres Präparat heraus, welches zur ES-62-Synthese ohne PC-Substitution führt (74).

Ergänzend entdeckten Cipollo et al 2004 durch Untersuchungen an *C. elegans*, dass hier die PC-Übertragung im Golgilumen stattfindet (75). In vitro konnten sie außerdem in Mikrosomen-präparationen von *C. elegans* eine PC-Transferaseaktivität nachweisen, bei der PC von Phosphatidylcholin auf freie N-Glykane übertragen wurde (75). Ein Nachweis darüber, ob dies auch in vivo stattfindet, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu fand man bei Bakterien wie *Haemophilus influenzae* oder *Streptococcus pneumoniae* heraus, dass licD, welches aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien zur Fukutin-Familie gehört, die gesuchte PC-Transferase kodiert (76). Auch beim Menschen kommen Fukutine in zahlreichen Zellen vor. Bei der FCMD (Fukuyama-type congenital muscular dystrophy)-Erkrankung ist die Ursache der Muskeldystrophie eine Mutation dieser Proteine (77). Aravind et al erkannten, dass Fukutine Ähnlichkeiten in der Aminosäurefrequenz mit Phosphoryl-Liganden-Transferasen aufweisen und leiteten hieraus ab, dass es sich bei Fukutin-Proteinen um Glykosyltransferasen handeln muss (78). Harnett et al entdeckten „Fukutin-verwandte“ Gene auch in *C. elegans* (siehe Abbildung 6) und folgerten hieraus, dass es sich bei diesen Proteinen um die gesuchten PC-Transferasen handeln könnte (79).

Fuk_Hs_BAA94082	LLQLAAKTLNKLGVFFWLS	GTCLGWYRQCNIPYSKDVD	LGIFIQDYKSDIILAFQDAG	339
Fuk_Mm_BAB87769	LLQLAAKTLKDLGVFFWLS	GTCLGWYRQCGIIPYSKDVD	LGIFIQDYKPDIIILAFQDAG	339
Fuk_Bm_XP_001900394	NMAEFRDLESYASTPFLFC	GTLGWIYRECSFIKDTTDVD	MAMKITSLDLKMLENMEKSS	240
F28A10.9_Ce_AAK85475	HLAVLRDEMLQFGIYFFLNG	GTLGWIYRECVIIPHITDMD	LAVFSENWNPELEFLWSRQ	316
T07A5.1_Ce_CAA88133	KLAEFRDYLLTFNMFAPLNG	GTLGWIYRECGFIIPHITADID	LAMFAEDFHPEITHTLLSRT	247
T07D3.4_Ce_AAB66184	ELAQLRDELEIFEDMYPFLNG	GTLGWIYRECSVIIPHITDMD	LSVFAEDYNPFIYVELLHSYW	253
T07D3.6_Ce_AAB66186	ELAQLRDELEIFEDMYPFLNG	GTLGWIYRECSVIIPHITDMD	LMYFVEDYNPFSYVELLQRP	282
W02B3.4_Ce_AA64323	VLSRLRDELEINRMFPFLNG	GTLGWIYRECSVIIPHITDMD	ISVFAEDFNLFVVEQMEQNL	252
Y22D7AL.11_Ce_AAK84585	HLAVLRDEMLQFGIYFFLNG	GTLGWIYRECVIIPHITDMD	LAVFSENWNPELEFLWSRQ	316
LicD_Hi_AAX89387	ILDYFHALCERHQIHYSLG	GTLGAIYRECVIIPHITDMD	VYHRAEDYQRFVDFVTFQETH	75
LicD1_Sp_AAD37093	ILDYIDTLCKKHNYINNY	GTLGAIYRECVIIPHITDMD	LSMPREDYQRFINIFQKEKS	75
Consensus/90%	L	G T G R I P D D		

TRENDS in Parasitology

Abbildung 6: Proteine der Fukutin-Familie in *C. elegans* (79)

Die Benennung der Proteine beinhaltet: Gen-Name, Abkürzung für die Gattung, Identifizierungsnummer der Genbank. Abkürzungen für die Gattung: Hs=Homo sapiens (1), Mm= Musculus (2), Bm=*Brugia malayi* (3), Ce=*Caenorhabditis elegans* (4-9), Hi=*Haemophilus influenzae* (10), Sp=*Streptococcus pneumoniae* (11). Innerhalb des roten Kastens befinden sich die Merkmale für die Fukutin-Familie bestehend aus 20 Aminosäuren.

Insgesamt fand man trotz zahlreicher Untersuchungen bis heute keine genaueren Informationen bezüglich des PC-Donors und auch der PC-Transferase bei freilebenden und parasitären Nematoden heraus. Bisherige Erkenntnisse lassen vermuten, dass als PC-Donor Phosphorylcholin (PC), CDP-Cholin und Phosphatidylcholin (Ptd-C) sowie möglicherweise auch Sphingomyelin (SM) in Frage kommen.

Zur Synthese von Phosphatidylcholin, welche auf der zytosolischen Seite des glatten endoplasmatischen Retikulums stattfindet, sind vier verschiedene Wege bekannt (siehe Abbildung 7). Neben dem Kennedy-Stoffwechselweg, über den der größte Anteil an Phosphatidylcholin gebildet wird, sind der Bremer-Greenberg-Weg, der Serindecaboxylierungs- und Phosphoethanolaminmethylierungsweg sowie der Phosphoethanolamin-Methyltransferaseweg bekannt.

Beim Kennedy-Weg kommt es mittels einer Cholin-Kinase zur Übertragung eines von Adenosintriphosphat (ATP) abgetrennten γ -Phosphatrestes auf Cholin. Das so entstehende Phosphorylcholin wird anschließend mit Hilfe der Cholin-Cytidyltransferase zu Cytidindiphosphat-Cholin umgewandelt, indem das Cytidintriphosphat unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes übertragen wird. Im letzten Schritt erfolgt mittels einer Cholin-Phospho-Transferase unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat eine Übertragung von Phosphorylcholin auf Diacylglycerin (DAG), sodass Phosphatidylcholin entsteht (80).

Beim Bremer-Greenberg-Weg bildet sich Phosphatidylcholin über schrittweise Methylierung von Phosphatidylethanolamin, wobei S-Adenosyl-Methionin (SAM)

mehrfach als Methylgruppendonor fungiert. Im ersten Schritt bildet sich Phosphatidylmonomethylethanolamin (Ptd-MeE), im zweiten Schritt Phosphatidyl-dimethylethanolamin (Ptd-Me₂E), welches anschließend im letzten Schritt durch erneute Methylierung zu Phosphatidylcholin umgewandelt wird. Für die Bildung des zu Beginn benötigten Phosphatidylethanolamins sind zwei Wege bekannt. Die erste Möglichkeit ist die Decarboxylierung von Phosphatidylserin. Die zweite Möglichkeit ist die Bildung aus Ethanolamin (Etn). Etn wird hierzu mittels einer Cholin-Kinase durch Übertragung eines γ -Phosphatrestes von ATP zu Phospho-Etn umgewandelt, welches wiederum anschließend mit Hilfe der Cholin-Cytidyltransferase unter Abspaltung eines Pyrophosphatrestes zu CDP-Etn umgewandelt wird. Im letzten Schritt erfolgt unter Hinzugabe von Diacylglycerin und Abspaltung von Cytidinmonophosphat die Bildung des benötigten Phosphatidylethanolamins (81).

Beim Serindecarboxylierungs- und Phosphoethanolaminmethylierungsweg kommt es zunächst durch Decarboxylierung zur Umwandlung von Serin in Ethanolamin und im direkten Anschluss mittels einer Cholin-Kinase durch Übertragung eines γ -Phosphatrestes von ATP zu Phospho-Etn. Analog zum Bremer-Greenberg-Weg erfolgt danach sowohl bei diesem Weg als auch beim vierten und letzten Weg (Phosphoethanolamin-Methyltransferaseweg) eine schrittweise Methylierung mittels zweier Phosphoethanolamin-N-Methyltransferasen (PMT-1 und PMT-2), wobei auch hier S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methylgruppendonor wirkt. Bei RNAi-Experimenten in *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass mittels Inhibition von PMT-1 und PMT-2 das Wachstum und die Entwicklung von *C. elegans*-Larven stark beeinträchtigt bzw. gestoppt werden kann (82).

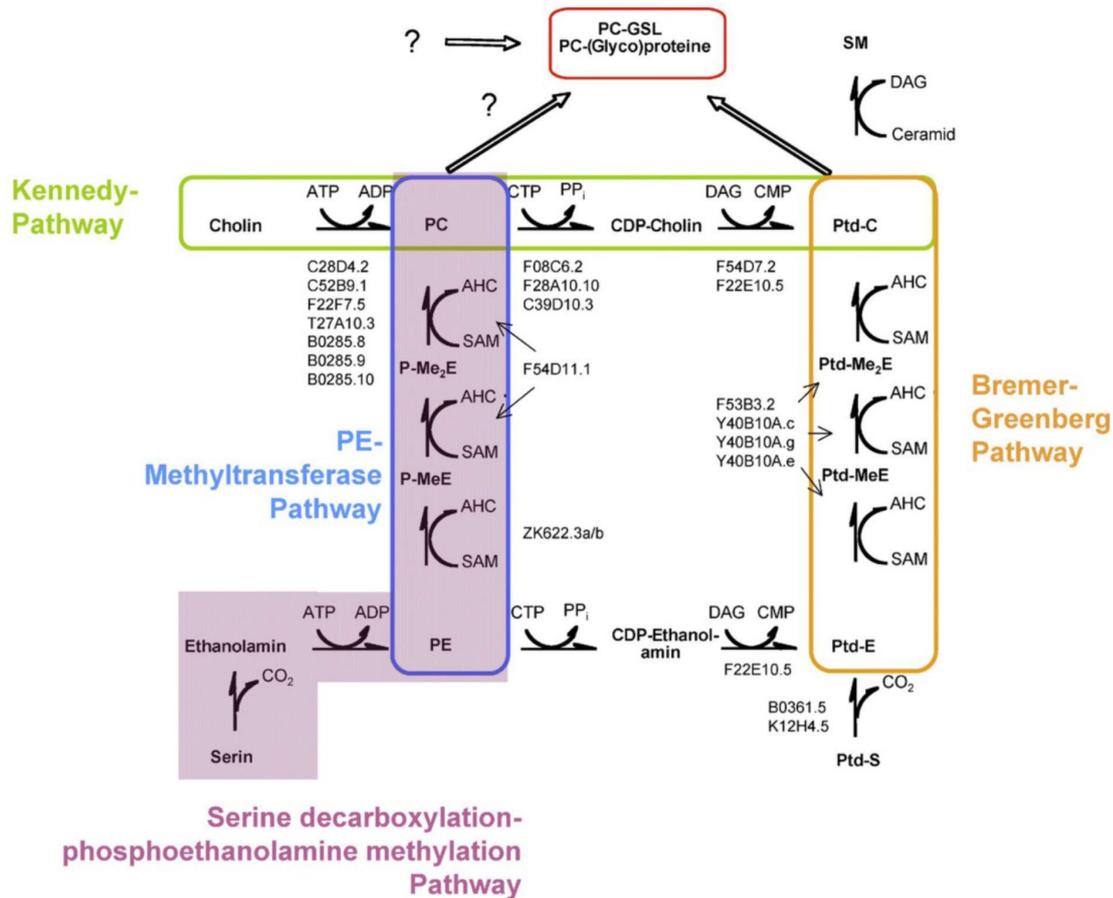


Abbildung 7: Überblick zum Cholin-Metabolismus in Nematoden: Kennedy-, Bremer-Greenberg-, Serindecarboxylierungs-Phosphoethanolaminmethylierungsweg und Phosphoethanolamin-Methyltransferaseweg (83)

PE=Phosphorylethanolamin, P-MeE=Phosphomonomethylethanolamin, P-Me₂E=Phosphodimethylethanolamin, Ptd-S=Phosphatidylserin, Ptd-C=Phosphatidylcholin, PC=Phosphorylcholin, CDP-Choline=Cytidin-5-diphosphat-Cholin

1.4.4 Immunmodulatorische Wirkung von Phosphorylcholin

Im Laufe der Evolution haben parasitäre Nematoden zur Umgehung der wirtseigenen Abwehr verschiedene Mechanismen entwickelt, welches ihnen wiederum Schutz und eine langanhaltende Persistenz ermöglichen. Neben Kutikulaveränderungen und Exprimierung wirtsähnlicher Oberflächenantigene mittels „molekulares mimikry“ werden hierbei immunmodulatorischen Effekten insbesondere durch Phosphorylcholin eine große Bedeutung beigemessen.

Interessanterweise weist Phosphorylcholin konträre Funktionen auf. Während es über eine Bindung mit dem C-reaktiven Protein (CRP) und anschließender Komplementaktivierung sowie Phagozytoseinduktion die wirtseigene Infektabwehr unterstützt, ist es gleichzeitig auch in der Lage durch Inhibition der B- und T-Zellproliferation immunsuppressiv zu wirken.

Dea-Ayuela et al beschrieben 1999 erstmals eine Immunsuppression durch PC-Antigene bei dem Nematoden *T. spiralis* (84). Das derzeit am genauesten untersuchte und charakterisierte PC-modifizierte, exkretorisch-sekretorische Protein mit immunmodulatorischer Wirkung ist das ES-62 aus *A. viteae*. Hier sind neben Immunmodulationen an T-Lymphozyten (85) und B-Lymphozyten (86, 87) auch Effekte auf dendritische Zellen (88), Makrophagen (89) und Mastzellen (90) bekannt geworden. Diese immunmodulatorischen Effekte haben auch einen Einfluss auf die Antikörper- und Zytokin-Konzentrationen (91, 92).

Während hohe ES-62-Konzentrationen eine mitogene Wirkung auf B-Lymphozyten zeigten, sah man in niedrigen ES-62-Konzentrationen, welche für Infektionen typisch sind, eine komplett inhibierende Wirkung auf die B-Lymphozyten-Proliferation (86). Vergleiche zwischen PC-freien und PC-substituierten ES-62 bewiesen, dass dieser Effekt auf die PC-Modifikation zurückzuführen ist (93). Es folgten Vergleiche zwischen PC-substituiertem ES-62 und PC-substituiertem BSA (bovines Serumalbumin) sowie PC-freies BSA. Diese ergaben wider Erwarten für PC-BSA und PC-ES-62 einen identischen inhibierenden Effekt auf die B-Zellproliferation. Außerdem konnte eine Induktion der humoralen Zellen, eine vermehrte Produktion von T-Helferzellen vom Typ 2 im Sinne einer Th2-Immunantwort sowie eine vermehrte Bildung von Antigen-präsentierenden Zellen nachgewiesen werden (93–95). Phosphorylcholin übernimmt hierbei offenbar die Funktion als pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP). Welche molekularen

Mechanismen diese polyklonale Inhibition bzw. Aktivierung der B-Zell-Rezeptor (BCR)-gesteuerten Zellproliferation steuern, ist noch nicht zur Gänze geklärt.

Der BCR setzt sich zusammen aus einer Antigenbindungsdomäne des Oberflächenimmunglobulins (sIg) sowie aus den akzessorischen Signaltransduktionsmolekülen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$, welche wieder eine Immunrezeptor Tyrosin-basierende Aktivationsmotive, sogenannte ITAMs, besitzen (96, 97). Bei Antigenbindung an sIg kommt es zur Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase Lyn, welche wiederum die ITAMs phosphoryliert. Dies leitet die Rekrutierung und Aktivierung des Phospholipase C (PLC)- γ -Signalweges ein. Hierbei hydrolysiert PLC das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), was wiederum zur Aktivierung der klassischen Proteinkinase-C-Isoformen $PKC\alpha$ und $PKC\beta$ führen. Das SH2-containing transforming Protein C1 (Shc) und das B-cell linker Protein (BLNK) fungieren als Adaptermolekül an die phosphorylierten ITAMs des BCR, wodurch es selbst phosphoryliert wird und zur Rekrutierung des growth-factor-receptor-bound protein 2 (Grb2)-son of sevenless (Sos)-Komplexes führt. Grb-2 ist auch ein Adapterprotein, welches zum Guanine-nucleotide-exchange-Faktor Sos bindet und so zur Aktivierung der GTPase Ras führt. Ras startet den Ras-Erk-MAP-Weg (Ras-extrazellulär regulierte Kinase-mitogen aktivierten Proteinkinase-Weg), indem es an die Serin/Threonin-Kinase Raf bindet und aktiviert. Resultat des Ras-Erk-MAP-Weges ist die Aktivierung und nukleäre Translokation der Serin/Threonin-Kinase Erk.

Die proliferationsinhibierende Wirkung von PC-ES-62 ist vielseitig (siehe Abbildung 8). Zum einen führt PC-ES-62 zur Herunterregulierung der Proteinkinase-C-Isoformen wie $PKC\alpha$, zum anderen stimuliert es auch die Aktivierung der Tyrosinphosphatase SHP-1, welches wiederum die ITAMs dephosphoryliert. Dadurch wird die Aktivierung des Shc-Grb2-Sos-Komplexes und somit auch die Einleitung des Ras-Erk-MAP-Weges gehemmt. Zusätzlich sorgt PC-ES-62 durch Rekrutierung des GTPase-Aktivierungs-Proteins (GAP) für eine Terminierung des laufenden Ras-Signals. Des Weiteren weiß man, dass PC-ES-62 zwei weitere MAP-Kinase-Subklassen, und zwar p38 und c-Jun N-terminale Kinase, inhibiert (98). Zuletzt aktiviert PC-ES-62 auch die nukleäre Phosphatase Pac-1, welches das laufende, intranukleäre Erk-Signal hemmt.

Kostimulation mit IL-4 über IL-4-Rezeptoren können mittels partieller Inhibierung der Herunterregulierung von PKC α der B-Zellproliferationsinhibierenden Wirkung von PC-ES-62 entgegenwirken (99).

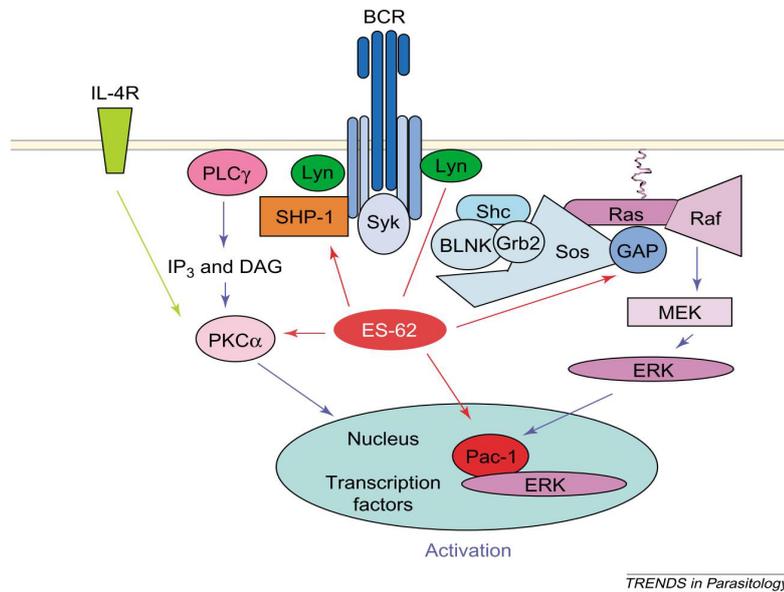


Abbildung 8: B-Zell-Rezeptormodulation durch PC-ES-62 (99)

Das PC-modifizierte ES-62 zeigt auch eine vielseitige, proliferationshemmende Wirkung auf T-Zellen (siehe Abbildung 9). PC-ES-62 stimuliert CTLA-4-exponierende, regulatorische T-Zellen, welche wiederum antigenspaltend wirken und somit eine Suppression der heterologen T-Zellaktivierung erreichen. Ergänzend kann PC-ES-62 auch eine Inhibition der intrazellulären Signaltransduktionswege bewirken. Hiervon sind insbesondere die PKC sowie der MAP-Weg betroffen. Des Weiteren kann PC-ES-62 die IL-10-Produktion durch B1-Zellen anheben, wobei IL-10 wiederum eine hemmende Wirkung auf die Expression costimulierender Moleküle auf dendritischen Zellen hat (99).

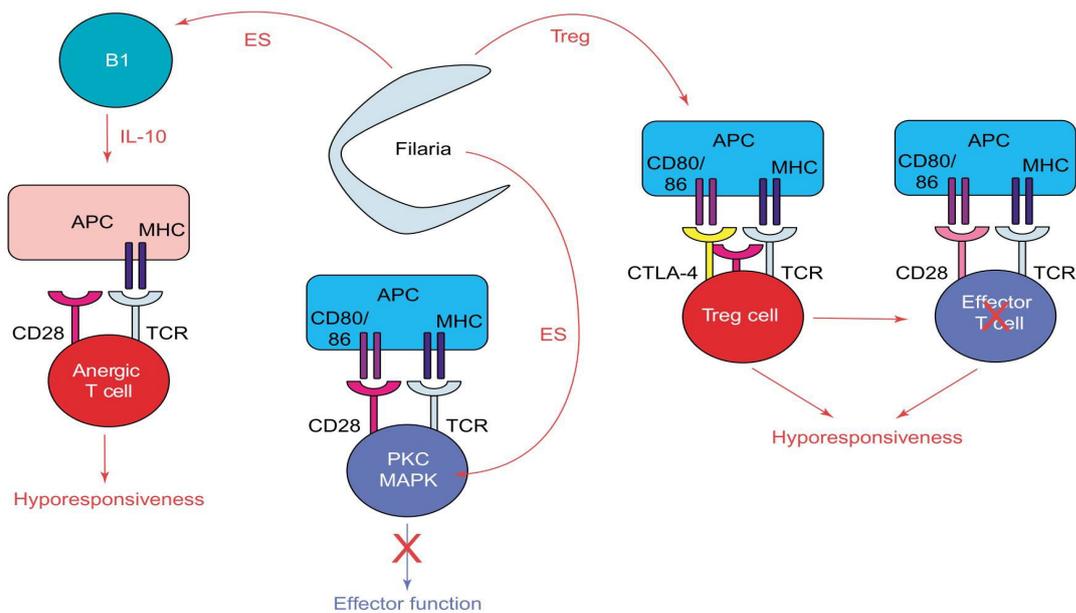


Abbildung 9: Hemmung der T-Zell-Antwort durch PC-ES-62 (99)

PC-ES-62 löst eine TH2-Immunantwort aus (siehe Abbildung 10). Grund hierfür ist die Stimulierung einer vermehrten IL-10-Produktion von B1-Zellen, da IL-10 unter anderem eine inhibierende Wirkung auf $\text{IFN-}\gamma$ hat, welches wiederum für den Antikörperklassenwechsel zu IgG2a im Rahmen einer TH1-Immunantwort essenziell ist. Konsekutiv sieht man das vermehrte Vorkommen von IgG1-Antikörpern (bei Mäusen) bzw. IgG4-Antikörpern (bei Menschen), welche wiederum in Abhängigkeit vom in den TH2-Zellen gebildeten IL-4 erzeugt werden. Schlüsselzytokin der TH1-Immunantwort ist das von Makrophagen gebildete IL-12, welches eine proinflammatorische Aktivierung von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 auf dendritischen Zellen zeigt. PC-ES-62 bewirkt mittels vermehrter IL-10-Produktion eine Hemmung der IL-12-Produktion und damit auch von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 (100).

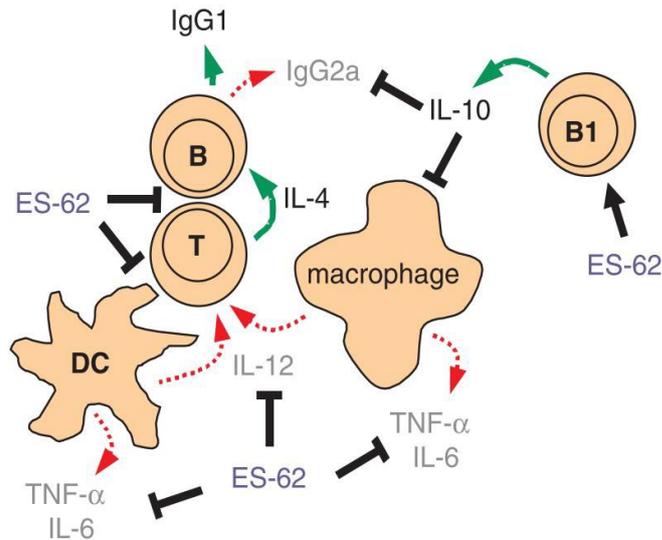


Abbildung 10: Modulation auf zellulärer Ebene durch PC-ES-62 (100)

Weitere Studien zeigen, dass PC-ES-62 auch eine inhibierende Wirkung auf die Mastzelldegranulation hat. Hierzu bindet es zuerst an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR 4), welches eine Caveolae-vermittelte Endozytose des TLR-4/PC-ES-62-Komplexes zur Folge hat. In der perinukleären Zone angekommen kommt es hier zur proteasomunabhängigen Lyse der PKC α , welches normalerweise für die Fc ϵ RI-Rezeptor (Hochaffinitätsrezeptor für die Fc-Region der ϵ schweren Kette von IgE) -vermittelten Signalkaskade zur Mastzelldegranulation notwendig ist. Somit kommt es durch Blockierung der Phospholipase D zur verminderten Bildung von Phosphat Säure, was wiederum dazu führt, dass eine Sphingosinkinase-vermittelte Calciummobilisation und die nukleäre Initiierung des Faktors κ B nicht mehr möglich ist und somit eine Mastzelldegranulation inhibiert wird (90, 101).

1.5 Ziel der Arbeit

Trotz moderner Medizin hat die Anzahl an Nematodeninfektionen insbesondere in den tropischen und subtropischen Entwicklungsländern nicht signifikant abgenommen. Auch heute noch verursachen hier Parasiteninfektionen unter allen Infektionskrankheiten die höchste Morbidität und Mortalität. Sie stellen somit weiterhin ein großes medizinisches Problem dar und sind in diesen Ländern immer noch Haupttodesursache. Gründe hierfür sind multifaktoriell, unter anderem der Mangel an guter Gesundheitsversorgung, die nicht suffiziente Anzahl an sanitären Einrichtungen sowie auch die zum Teil fehlende gesundheitliche Aufklärung der Menschen. Der Hygienestandard in Europa macht Nematodeninfektionen hier zu seltenen Ereignissen. Allerdings ist zu beachten, dass der zunehmende Tourismus auch in weit entfernte Regionen zur progredienten Migration von Nematoden nach Europa führt. Der derzeitigen medizinischen Therapie gelang es bis jetzt nicht, die Infektionskette der Nematoden zu unterbrechen. Hinzu kommt das Problem, dass bereits erste Resistenzen gegen die kleine Anzahl an Antihelminthika entdeckt wurden. Daher ist die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien von parasitären Erkrankungen dringend notwendig. Wichtiges Kennzeichen einer Nematodeninfektion ist die langanhaltende Persistenz im Wirt. Dies wird unter anderem durch immunmodulatorisch wirksame, sezernierte PC-modifizierte Proteine erreicht. Viele Untersuchungen ergaben zudem, dass PC-Modifikationen auch für die Fertilität und Entwicklung von Nematoden essenziell sind. Aktuell sind vier Biosynthesewege von Phosphatidylcholin bekannt (siehe auch 1.4.3). Die Identität der Enzyme, welche für den PC-Transfer auf Proteine, Glykoproteine und Glykosphingolipide verantwortlich sind (PC-Transferase), ist allerdings trotz vieler Untersuchungen weiterhin unbekannt. *Ascaris suum* ist neben *Ascaris lumbricoides* der häufigste Darmparasit weltweit und weist morphologische und funktionelle Ähnlichkeiten zu anderen parasitären sowie freilebenden Nematoden auf. Somit eignet es sich als Modellsystem für parasitäre Nematodeninfektionen. Es wurden bereits erste PC-modifizierte Proteine von *Ascaris suum* nachgewiesen.

Ziel dieser Arbeit war die Proteomanalyse des Sekretoms von *A. suum* im Adultstadium sowie hierbei insbesondere die Bestimmung der PC-modifizierten exkretorisch-sekretorischen Proteine. Die Kenntnis über diese Proteine soll grundlegend in dem langfristigen Vorhaben der Entwicklung von neuen Medikamenten und Impfstoffen gegen Askariasis sowie anderen Nematodeninfektionen weiterhelfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Handschuhe Nitra Tex, Ansell, München

Pipetten: 0,2 – 2 μ l / 1-10 μ l / 10 – 100 μ l / 100 – 1000 μ l, Socorex, Ecublens/Lausanne mit zugehörigen Pipettenspitzen

Papiertücher Kimberley Clark, Roth

Gefriertrockner Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz

Tubes „Cellstar PP-Test tubes, 15 ml und 50 ml, steril“, Greiner

Eppendorf-Röhrchen „Protein LoBind Tube 1,5 ml“, MAGV

Plattenschüttler, MAGV, Rabenau

Universal 32R-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg

Digitale Waage BP 6, Sartorius, Göttingen

Ultraschallbad Elmasonic S40, Elma, Singen

Spektrophotometer DU 640, Beckmann, Krefeld

Reswelling Tray und Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg

Netzgerät: Elektrophoresis Stromversorgung EPS 3501 XL, GE Healthcare, Freiburg

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio Rad, München

Magnetrührer, MAGV

Kühlaggregat, GE Healthcare

Plastikschalen, BioRad

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent RPN 2232 und 2236, GE Healthcare

Saranfolie, Roth

Röntgenfilm 18 x 24 cm „High performance chemiluminescence film“, GE Healthcare

Fotokassette, 19 x 24 cm, GE Healthcare

Entwicklerlösung: Cronex MD-Developer, Agfa

Fixierlösung: Cronex MFE-Developer, Agfa

Spotcutter EXQuest, Bio Rad

großer Gel-Stanzkopf, Durchmesser 3,5 mm

kleiner Gel-Stanzkopf, Durchmesser 2 mm

Membran-Stanzkopf, Durchmesser 1 mm

Digester Hamilton Microlab, Star LET, Hamilton Robotics, München (Martinsried)

mit Pipettenspitzen „Co-RE Tips (300 µl) without filters“, Hamilton

Mikrotiterplatten (Well-Platten), Greiner, Frickenhausen

Lagerplatten, Nerbe Plus, Winsen/Luhe

Ultraflex I TOF/TOF Massenspektrometer, Bruker Daltonik

Edelstahl-Target, Bruker Daltonik

Anchor-Chip, Bruker Daltonik

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien in p.a.-Qualität bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg; Sigma, Taufkirchen). Wasser wurde mit dem Milli-Q-Ultra-pure water system (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *A. suum* in Kulturflaschen

Im örtlichen Schlachthof wurden auf natürlichem Wege mit Schweinespulwürmern (*A. suum*) infizierte Därme von Schweinen gesammelt und an unser Institut geliefert. Hier wurden die Därme unter sterilen Bedingungen aufgeschnitten und die darin enthaltenen adulten Schweinespulwürmer mit zuvor auf ca. 37 ° C aufgewärmter PBS-Lösung mehrfach gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgt die kurzzeitige Inkubation/Zwischenlagerung der Würmer ebenfalls in warmer PBS-Lösung.

In der Zwischenzeit werden 3 Medien hergestellt:

- 1 antibiotikafreies Medium zum Waschen
- 1 antibiotikareiches Medium zur initialen Behandlung/Abtötung der Darmbakterien (2-3 h in dem Brutschrank)
- 1 antibiotikaarmes Medium zur Gewinnung der exkretorisch-sekretorischen Proteine der Schweinespulwürmer (24 h in dem Brutschrank)

1 L des antibiotikafreien Mediums setzt sich zusammen aus:

1 L destilliertem Wasser

1 Flasche RPMI-1640

2 g NaHCO₃

500 ml des antibiotikareichen Mediums setzt sich zusammen aus:

500 ml antibiotikafreies Medium

151 mg Pen. G (1650 U/mg) bei einer Konzentration von 500 U/mg/ml

250 mg Streptomycin (500 µg/ml)

625 µg Amphotericin B (1,25 µg/ml)

hier wurde ca. 1 mg eingewogen und in 1 ml H₂O aufgelöst

161 mg (= 1 mM/1L) Chloramphenicol (323,13 g/mol)

1 L des antibiotikaarmen Mediums setzt sich zusammen aus:

1 L antibiotikafreies Medium

60,6 mg Pen. G (1650 U/mg) bei einer Konzentration von 100 U/mg/ml

100 mg Streptomycin (100 µg/ml)

250 µg Amphotericin B (0,25 µg/ml)

Im nächsten Schritt werden nun die Würmer aus der PBS-Lösung entnommen und zusammen mit einem zuvor hergestellten antibiotikareichen Medium in Zellkulturflaschen überführt. Hierbei werden in je eine Zellkulturflasche 200 ml antibiotikareiches Medium sowie 8 adulte Schweinespulwürmer zusammengeführt. Die Zellkulturflaschen werden anschließend zur Inkubation für 2-3 h in den Brutschrank (37 °C und CO₂-Konz. auf 5 %) gelegt. Danach wird das antibiotikareiche Medium verworfen, die Schweinespulwürmer mit antibiotikafreiem Medium gewaschen und nun mit antibiotikaarmem Medium erneut in die Zellkulturflaschen gelegt. Hierbei werden in je eine Zellkulturflasche 2 adulte Schweinespulwürmer und 50 ml antibiotikaarmes Medium zusammengeführt und für 24 h in den Brutschrank platziert. Nach den 24 h werden die 50 ml antibiotikaarmes Medium mit den darin enthaltenen exkretorisch-sekretorischen Proteinen aus jeder Zellkulturflasche jeweils in 50 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt. Bei Bedarf kann dieser Vorgang 3- bis 4-mal wiederholt werden, bevor die Zellkulturflaschen samt den Würmern entsorgt werden.

2.2.2 Lyophilisation

Ziel der Lyophilisation (=Gefriertrocknung) ist eine schonende Trocknung der exkretorisch-sekretorischen Proteine, welche zuletzt im antibiotikaarmen Medium gelöst bei -20 ° C zwischengelagert wurden. Hierzu werden 10 Falcons mit á 50 ml Probe (insgesamt somit 500 ml) in den Rundkolben der Gefriertrocknungsanlage entleert. Der Rundkolben steht auf einer kühlbaren Stellfläche und wird mit flüssigem Stickstoff unter rotierender Bewegung bei Normaldruck tiefgefroren. Mit Hilfe eines Vakuums wird anschließend durch Erniedrigung des Drucks dafür gesorgt, dass der nun festgefrorene Wasseranteil des Mediums direkt in den gasförmigen Zustand übergeht, ohne zuvor den flüssigen Zustand erreicht zu haben (Prozess der Sublimation, fest → gasförmig). Der

hierdurch entstehende Wasserdampf wird abgesaugt, sodass das Lyophilisat (Pulver) mit den darin enthaltenen exkretorisch-sekretorischen Proteinen zurückbleibt. Das Lyophilisat betrug je nach Versuchsreihe zwischen 3 und 5 g.

2.2.3 Dialyse der Probe im Dialyseschlauch

Ziel der Dialyse ist in erster Linie das Entsalzen der Probe. Das Lyophilisat (3-5 g) wird mit ca. 15 ml destilliertem Wasser in Lösung gebracht. Für diese 15 ml wird ein ca. 18 cm langer zunächst trockener Dialyseschlauch zurechtgeschnitten, welcher in einem Becherglas mit destilliertem Wasser für 15-20 min rehydratisiert wurde. Anschließend erfolgte eine mehrfache Nachspülung ebenfalls mit destilliertem Wasser. Nach dem Spülvorgang wird an ein Ende des Dialyseschlauches eine Klemme angebracht und die in 15 ml destilliertem Wasser gelöste Probe/Lyophilisat in den Dialyseschlauch abgefüllt. Für den adäquaten Gebrauch ist hierbei zu beachten, dass der Schlauch nicht zu prall gefüllt werden darf, da im Rahmen des Dialysevorganges aufgrund der hohen Proteinkonzentration im Dialyseschlauch zusätzlich Wasser eindringen und bei zu knapp bemessener Länge diesen zum Platzen bringen kann. Nun wird auch an das andere Ende eine Klemme angebracht und der Dialyseschlauch in 2 L auf + 4 ° gekühlten PBS-Puffer eingetaucht. Nach Hinzugabe eines Rührfisches erfolgt die Dialyse auf einem Magnetrührer im Kühlraum (bei + 4 °) für ca. 24 h. Innerhalb der 24 h wird der PBS-Puffer nach der Hälfte der Zeit gewechselt.

2.2.4 Acetonfällung und Methanol-Chloroform-Fällung

Das Löslichkeitsverhalten von Proteinen ist abhängig von der Art des Lösungsmittels, d.h. in Gegenwart von Salzen, Säuren oder auch Laugen ändert sich das Löslichkeitsverhalten immens. Diese Eigenschaft von Proteinen wird zum nativen Fällern von Proteinen zunutze gemacht. Hierzu existieren verschiedene Verfahren, unter anderem:

- Fällung mit organischen Lösungsmitteln (Aceton, Methanol, Ethanol, ...)
- Isoelektrische Fällung bzw. das Fällern am isoelektrischen Punkt (IEP)
- Fällung durch Aussalzen oder Co-Präzipitation

Bei dieser Arbeit wurde zur Fällung der Proteine die organischen Lösungsmittel Aceton oder Methanol oder beides verwendet. Die besten Ergebnisse lieferte hierbei eine Kombination der Acetonfällung mit anschließender Methanol-Chloroform-Fällung.

Nach der Dialyse wie in Punkt 2.2.3 beschrieben wird das Endvolumen von 20 ml in 4 x 50 ml Falcons aufgeteilt. Zu jedes dieser vier Falcons wird die 7,5-fache Menge Aceton (-20 °C), d.h. bei jeweils 5 ml Probe jeweils 37,5 ml Aceton dazugegeben. Anschließend werden die Falcons gut geschüttelt und über Nacht bei -20 °C stehen gelassen.

Am nächsten Tag werden die Falcons für 10 Minuten bei -4°C mit max. RCF zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Aceton vorsichtig dekantiert und das übrig gebliebene Pellet mit Aceton (-20 °C) gewaschen- bei 50 ml Falcons erfolgt die Aceton-Waschung mit einem Volumen von 1500 µl. Danach wird die Probe gevortext und für ca. 5-10 min bei -20 °C stehen gelassen. Nun wird die Probe erneut für 10 Minuten bei -4°C mit max. RCF zentrifugiert und das Aceton vorsichtig abpipettiert. Der Waschvorgang wird ein zweites Mal wiederholt. Als letztes erfolgt das Trocknen des Pellets für 15 min im Abzug.

Bei der Methanol-Chloroform-Fällung wurde zunächst einem 100 µl Aliquot 4 Volumeneinheiten (400 µl) Methanol und 1 Volumeneinheit (100 µl) Chloroform dazugegeben und anschließend für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur gevortext. Im nächsten Schritt wurden 3 Volumeneinheiten (300µl) H₂O hinzugefügt, erneut für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur gevortext und anschließend für ca. 5 Minuten bei 20000xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erkennt man eine 3-Phasen-Bildung. Hierbei bildet Methanol/Wasser die obere Phase, das sichtbare weiße Proteinpellet die Interphase und Chloroform die untere Phase. Nun wird die obere Schicht (Methanol/Wasser) vorsichtig entfernt, 3 Volumeneinheiten (300 µl) Methanol hinzugefügt, gevortext und erneut für 5 Minuten bei 20000xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand dekantiert und abpipettiert, sodass nur noch das weiße Proteinpellet zurückbleibt.

2.2.5 Protein Vorbereitung

Das zuvor mittels Acetonfällung präzipitierte und gewaschene sowie ggf. anschließend erneut mittels Methanol-Chloroform-Fällung präzipitierte Proteinpellet wird im Rahmen der Protein Vorbereitung in IEF-Puffer (pH 3-10 NL) bzw. Lysis-Puffer aufgenommen,

gevoertext und im Ultraschallbad 2 mal 5 Minuten lang bei Raumtemperatur gelöst und entgast.

Der IEF-Puffer (pH 3-10 NL) bzw. Lysis-Puffer setzt sich zusammen aus:

2 % IPG-Puffer (pH 3-10 NL) (GE Healthcare)

4 % CHAPS

20 mM Dithiothreitol (GE Healthcare)

20 mM TRIS (Roth, Karlsruhe)

Die einzelnen Bestandteile des IEF-Puffers wurden in 8 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff gelöst, wobei zuvor der Thioharnstoff über Serdolit gereinigt wurde. Als letztes wurde alles auf 40 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Nach erfolgter Lösung des Proteinpellets im Ultraschallbad wurden die Proben zuerst im Thermomixer („HCL“) bei 10° C mit einer Geschwindigkeit von 750 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang geschüttelt und anschließend 30 Minuten lang bei 10 ° C und 20598 x g in der Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppi überführt.

2.2.6 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das 2D-Quant-Kit (GE Healthcare) verwendet.

Hierbei wurden zunächst zur Herstellung des Working Color reagent 100 Teile des Color reagent A mit 1 Teil Color reagent B gemischt. Mittels des 2 mg/ml BSA Standard Solution wurde die Eichreihe nach folgendem Schema hergestellt:

Volumen von 2 mg/ml	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
---------------------	------	------	-------	-------	-------	-------

BSA Standard-Lösung

Proteinmenge	0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg
--------------	------	-------	-------	-------	-------	-------

Danach wurde von der Proteinprobe 2x 20 µl in je ein Eppi gegeben und in den anschließenden Schritten genauso behandelt wie die Eichreihe, d.h.:

Zunächst erfolgte die Hinzugabe von 500 µl Precipitant in jedes Eppi, welche im Anschluss gevortext wurden. Nach 2-3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur Hinzugabe von 500 µl Co-Precipitant in jedes Eppi, welche hierauf erneut gevortext wurden. Im nächsten Schritt wurden die Eppis bei min 10000xg für 5 Minuten zentrifugiert. In jedem Eppi ist das Proteinpellet nun sedimentiert und die Flüssigkeit kann vorsichtig abdekantiert werden. Das Pellet in jedem Eppi wurde nun erneut mit je 100 µl Cooper-Solution und je 400 µl destilliertem Wasser in Lösung gebracht und gevortext. Als letzten Schritt wurde in jedes Eppi noch je 1 ml des zu Beginn vorbereiteten Working Color reagent hinzugegeben, kurz durchmischt und für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Spektrophotometer (Beckmann DU 640) konnte die Absorbance jeder Probe und des Standards bei 480 nm mit Wasser als Referenz abgelesen werden. Mittels der gemessenen Absorbancewerte wurde eine Standardkurve erstellt. Aus dieser Standardkurve wiederum konnte die Proteinkonzentration der Probe abgelesen werden.

2.2.7 Rehydratisieren der IPG-Strips/IPG-Streifen

Es wurden -je nach Bedarf- eins bis zwölf 260 µl Rehydratisierungsgemische vorbereitet. Die Rehydratisierungsgemische setzten sich zusammen aus:

2 µl	Bromphenolblau (zur Laufmittelfontmarkierung)
X µl	in IEF-Puffer/Lysispuffer gelöste Proteinlösung

260 µl – 2 µl – X µl Proteinlösung IEF-Puffer/Lysispuffer

X: über diese Variable kann mittels der zuvor bestimmten Proteinkonzentration festgelegt werden, wie viel µg Protein ein Rehydratisierungsgemisch enthalten soll.

Die Rehydratisierungsgemische mit hoher Proteinmenge wurden zur späteren Proteinidentifikation und Rehydratisierungsgemische mit niedriger Proteinmenge für das Western-Blotting (zur Bestimmung der PC-modifizierten Proteine) verwendet.

Nach Zentrifugation (für 1 Minute bei 20000xg) wurde das Rehydratisierungsgemisch in eine von zwölf Vertiefungen der Rehydratisierungskammer („Reswelling Tray“, GE Healthcare) in 3 bis 4 Portionen gegeben. Anschließend wurden kommerziell erhältliche IPG-Strips (Immobiline Dry Strip, pH 3-10 NL, 13 cm, GE Healthcare) mit der Gelseite

nach unten zeigend in das Gemisch eingetaucht. Durch Auf- und Abbewegungen sowie vorsichtiges Hin- und Hergleiten des Strips wurde eine vollständige und gleichmäßige Benetzung erreicht. Hierbei sollten Luftblasen vermieden werden. Abschließend wurden die Vertiefungen jeweils mit 2 ml DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) überschichtet, um das Auskristallisieren von Harnstoff sowie Austrocknungen zu verhindern. Die Rehydratisierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

2.2.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF)- die erste Dimension der 2-D-Gelelektrophorese

Ziel der Isoelektrischen Fokussierung ist das Auftrennen der einzelnen Proteine mittels elektrischer Spannung. Die hier benutzten IPG-Strips enthalten ein Trägergel, in dem zuvor ein pH-Gradient etabliert wurde. Jedes Protein im Trägergel bewegt sich unter elektrischer Spannung aufgrund seiner Eigenladung zu dem Bereich des Trägergels, dessen pH-Wert seinem spezifischen isoelektrischen Punkt (pI) entspricht.

Nach der Rehydratisierung über Nacht wurden die nun gequollenen IPG-Strips aus der Rehydratisierungskammer entnommen, mit destilliertem Wasser gespült und auf einem fusselfreien Papier (Kimberley Clark, Roth) getrocknet.

Im Multiphor II erfolgte die Durchführung der IEF der IPG-Strips. Diese wurde zunächst mit einer Wasserwaage/Libelle ausgerichtet. Im nächsten Schritt wurde mittels einer Pasteur-Pipette ca. 2-3 ml Cover Fluid auf die Platte der Multiphor verteilt und der Trog so draufgelegt, dass dieser vollständig und gleichmäßig benetzt wurde. Danach wurde der Trog verkabelt und in diesen ca. 8-10 ml Cover Fluid eingefüllt. Nun wurde der Dry Strip Aligner mit der Wanne nach unten zeigend in den Trog eingelegt. Die zwischenzeitlich tockenen, rehydratisierten IPG-Strips wurden in die Wannens des Dry Strip Aligner platziert, und zwar so, dass die Gelseite nach oben und das basische Ende nach vorne zeigten. Als Nächstes wurden 2 in etwa 11 cm messende Elektrodenstrips vorbereitet, welche mit jeweils ca. 1 ml Millipore Wasser angefeuchtet und anschließend mit Filterpapier abgetupft wurden. Die nun feuchten Elektrodenstrips wurden am basischen und sauren Ende jeweils orthogonal zu den eingelegten IPG-Strips positioniert, wobei hierbei etwa die Hälfte des Gelendes berührt wurden. Hierauf wiederum wurden die Elektrodenkammern aufgesteckt und die IPG-Strips mit ca. 80 ml Cover Fluid überschichtet. Mit Hilfe des angeschlossenen Kryostats wurde eine Temperatur von 20 °C

eingestellt. Nach Aufsetzen des Multiphor-Deckels sowie Verkabelung mit dem Spannungsgerät (EPS 3501) wurde folgendes Programm eingestellt:

U/V	I/mA	P/W	t/min
0-100	2	5	300
100-3500	2	5	360
3500	2	5	360

Nach 17 h war die isoelektrische Fokussierung beendet, sodass die IPG-Strips herausgenommen werden konnten und bis zum nächsten Verarbeitungsschritt bei -80 °C zwischengelagert wurden.

2.2.9 Äquilibrierung der IPG-Strips

Im Rahmen der Äquilibrierung der IPG-Strips wird zunächst mittels Dithiotreitol (DTT) das Gel mit den Proteinen reduziert und somit die bestehenden Disulfidbrücken beseitigt. Anschließend werden die hierbei entstehenden Thiolgruppen der Proteine durch Hinzugabe von Iodacetamid (IAA) alkyliert, sodass eine Reoxidation, d.h. die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert wird. Nun werden die äquilibrierten Proteine mit dem Detergens Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) beladen. Mit Hilfe von SDS werden die nichtkovalenten Bindungen der Proteine unterbrochen, hierdurch wiederum die Quartär- und Tertiärstruktur zerstört und schlussendlich eine Entfaltung bzw. Linearisierung erreicht. Außerdem verleiht das SDS den entfalteten Proteinen eine negative Ladung nach außen, sodass während der anschließenden Elektrophorese alle Proteine zum positiven Pol wandern können. Zur Herstellung der DTT- und IAA-Äquilibrierungslösungen wird Äquilibrierungspuffer benötigt.

400 ml Äquilibrationpuffer setzt sich zusammen aus:

Trenngelpuffer	13,4 ml
Harnstoff	144,14 g
Glycerin	138 ml
SDS	16 g
Bromphenolblau	ca. 60 µl Stammlösung

Diese Bestandteile wurde zuvor miteinander vermischt, mit H₂O auf 400 ml aufgefüllt und anschließend bei -20 ° C eingefroren.

Für die Äquilibration eines IPG-Strips wird insgesamt 10 ml Äquilibrationpuffer gebraucht, da 5ml für die Herstellung der DTT-Lösung mit 50 mg Dithiothreitol (DTT) sowie 5 ml für die Herstellung der IAA-Lösung mit 200 mg Iodacetamid (IAA) von Nöten sind.

Nach dem Auftauen des Äquilibrationpuffers sowie Einwiegen des DTT und IAA wurden nach diesem Schema abhängig von der Menge der IPG-Strips DTT- und IAA-Lösungen hergestellt. Die aufgetauten IPG-Strips wurden zuerst 15 Minuten in 5 ml DTT-Lösung und anschließend 15 Minuten in 5 ml IAA-Lösung auf dem Taumler äquilibriert.

2.2.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) - die zweite Dimension der 2-D-Gelelektrophorese

Ziel der SDS-PAGE ist die Auftrennung der äquilibrierten und mit SDS-beladenen Proteine in einer zweiten Dimension nach Größe. Diese Auftrennung nach Größe erfolgt senkrecht zur ersten Dimension (IEF) in einem ebenfalls SDS-haltigen Polyacrylamidgel durch Anlage eines elektrischen Feldes. Hierbei wandern die kleineren Proteine aufgrund des geringeren Widerstandes schneller zur Anode als die großen Proteine. Mit Ankunft der kleinen Proteine am unteren Gelrand, welches durch das mitlaufende Farbstoff Bromphenolblau sichtbar wird, wird die Elektrophorese beendet.

Für die SDS-PAGE wurden 12,5 %-ige Acrylamid-Trenngele nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

	2 Gele	3 Gele	4 Gele
Acrylamidlösung	33,3 ml	50 ml	66,6 ml
4 x Trenngelpuffer (Resolving Gel Puffer)	20,0 ml	30,0 ml	40,0 ml
Destilliertes Wasser	25,4 ml	38,2 ml	50,8 ml
10 % SDS (Zugabe nach Entgasen)	800 µl	1,2 ml	1,6 ml
TEMED (Zugabe nach Entgasen)	26,4 µl	39,6 µl	52,8 µl
10 % Ammoniumpersulfat (Polymerisationsaktivator)	400 µl	600 µl	800 µl
Totales Volumen	80 ml	120 ml	160 ml

Zuerst wird die Acrylamidlösung, das Resolving Gel Puffer sowie das destillierte Wasser miteinander vermischt und im Ultraschallbad 5 Minuten lang entgast. In der Zwischenzeit werden die 10 %-ige SDS-Lösung sowie das TEMED vorbereitet und nach dem Entgasen dazugegeben. Als letztes wird die benötigte Menge Ammoniumpersulfat hinzugefügt (Aktivator der Polymerisation) und die Lösung in das vorbereitete Glasplattensystem eingegossen. Das nun polymerisierende Trenngel wird mit 1-Butanol (oder tert-Amylalkohol) für ca. 30 Minuten überschichtet. Nach den 30 Minuten wird das 1-Butanol ausgeschüttet, das Trenngel mit Gel Storage Puffer überschichtet und mit Alufolie bedeckt. Die vollständige Polymerisierung erfolgt über Nacht im Kühlraum (bei + 4 °C).

Der für die Gelelektrophorese benötigte Elektrodenlaufpuffer (10-fach) setzt sich zusammen aus:

100 ml Elektrodenstammpuffer, zehnfach

10 ml SDS-Lösung

auf 1 Liter mit H₂O auffüllen

Der Elektrodenstammpuffer (zehnfach) wiederum setzt sich zusammen aus:

15 g TRIS

72 g Glycin

auf 500 ml H₂O auffüllen

Nach der Äquilibration der Strips wie bei Punkt 2.2.9. beschrieben erfolgt die Abspülung mit Laufpuffer sowie das Einlegen auf die Oberkante des Trenngels. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Plastikseite des Strips Kontakt zur hinteren Glasplatte hat und die Gelseite des Strips zur vorderen Glasplatte hinzeigt. Die Strips wurden mit Pinzetten vorsichtig entlang des Verlaufs der hinteren Glasplatte nach unten gedrückt, bis Kontakt zwischen dem Strip und dem Trenngel herrschte.

Je nach Bedarf wurden auf einer kleinen Glasplatte pro Strip auf ein Markerplättchen mit den Maßen 5 x 3 mm 5 µl Marker (für die Proteinidentifikation: Dual Color, Precision Protein Standard, BioRad; für das Western-Blotting: Prestained) pipettiert und anschließend mit 10 µl zuvor aufgekochter Agaroselösung fixiert.

Herstellung der Agaroselösung:

Zur Herstellung der Agaroselösung wird 0,5 % Agarose (NA, Pharmacia) in Elektrophoreselaufpuffer langsam aufgeköcht (bis knapp unter den Siedepunkt). Anschließend erfolgt das Vermischen mit 2-3 Körnchen Bromphenolblau (Serva).

Das Markerplättchen wird in unmittelbarer Nachbarschaft zum sauren Stripende auf das Trenngel platziert und zur Fixierung des Strips und des Markerplättchen Agaroselösung hinzugegeben. Durch Abkühlen bildet sich hier ein Gel der Agarose.

Nun wird das Glasplattensystem mit dem Trenngel und dem Strip in die Pufferkammer gestellt. Die untere und die obere Pufferkammer wird mit Laufpuffer aufgefüllt (insgesamt ca. 2 L).

Nach Aufsetzen des Deckels sowie Verkabelung mit dem Spannungsgerät wurde folgendes Programm eingestellt:

Voreinstellung: 600 V, 50 W

Schritt 1: 15 mA pro Gel (15 min), d.h.

15 mA für 1 Gel (15 min)

30 mA für 2 Gele (15 min)

60 mA für 4 Gele (15 min)

Schritt 2: 110 mA für 1-4 Gele

Ca. 83 min für 1 Gel

Ca. 163 min für 2 Gele

Ca. 325 min für 4 Gele

2.2.11 Western Blot

Ziel des Western Blots ist es, die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung in Puffertanks (Tank-Blot-Verfahren) oder im Halbtrockenen über puffergesättigte Filterpapiere (Semi-dry-Blot-Verfahren) auf eine Trägermembran (Nitrocellulose oder Polyvinylidendifluorid- kurz PVDF-) zu übertragen und anschließend durch Immunodetektion spezifische Proteinbanden zu detektieren.

Hier wurde für den Transfer der 2-D-gelelektrophoretisch aufgetrennten exkretorisch-sekretorischen Proteine des adulten *A. suum* das Semi-Dry-Blot-Verfahren mittels des Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) sowie als Trägermembran Hybond P 0,45 µm PVDF-Membrane (GE Healthcare) verwendet. Im Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell können maximal 2 Blots gleichzeitig durchgeführt werden. Für 1 Blot werden 4 Filterpapiere entsprechender Größe benötigt. Für das Herstellen des benötigten Puffers wurde 10-fach Semi-Dry-Puffer in 10 Prozent Methanol sowie deionisiertes H₂O in einem Verhältnis von 1 zu 10 verdünnt.

Herstellung des Semi-Dry-Puffers (10-fach):

TRIS	48 mmol/l	5,81 g
Glycin	32mM	2,93 g
SDS	0,0375 %	0,375 g
Methanol	20 %	200 ml

auf 1 L mit H₂O auffüllen.

Zunächst wurde die PVDF-Membran zur Aktivierung unter dem Abzug für 3-5 Sekunden in Methanol inkubiert und anschließend 2-5-mal mit deionisiertem H₂O gewaschen. Danach wurde es zusammen mit den benötigten 4 Filterpapieren für 30 Minuten auf dem „Schaukler“ in 500 ml nach dem oben angegebenen Verdünnungsschema verdünntem Semi-Dry-Puffer äquilibriert. In gleicher Weise wurde das Gel in 200 ml verdünntem Semi-Dry-Puffer für 30 Minuten auf dem „Schaukler“ äquilibriert.

Das „Sandwich“ im Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell wurde wie folgt aufgebaut:

- 2 puffergesättigte Filterpapiere
- PVDF-Membran
- Gel
- 2 puffergesättigte Filterpapiere

Nach Aufsetzen des Deckels sowie Verkabelung mit dem Spannungsgerät wurde folgendes Programm eingestellt:

Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Leistung [W]	Zeit [min]
25	0,8 mA/cm ²	20	90

Nach dem Blotten wurden die verbliebenen freien Stellen für eine Proteinbindung auf der PVDF-Membran mit dem chemischen Polymer Roti-Block blockiert. Hierzu wurde die Blotfolie in 200 ml 10-fach verdünntem Roti-Block (Roth) für mindestens 1 Stunde oder über Nacht bei 4 ° C inkubiert.

Zur spezifischen Detektion der PC-modifizierten exkretorisch-sekretorischen Proteine wurde als Erstantikörper das kommerziell erwerbliche TEPC-15 (Mouse-IgA, Sigma) verwendet. Zunächst wurde dieser in 10 ml Roti-Block in einem Verhältnis von 1:5000 verdünnt. Anschließend erfolgte hiermit die Inkubation des Blots in einem rollenden

Glasrohr über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wird die Blotfolie einmal mit deionisiertem H₂O abgespült und anschließend 5-mal jeweils 3 Minuten mit ca. 150 bis 200 ml PBS-Tween in Schalen gewaschen.

Herstellung von 1 L PBS-Tween:

100 ml 10-faches PBS

900 ml deionisiertes H₂O

0,5 ml Tween (0,05 %ig)

Herstellung von 1 L PBS-10-fach:

80 g NaCl

2 g KCl

14 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

2 g KH₂PO₄

auf 1 L mit deionisiertem H₂O auffüllen.

Als Zweitantikörper kam das kommerziell erwerbliche Dako 0260 (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin konjugiert mit Horse raddish peroxidase -kurz HRP-, Dako) zum Einsatz. Dieser wurde in 10 ml Roti-Block in einem Verhältnis von 1:3000 verdünnt. Anschließend erfolgte hiermit die Inkubation des Blots in einem rollenden Glasrohr für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wird erneut die Blotfolie mit deionisiertem H₂O abgespült und 5-mal 3 Minuten lang mit ca. 150 bis 200 ml PBS-Tween in Schalen gewaschen.

Zum Visualisieren der PC-modifizierten Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL) wurde das Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) verwendet.

3 ml Solution A (Luminol solution) und 3 ml Solution B (Peroxide Solution) wurden gemischt und auf die Blotfolie gegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Membran über die Kante abgetropft, in die Saranfolie (Roth) gelegt und mit Klebeband in der Filmkassette fixiert. Nun wird das Licht ausgeschaltet und der Film (Kodak, X-Omat AR Film, XAR-5; 24 x30 cm; Sigma) in die Kassette bzw. auf die Blotfolie platziert. Nach einer Expositionszeit von 30 Sekunden bis 5 Minuten wurde der Film für

60 Sekunden in die Entwicklerlösung (Cronex MD-Developer, Agfa, Dübendorf), dann für 30 Sekunden in H₂O und anschließend für 60 Sekunden in die Fixierlösung (Cronex MFE Developer, Agfa, Dübendorf) getaucht. Als letztes wird erneut mit Leitungswasser und/oder deionisiertem Wasser abgespült und der Film zum Trocknen aufgehängt.

2.2.12 Flamingo-Fluoreszenzfärbung

Zunächst werden die Fixier- und Färbelösungen nach folgendem Schema hergestellt:

Fixierlösung:

40 % Ethanol, unvergällt

10 % Essigsäure

50 % deionisiertes H₂O

Färbelösung:

1 Teil Flamingo Fluoreszenz-Färbelösung (BioRad)

9 Teile deionisiertes H₂O

Nun wurde das Gel in 500 ml Fixierlösung für mindestens 2 Stunden und maximal 24 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte das Färben für mindestens 3 Stunden mit der Färbelösung. Für 1 Gel wurden hierbei 250 ml, für 2 Gele 300 ml und für 4 Gele 400 ml Färbelösung verwendet.

Nach dem Färben wurde das Gel in H₂O gelegt und mittels des Scanners Typhoon 9200 (GE Healthcare) bei einer Auflösung von 100 µm gescannt. Hierbei wurde eine Anregung von 532 nm und eine Emissionswellenlänge von 555 nm eingestellt.

2.2.13 Spot-Gewinnung mit dem Spot Cutter

Mittels des Spot Cutters wurden die detektierten Proteinspots auf dem Gel oder auf der PVDF-Membran in einem automatisierten Prozess ausgestochen. Für das Ausstechen der Proteinspots aus Gelen wurde ein Stanzkopf mit einem Durchmesser von 3,5 mm verwendet. Spots aus Membranen hingegen wurden mit Hilfe eines Stanzkopfs mit 1 mm Durchmesser ausgestochen. Die Steuerung und Kalibrierung des Spot Cutters erfolgte

über die Software „PD Quest Advance 8.0.1.“. Es wurde darauf geachtet, dass sowohl das Gel als auch die PVDF-Membran während des Ausstechvorgangs nass bleiben.

Nach dem Ausstanzen wurden die einzelnen Spots zusammen mit jeweils 70 µl H₂O (für Gel-Spots) bzw. 70 µl DB71-Verdünnungslösung (für Membran-Spots) in Well-Platten transferiert.

2.2.14 Automatisierter In-Gel-Verdau

Aufgrund der hohen Spotanzahl wurde auf einen manuellen In-Situ-Verdau verzichtet. Die ausgestanzten Gelstücke wurden stattdessen mit Hilfe des Verdauroboters „Microlab Starlet“ der Firma Hamilton nach zuvor festgelegtem Verdauprotokoll (nach Bruker) automatisiert verdaut. Die Steuerung des Verdauroboters erfolgte über die Software „Hamilton Method Editor 4.0.“ bzw. „Hamilton Run Control 4.0.“.

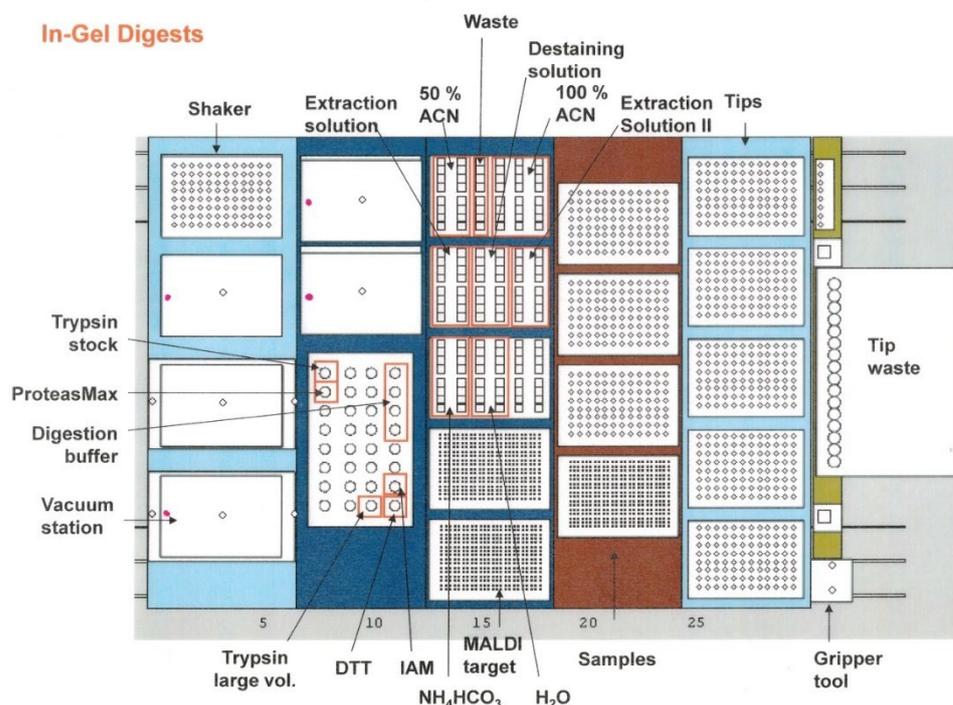


Abbildung 11: Schematischer Aufbau des Verdauroboters (In-Gel-Verdau)

Der Verdauroboter hat mehrere temperierbare Plätze (für Verdaupuffer, das Trypsin, ProteaseMAX, PVP, DTT und IAM, Entfärbelösung, Extraktionslösung sowie H₂O). Zudem besitzt es 4 Pipettierkanäle, einen Abfallbehälter für benutzte Pipettenspitzen, einen Plattenschüttler sowie eine Vakuumstation. Die auszuführenden Arbeitsschritte lassen sich über den Computer steuern. Der Verdauroboter ist neben dem automatisierten Verdau inklusiver Extraktion bei Bedarf auch in der Lage ein Stahl-Target oder einen Anchor-Chip mit Matrix bzw. mit Probe für die MS-Analyse zu beschichten.

Der automatisierte In-Gel-Verdau lief nach folgendem Schema ab:

Stufe	Beschreibung	Volumen [μ l]	Zeit [min]	Temperatur[$^{\circ}$ C]	Zyklen
1	Waschen mit 50 % ACN	150	10	21	1
2	Dehydratisieren mit 100 % ACN	150	2	21	1
3	Reswellen mit NH ₄ HCO ₃ (50 mM)	150	5	21	1
4	Dehydratisieren mit 100 % ACN	150	2	21	1
5	Hinzugabe von Trypsin	17	0,1	21	1
6	Verdau		120	45	1
7	Hinzugabe der Extraktionslösung	15	30	21	1

Tabelle 1: In-Gel-Verdau-Protokoll

Die Proben wurden mithilfe eines integrierten Plattenschüttlers geschüttelt.

Herstellung der 50 mM NH₄HCO₃-Lösung:

5 ml ACN

2,5 ml 1 M NH₄HCO₃-Lösung

mit H₂O auf 50 ml aufgießen

Herstellung der 25 mM NH₄HCO₃-Lösung:

2 ml ACN

0,5 ml 1 M NH₄HCO₃-Lösung

Mit H₂O auf 20 ml aufgießen

fakultativ 20 mg Octylglycosid

Herstellung des 1:1 Gemisches aus ACN und 25 mM NH_4HCO_3 (bzw. 50 % ACN-Lösung):

Je nach benötigter Menge, exemplarisch für 60 ml 50 % ACN-Lösung:

30 ml 25 mM NH_4HCO_3

30 ml ACN

Herstellung der Extraktionslösung (1 % TFA, fakultativ 0,1 % Octylglycosid):

20 ml H_2O

200 μl TFA

fakultativ 20 mg Octylglycosid

Herstellung der Trypsinlösung:

Als Verdauungsenzym wurde das kommerziell erwerbliche Trypsin Gold (Mass Spectrometry Grade von Promega) verwendet. Dieser lag als Lyophilisat in Vials zu je 100 μg vor. Im Vial wurde das Lyophilisat in 100 μl 0,01 % TFA (5 μl TFA/50 ml H_2O) gelöst. Hiervon wiederum wurden 10 μl abgenommen und zusammen mit 90 μl 25 mM NH_4HCO_3 -Verdaupuffer ohne Octylglycosid in einem Eppendorf-Gefäß gemischt.

Je nach Probenmenge wurde hieraus die berechnete Menge in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und im Verdauroboter an der dafür vorgesehenen Stelle platziert.

Auch der Verdauroboter verdünnt die Trypsinlösung kurz vor dem Verdau durch Hinzugabe von 25 mM NH_4HCO_3 -Verdaupuffer (mit bzw. ohne Octylglycosid) und zwar auf eine Konzentration von 10 ng/ μl . Diese Endlösung wird nun entsprechend der im Verdauprotokoll angegebene Menge auf die zu verdauenden Proben pipettiert.

Das Trypsin spaltet Peptidbindungen des zu analysierenden Proteins C-terminal zu Lysin und Arginin.

ProteaseMAX Surfactant:

Das kommerziell erwerbliche ProteaseMAX Surfactant (Promega) ist ein Detergens, welches als Trypsin Enhancer den Verdau durch Trypsin katalysiert. Auch dieser lag als Lyophilisat in Vials vor und wurde in 100 μl 50 mM NH_4HCO_3 Puffer gelöst. Entsprechend der im Verdauprotokoll angegebenen Menge wird diese ProteaseMAX-

Lösung in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und im Verdauroboter an der dafür vorgesehenen Stelle platziert. Die Mischung mit der Trypsinendlösung erfolgt in einem Verhältnis von 1:40. Vorteil des ProteaseMAX ist, dass sie die spätere Massenspektrometrie nicht stört, da es durch die Hinzugabe der Extraktionslösung (1 % TFA) zusammen mit dem Trypsin inaktiviert wird.

2.2.15 Automatisierter On-membrane-Verdau

Aufgrund der hohen Spotanzahl wurde auch hier auf einen manuellen In-Situ-Verdau verzichtet und die ausgestanzten Membranstücke stattdessen mit Hilfe des Verdauroboters „Microlab Starlet“ der Firma Hamilton nach zuvor festgelegtem Verdauprotokoll (nach Bruker) automatisiert verdaut.

Schematischer Aufbau des Verdauroboters (On-membrane-Verdau)

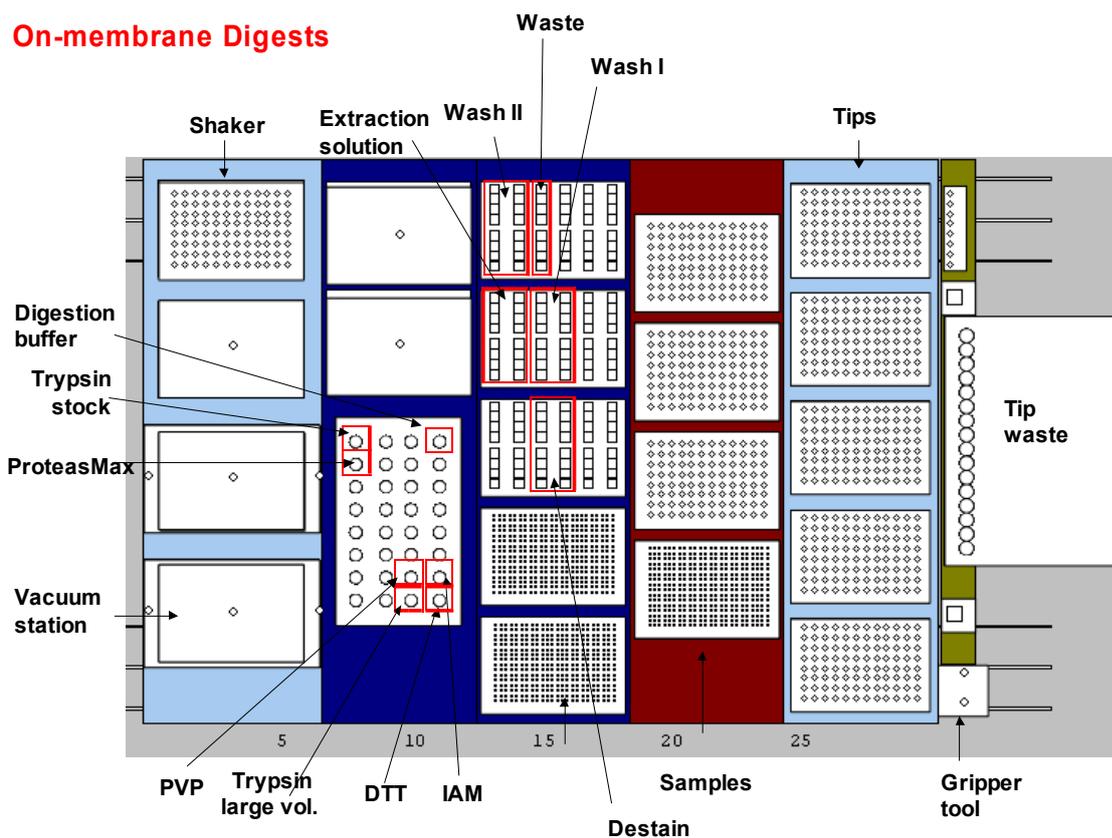


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Verdauroboters (On-Membrane-Verdau)

Der Verdauroboter hat mehrere temperierbare Plätze (für Verdaupuffer, das Trypsin, Protease-MAX, PVP, DTT und IAM, Entfärbelösung, Extraktionslösung sowie H₂O). Zudem besitzt es 4 Pipettierkanäle, einen Abfallbehälter für benutzte Pipettenspitzen, einen Plattenschüttler sowie eine Vakuumstation. Die auszuführenden Arbeitsschritte lassen sich über den Computer steuern. Der Verdauroboter ist neben dem automatisierten Verdau inklusiver Extraktion bei Bedarf auch in der Lage ein Stahl-Target oder einen Anchor-Chip mit Matrix bzw. mit Probe für die MS-Analyse zu beschichten.

Der automatisierte On-Membrane-Verdau lief nach folgendem Schema ab:

Stufe	Beschreibung	Volumen [μl]	Zeit [min]	Temperatur[°C]	Zyklen
1	Flüssigkeit entfernen	200		21	1
2	Waschen mit NH ₄ HCO ₃ /10%ACN	100	6	21	9
3	Hinzugabe von PVP	20	5	21	1
4	Waschen mit NH ₄ HCO ₃ /10%ACN	150	2	21	1
5	Hinzugabe von Trypsin	17	15	8	1
6	Verdau		480	37	1
7	Hinzugabe der Extraktionslösung	30	30	21	1

Tabelle 2: On-Membrane-Verdau-Protokoll

Die Proben wurden mithilfe eines integrierten Plattenschüttlers geschüttelt.

Herstellung des 10 % ACN-25 mM NH₄HCO₃-Gemisches:

Je nach benötigter Menge, exemplarisch für 80 ml:

72 ml 25 mM NH₄HCO₃

8 ml ACN

Herstellung der PVP-Lösung (0,25 % PVP, 0,1 % Essigsäure):

10 ml H₂O

10 μl Essigsäure

25 mg PVP

2.2.16 Aufreinigung über ZipTip C18 (Millipore)

Ziel der Aufreinigung über Zip Tip C18 ist die Erhöhung der Peptidkonzentration. Dies wird dadurch ermöglicht, dass an den hydrophoben C18-Säulen nur hydrophobe Substanzen binden, allerdings Störfaktoren wie Salze etc. nicht.

Es werden 2 Puffer vorbereitet:

Waschlösung (0,1 % TFA) - z.B. für 10 ml:

10 μ l TFA

10 ml H₂O

Elutionslösung (0,1 % TFA, 60 % ACN) -z.B. für 10 ml:

6 ml ACN

4 ml H₂O

10 μ l TFA

Die Methode erfolgt nach folgendem Schema:

Vorbereitung der Zip Tips: Tip 1 x mit 5 μ l Elutionslösung waschen
(Aktivierung der C18-Säule)

Tip 4 x mit 5 μ l Waschlösung waschen

Bindung mit Peptiden: 10-15 x je 5 μ l Probe (in der 384-er Well-Platte) aufziehen
und wieder ausdrücken. Sollte das Probenmaterial in der
Wellplatte eingetrocknet sein, dieses zuvor mit 0,1 % TFA
(20 μ l) aufnehmen.

Waschen der Tips: Tip 5 x mit 5 μ l Waschlösung (0,1 % TFA) waschen- hierzu
Tubes mit 30 μ l Waschlösung für jede Probe vorbereiten

Elution: 3 μ l Elutionslösung auf das Target vorlegen. Zip Tip durch
3 x Aufsaugen und Ausdrücken eluieren.

Zu jeder Probe wurde 1 μ l Matrixlösung (2,5-Dihydroxbenzoesäure (Sigma) in 50 %
ACN und 1 % Phosphorsäure) dazugegeben (Cokristallisation) und durch 3 x Aufsaugen
und Ausdrücken mit der Probe vermischt und an der Luft trocknen gelassen.

2.2.17 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Nachdem die ES-Proteine mittels des tryptischen Verdaus in ihre Peptide zerlegt und mittels der ZipTip-C18-Aufreinigung Störfaktoren eliminiert wurden, wird nun mithilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie die Masse der Peptide bestimmt. Hierfür wurde der Ultraflex I TOF/TOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) mit Stickstofflaser und LIFT-MS/MS-Einheit benutzt. Bei der Messung wurde ein positiver Reflektormodus angewendet. Das Stahltarget mit den aufgetragenen und luftgetrockneten Proben („Dried droplet“-Präparation) wird zur Analyse eingelegt. Der Stickstofflaser (Laserwellenlänge 377 nm) überführt die Probe zum einen durch kurze hochenergetische Laserpulse in die Gasphase (Desorption), zum anderen sorgt sie aber auch für eine Protonenübertragung von Matrixmolekülen auf die zu analysierenden Peptide, sodass sich Peptidionen bilden. Die erzeugten Peptidionen werden anschließend im elektrischen Feld beschleunigt bis alle Peptidionen eine nahezu identische kinetische Energie aufweisen. Die beschleunigten Peptidionen fliegen nun im feldfreien Analysator zum Detektor und trennen sich nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis). Die Peptidmasse bzw. das m/z -Verhältnis der Peptidionen wird vom Detektor mithilfe der gemessenen Flugzeit bestimmt („Time of flight“- bzw. TOF-Massenspektrometrie). Je länger die Flugzeit ist, desto größer ist das Masse/Ladungs-Verhältnis der Peptidionen. Der Massenspektrometer wurde zuvor mit einem Peptid-(Kalibrierungs)-Standard (~ 1000-4000 Da) von Bruker Daltonik kalibriert. Bei den Messungen wurden 200-400 Einzelspektren addiert, um sie anschließend mit dem Programm Compass 1.1. Software (basierend auf den Programmen FlexAnalysis 2.4. und BioTools 3.0., Bruker) auszuwerten. Die endgültige Proteinidentifizierung erfolgte mithilfe der Mascot Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) und der „Asuum fasta“ sowie „ES Nematoden“ Datenbank, indem gemessene Molekulargewichte der Peptide mit theoretischen Massen aus Datenbanken verglichen wurden. Bei der Suche wurde als Taxonomie *A. suum* mit einer Massentoleranz von 75 ppm gewählt. Außerdem wurde die Carbamidomethylierung von Cystein als globale Modifikation sowie die Oxidation von Methionin als variable Modifikation eingestellt. Betrug der sogenannte Mowse-Score über 58, galt das Protein als identifiziert. Weitere Eigenschaften (isoelektrischer Punkt, Lokalisation und Funktion der Proteine) wurden mittels Wormbase (<http://www.wormbase.org>) und Uniprot (<http://www.uniprot.org>) ermittelt.

3 Ergebnisse

Zum Darmparasiten *Ascaris suum* und vielen anderen Nematoden erfolgten bislang zahlreiche Studien. Gründe hierfür sind u.a. das häufige Vorkommen, die über Jahrtausende fortdauernde Präsenz, der große wirtschaftliche Schaden sowie die zum Teil gravierende Auswirkung auf die Gesundheit des befallenen Wirts. Das große Ziel dieser Studien ist es zum einen den Aufbau, die Funktionsweise sowie die Überlebensstrategien der Nematoden im Wirt zu erkennen und zu verstehen, zum anderen aber auch die Entwicklung von neuen medizinischen Arzneimitteln. Diese neuen Medikamente sollen die Infektionskette endgültig unterbrechen sowie eine bessere, nebenwirkungsärmere Behandlung des befallenen Wirtes ermöglichen. Eine von vielen derzeit erworbenen Erkenntnissen war die Tatsache, dass das Epitop Phosphorylcholin nicht nur von besonderer Relevanz für die Fertilität der adulten Würmer und die Entwicklung der Larven ist, sondern auch immunmodulatorische Eigenschaften vorweist.

Zuletzt analysierten 2016 Timm et al das PCom von *Ascaris suum* und identifizierten hierbei 59 PC-modifizierte Proteine in verschiedenen Organbestandteilen des Darmparasiten (56). 2013 wiederum erfolgten durch Wang et al erste proteomische Analysen der exkretorisch-sekretorischen Proteine von Larvenstadien des Parasiten *Ascaris suum* (25).

Der erste Bestandteil meiner Arbeit beschäftigte sich mit der Identifikation der exkretorisch-sekretorischen Proteine von adulten *A. suum*-Würmern.

Hierzu wurden zunächst die adulten Schweinspulwürmer, welche aus uns geliefert, infizierten Schweinegedärmen gewonnen werden konnten, im Brutschrank kultiviert. Im nächsten Schritt erfolgte die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der sezernierten Proteine, die 2D-Gelelektrophorese sowie die Färbung zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine. Diese farblich markierten Proteinspots wurden ausgeschnitten, proteolytisch verdaut und anschließend einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Im letzten Schritt erreichte man das Ziel der Proteinidentifikation mittels MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprint und MASCOT Datenbankanalysen.

Der zweite Bestandteil meiner Arbeit beschäftigte sich mit der Bestimmung bzw. Identifikation der PC-modifizierten exkretorisch-sekretorischen Proteine von adulten *A. suum*-Würmern.

Im Unterschied zum ersten Teil meiner Arbeit wurden hierzu die 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennten exkretorisch-sekretorischen Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung im Semi-dry-Blot-Verfahren auf eine Trägermembran (Polyvinylidendifluorid- kurz PVDF-) übertragen und anschließend durch Immunodetektion mittels des PC-spezifischen monoklonalen Antikörpers TEPC-15 sowie dem ECL-Verfahren die Proteine detektiert und visualisiert, welche eine PC-Modifikation aufweisen. Als Gegenkontrolle erfolgte zusätzlich die Färbung der PVDF-Membran, welches eine einfachere visuelle Zuordnung der PC-modifizierten Proteine ermöglichte. Außerdem wurden die zugeordneten Proteinspots auf der PVDF-Membran einem proteolytischen Verdau und anschließender massenspektrometrischer Analyse unterzogen, welche wiederum -wie erwartet- die Identifikation der bereits visuell zugeordneten Proteine ergab.

Insgesamt wurden 354 exkretorisch-sekretorische Proteine sowie unter denen 53 PC-modifizierte Proteine (15 %) identifiziert (siehe Abbildung 13).

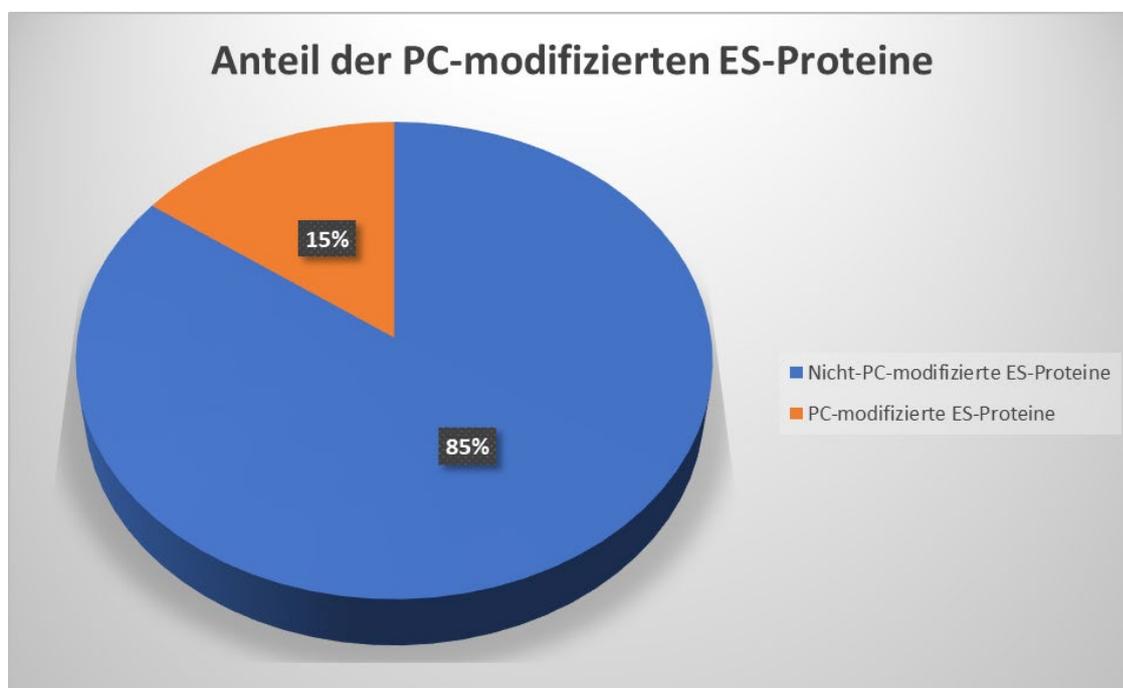


Abbildung 13: Prozentuale Aufteilung der PC-modifizierten und Nicht-PC-modifizierten, exkretorisch-sekretorischen Proteine

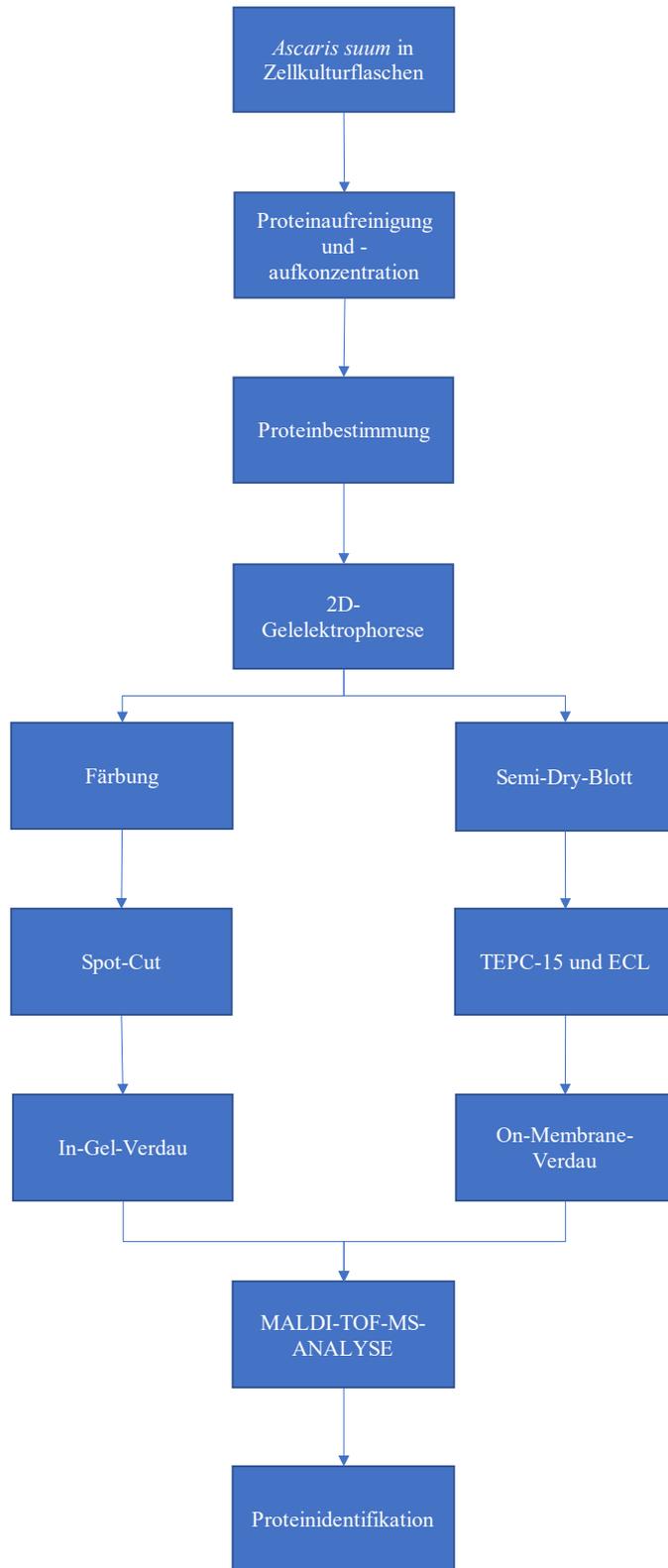


Abbildung 14: Flussdiagramm zu den Arbeitsschritten von der Materialgewinnung bis zur Proteinidentifikation

Entsprechend ihrer Funktion erfolgte eine Einteilung der identifizierten ES-Proteine in folgende Gruppen (siehe Abbildung 15):

Strukturproteine, Signaltransduktion, Chaperone, Translations- und Proteinsynthese, Energie- und Redox-Metabolismus, Protein- und Aminosäure (AS)-Metabolismus, Allgemeiner Metabolismus, Nicht-klassifizierbare Proteine und Unbekannte Proteine.

Die größte Gruppe unter den identifizierten Proteinen zeigt eine Beteiligung an Stoffwechselregulationen (45,5 %), darunter 34 % am allgemeinen Stoffwechsel, 5,5 % am Energie- und Redox-Metabolismus sowie 6 % am Protein- und AS-Metabolismus. 13 % der Proteine gehören zur Gruppe der Strukturproteine. Daneben wurden Signaltransduktionsproteine (7 %), Proteine aus der Gruppe der Translations- und Proteinsynthese (5,5 %) sowie Chaperone (2 %) identifiziert. Interessanterweise sind mehr als ein Viertel der identifizierten Proteine unbekannt (10 %) oder nicht-klassifizierbar (17 %).

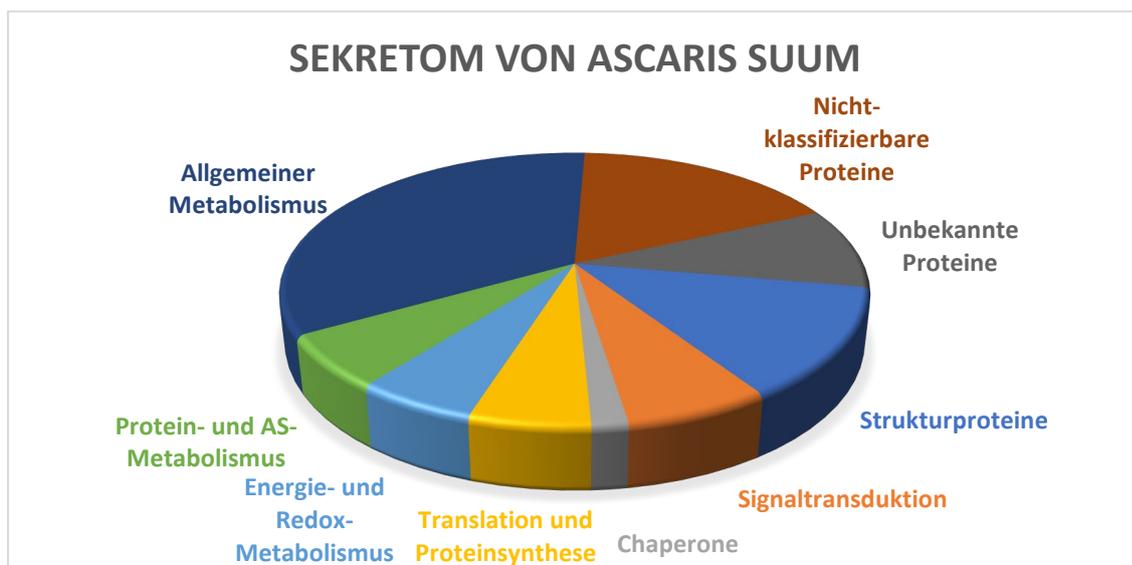


Abbildung 15: Kreisdiagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der ES-Proteine

Aus den 2D-Gelen wurden vor allem exkretorisch-sekretorische Proteine mit einem Molekulargewicht von größer 30 kDa identifiziert. Aber auch auf Höhe 30 kDa, 20 kDa und 15 kDa zeigten sich multiple Proteinspotmuster. Die PC-modifizierten ES-Proteinspots findet man hauptsächlich auf Höhe von 30 kDa und 50 kDa, in einer geringeren Anzahl auch auf Höhe von 20 kDa (siehe Abbildung 16).

10

kDa pI 3

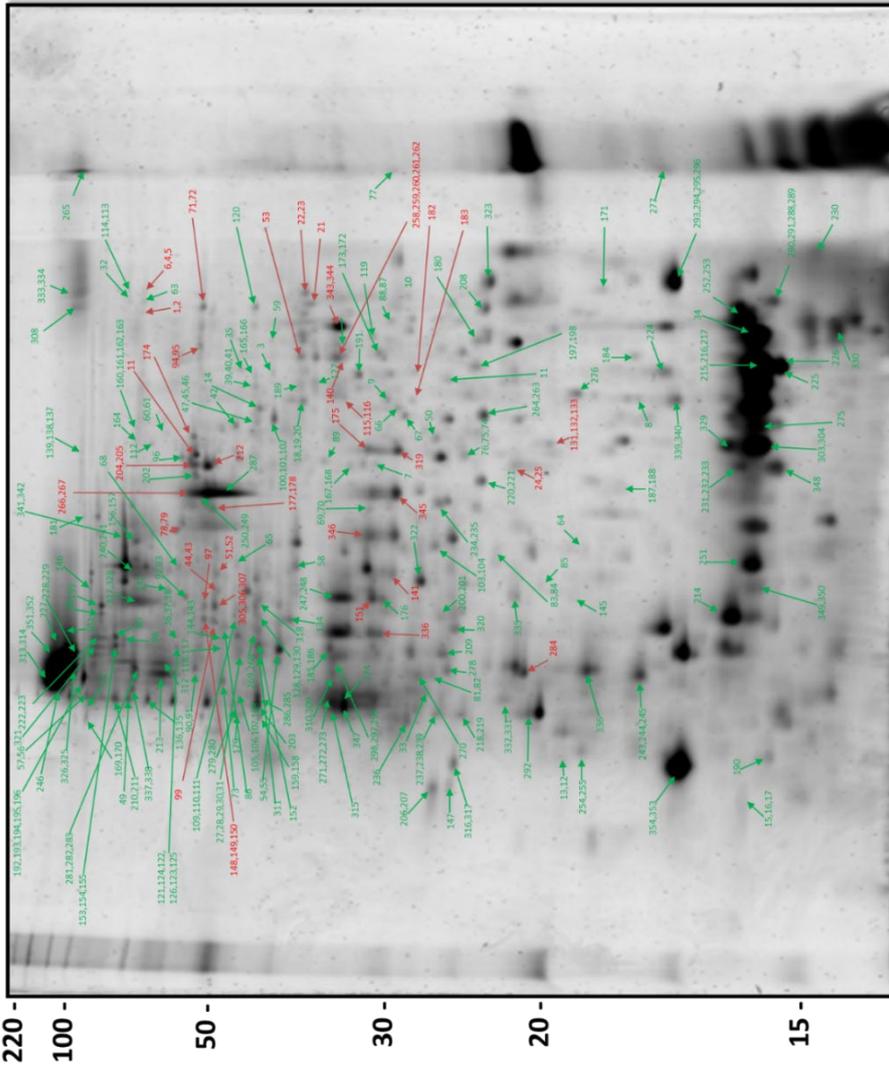


Abbildung 16: 2D-Gel der ES-Produkte von *Ascaris suum*. Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert, die Nicht-PC-modifizierten ES-Proteine sind grün markiert.

3.1 Identifizierung der ES-Proteine

Es wurden in der Summe 46 Strukturproteine identifiziert, wovon wiederum 3 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 3).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
333	Asuum fasta	Intermediate filament protein A	140.7	5.9	15.9
76	ES Nematoden	Intermediate filament protein	92.3	8.5	18.4
218	Asuum fasta	intermediate filament tail domain containing protein	42.1	5.3	32.6
128	Asuum fasta	Actin-2, partial	40.2	5.6	30.3
129	Asuum fasta	Actin-2	48.2	5.1	38.0
130	Asuum fasta	Actin, partial	41.8	5.2	38.0
59	Asuum fasta	Tropomyosin	10.7	5.0	64.1
238	Asuum fasta	Tropomyosin	31.1	4.6	39.1
98	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein	197.9	5.3	19.2
105	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial	228.9	5.4	13.0
186	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein	220.3	5.3	19.5
149	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial	227.9	5.4	21.3
19	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial	146.7	5.1	17.8
108	Asuum fasta	Kinesin-like protein KIF15	116.7	6.4	15.4
119	Asuum fasta	Myosin-XVIIIa	189.7	6.3	17.7
194	Asuum fasta	Myosin-4	226.4	5.4	17.9
195	Asuum fasta	Myosin-4	169.9	5.3	20.7
122	Asuum fasta	Spectrin alpha chain	281.0	5.1	21.5
37	Asuum fasta	Spectrin beta chain	476.0	6.1	14.7
136	ES Nematoden	Kinesin motor domain containing protein	121.6	6.0	17.9
169	Asuum fasta	Basement membrane proteoglycan	90.7	4.9	24.0
192	Asuum fasta	Centrosomal protein of 97 kDa	86.1	10.0	27.6
193	ES Nematoden	myosin heavy chain B	149.6	5.2	22.0
241	Asuum fasta	Myosin heavy chain	218.2	5.5	17.3
279	Asuum fasta	Unconventional myosin heavy chain 6	244.6	9.6	18.4
234	Asuum fasta	Filamin-C	288.8	5.9	8.6
235	Asuum fasta	Filamin/ABP280 repeat family protein	397.8	6.5	8.3
247	ES Nematoden	Collagen alpha-4(VI) chain	47.4	6.0	52.9
250	ES Nematoden	Collagen alpha-5(VI) chain	43.1	3.7	50.6
256	Asuum fasta	Talin-1, partial	277.0	6.1	11.8
257	ES Nematoden	Talin 2	275.0	6.0	11.8
284	Asuum fasta	Cytoskeleton-associated protein 5	165.2	7.8	15.8
286	Asuum fasta	Laminin subunit alpha-2	51.9	6.3	25.1
343	Asuum fasta	Tropomodulin family protein	52.3	10.0	28.9
352	Asuum fasta	Band 4.1-like protein 1	420.9	6.5	12.5
354	Asuum fasta	Titin	704.8	5.0	6.5
203	Asuum fasta	Cuticle collagen 34, partial	23.4	12.4	44.3
207	Asuum fasta	Sperm-specific protein ZC168.6	10.1	9.2	84.5
294	ES Nematoden	major sperm protein 2 cytoskeletal	18.5	9.7	57.7
295	Asuum fasta	Major sperm protein isoform beta	14.2	9.1	74.0
317	Asuum fasta	major sperm protein	18.1	4.6	36.3
316	Asuum fasta	Sperm-specific class P protein 19, partial	11.7	10.1	61.7
110	Asuum fasta	Muscle M-line assembly protein unc-89	601.5	5.1	9.2
68	Asuum fasta	Muscle M-line assembly protein unc-89	717.2	5.0	11.8
219	Asuum fasta	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	55.0	7.1	26.5
283	ES Nematoden	nuclear anchorage defective protein ANC-1	73.4	6.2	25.3

Tabelle 3: Strukturproteine

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

Das *Intermediate Filament A*, *Intermediate filament protein* und *Intermediate filament tail domain containing protein* gehören zu den Intermediärfilamenten, welche zusammen mit den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett einer Zelle bilden und der Zellstabilität dienen.

Das *Actin-2*, *Actin 2* und *Actin* sind ebenfalls Bestandteile des Zytoskeletts, zählen zu den Mikrofilamenten und weisen mehrere Funktionen auf. Mikrofilamente sind nicht nur für die Zellmigration und für die Transporte innerhalb der Zelle zuständig, sondern auch für die Zellkontraktilität verantwortlich.

Tropomyosin ist ein aktinbindendes Protein. In Muskelzellen ist sie an der Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin beteiligt. In anderen Zellarten hat Tropomyosin Einfluss an Zellwegen, welche das Zytoskelett und andere wichtige Zellfunktionen regulieren.

227 kDa spindle-and centromere-associated protein ist ein Protein, welches an der Ausbildung des Spindelapparates sowie an der Interaktion mit dem Zentromer beteiligt ist.

Bei *Kinesin-like protein KIF15* handelt es sich um eine Kinesin-ähnliches motorisches Enzym, welches an der Ausbildung der mitotischen Spindel beteiligt ist.

Die Motorproteine *Myosin-XVIIIa* und *Myosin-4* sind Begleitproteine von Aktinfilamenten und an der Umwandlung von chemischer Energie in Bewegung und Kontraktion beteiligt.

Die Gerüstproteine *Spectrin alpha chain* und *Spectrin beta chain* haben die Funktion, Aktinfilamente mit dem Zellmembranskelett zu verankern.

Kinesin motor domain containing protein ist Bestandteil des Kinesinkomplexes, welches ATP-abhängig entlang des Mikrotubulus Vesikel, Zellorganelle und andere Moleküle transportieren kann.

Zu den Funktionen des Proteins *Basement membran proteoglycan* gehört u.a. die Kontrolle der Filtration durch Basalmembranen und die Bindung von Wachstumsfaktoren sowie Proteaseinhibitoren.

Das *Centrosomal protein of 97 kDa* wirkt als negativer Regulator der Ziliogenese und verhindert die Ausbildung von Zilien.

Das *myosin heavy chain B* und *Myosin heavy chain* sowie *Unconventional myosin heavy chain 6* sind Bausteine des Myosins und kennzeichnen sich durch ihre ATPase-Aktivität.

Das *Filamin-C* und das *Filamin bzw. ABP280 repeat family protein*, welche hauptsächlich im gestreiften Muskel zu finden sind, wirken in subsarkolemmaler Region

sowie an den Z-Scheiben als Kommunikationsmodus zwischen der Membran und dem Sarkomer.

Collagen alpha-5 (VI) chain, welches Von-Willebrand-Faktor Typ A-ähnliche Domänen beinhaltet, produziert Kollagenkomponenten für die extrazelluläre Matrix der meisten Bindegewebe.

Das *Collagen alpha-4 (VI) chain* bilden einen integralen Bestandteil der Basalmembran von Zellen.

Talin-1 und *Talin-2* sind Zytoskelettproteine, welche in der Lage sind Integrine direkt oder indirekt durch Wechselwirkung mit Vinculin und α -Actinin an das Aktin zu binden.

Bei *Cytoskeleton-associated protein 5* handelt es sich um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches relevante Aufgaben bei der Spindelbildung aufweist. Zum einen schützt es Kinetochor-Mikrotubuli vor Depolymerisation durch MCAK (mitotic centromere associated kinesin) und zum anderen beeinflusst sie auch die zentrosomale Mikrotubuli-Assemblierung, welche unabhängig von der MCAK-Aktivität stattfindet.

Laminin subunit alpha-2 stellt einen Baustein des extrazellulären Matrixproteins Laminin dar, welches ein Hauptbestandteil der Basalmembran ist. Durch Wechselwirkung mit anderen extrazellulären Matrixkomponenten vermittelt sie die Anhaftung, Migration und Organisation von Zellen in Geweben während der Embryonalentwicklung.

Das *Tropomodulin family protein* ist ein Zytoskelettprotein, welches an der Regulation der Aktinfilamentlänge beteiligt ist.

Das *Band 4.1-like protein 1* ist ein wichtiges Strukturelement des Zellmembranskeletts und stabilisiert die Spectrin-Actin-Wechselwirkung.

Das *Titin* ist ein Strukturprotein, welches in Sarkomeren für die elastische Anheftung der Aktinfilamente an die Z-Scheiben sorgt.

Das *Cuticle collagen 34* ist ein kutikuläres Kollagen, welches als Exoskelett fungiert und eine Barrierefunktion aufweist, um den Wurm vor seiner Umgebung zu schützen.

Bei *Sperm specific protein ZC168.6*, *major sperm protein cytoskeletal*, *Major sperm protein isoform beta*, *major sperm protein* und *Sperm specific class P protein 19, partial* handelt es sich um Nematoden-spezifische Proteine, welche eine Schlüsselrolle in der Motilitätsmaschinerie von Nematodenspermien einnehmen. Das *major sperm protein* ist

nicht nur für die Bewegung von reifen Spermien relevant, sondern zeigt auch eine hormonelle Wirkung auf weibliche Keimzellen, indem es die Reifung der Eizellen auslöst. Außerdem regt das major sperm protein die Eileiterwand an, sodass sie sich zusammenzieht und die Eizellen für die Befruchtung in Position bringt (102).

Muscle M-line assembly protein unc-89 stellt eine Strukturkomponente der M-Linie dar, die an der Anordnung/Organisation von Myofibrillen innerhalb eines Sarkomers beteiligt ist.

Bei *Na (+)/H(+)* exchange regulatory cofactor *NHE-RF1* handelt es sich um ein Gerüstprotein, welches Plasmamembranprotein mit Mitgliedern der Ezrin-/Moesin-/Radixin-Familie verbindet und ihre Oberflächenexpression reguliert.

Das *nuclear anchorage defective protein ANC-1* spielt eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Zellkerns und auch des Mitochondriums im Zytoplasma durch Herstellung einer Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Hülle des Nukleus bzw. des Mitochondriums.

Es wurden in der Summe 24 Signaltransduktionsproteine identifiziert, wovon wiederum 2 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 4).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
65	Asuum fasta	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	49.9	5.4	48.6
7	Asuum fasta	Protein vav-1	107.3	6.7	23.9
54	Asuum fasta	Tyrosine-protein kinase kin-31	51.9	9.5	29.6
339	Asuum fasta	Tyrosine-protein kinase kin-31	49.5	9.7	21.9
69	Asuum fasta	Rap guanine nucleotide exchange factor 1	67.5	5.3	22.9
90	Asuum fasta	WASH complex subunit FAM21A	92.2	4.9	24.3
182	ES Nematoden	complex subunit FAM21A	92.2	4.9	21.5
92	ES Nematoden	protein kinase 3	679.4	5.1	11.1
109	ES Nematoden	protein phosphatase	51.4	5.9	26.3
111	Asuum fasta	Dedicator of cytokinesis protein 11	204.4	6.3	11.7
184	Asuum fasta	FMRFa-like protein precursor 11	22.4	11.2	37.9
208	Asuum fasta	Guanylate cyclase receptor-type gcy-1	29.2	5.4	33.6
99	ES Nematoden	peptide receptor A/guanylate cyclase A (atriuretic peptide receptor A)	117.4	5.7	20.1
236	Asuum fasta	14-3-3-like protein, partial	23.8	4.7	32.1
245	ES Nematoden	synembryn	13.0	4.9	50.9
255	Asuum fasta	Phosphatidylinositol 3-kinase age-1	123.5	6.2	11.0
264	Asuum fasta	Mitogen-activated protein kinase kinase 15	165.1	6.1	12.7
310	Asuum fasta	3',5'-cyclic phosphodiesterase pde-5, partial	8.4	5.1	66.2
320	ES Nematoden	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein	29.2	6.9	28.9
329	Asuum fasta	Stress-activated protein kinase jnk-1	46.0	6.0	24.1
326	ES Nematoden	MEGF3, EGF-like-domain, multiple 2, cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2, epidermal growth factor-like 2, multiple epidermal growth factor-like domains 3	65.6	10.4	20.3
158	ES Nematoden	Arsenite-resistance protein 2 containing protein	84.2	5.4	20.1
276	Asuum fasta	Phosphatidylethanolamine-binding protein	22.6	9.1	38.0
304	Asuum fasta	RhoGEF domain containing protein	96.9	8.4	15.7

Tabelle 4: Signaltransduktion

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

Das *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* ist ein Protein, welches die GDP-GTP-Austauschreaktion von Mitgliedern der Rab-Familie (kleine GTP-bindende Proteine der ras-Superfamilie) reguliert. Mitglieder der Rab-Familie wiederum sind am vesikulären Transport von Molekülen zwischen zellulären Organellen beteiligt.

Das *Protein vav-1* aktiviert mittels Phosphorylierung Rho/Rac GTPasen. Diesem folgt eine Aktivierung des Inositol-3-Phosphats durch die Phospholipase C, welches wiederum zur Calciumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum führt und somit einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt. Daher ist vav-1 relevant für den Bewegungsablauf von Nematoden (103).

Die *Tyrosine-protein kinase kin-31* wird auch Non-specific protein-tyrosine kinase genannt. Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen bilden eine Untergruppe der Tyrosinkinasen. Bei diesen handelt es sich um cytosolische Enzyme, welche den Transfer einer Phosphatgruppe von einem Nucleosidtriphosphat-Donor wie ATP auf Tyrosinreste in

Proteinen katalysieren (Phosphorylierung). Diese Enzyme regulieren viele zelluläre Funktionen, indem sie andere Enzyme innerhalb einer Zelle ein- und ausschalten. Sie haben Einfluss auf das Zellwachstum, die Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose sowie bilden wichtige Komponenten bei der Regulation des Immunsystems.

Beim *Rap guanine nucleotide exchange factor 1* handelt es sich um ein Signalprotein. Es kann das Rab, ein Protein der Ras-Familie, durch Austausch von gebundenem GDP gegen ein GTP aktivieren.

Bei *WASH complex subunit FAM21A* bzw. *complex subunit FAM21A* handelt es sich um eine Untereinheit des WASH-Proteinkomplexes. Dieses bindet an die zytosolische Seite der Endosomenmembran und spielt eine Rolle bei der Sortierung der in Vesikeln bepackten Membranproteine in verschiedene Transportwege (exemplarisch zum trans-Golgi-Netzwerk oder zur Zelloberfläche).

Protein kinase 3 und *protein phosphatase* sind Signalproteine, welche eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung bewirken.

Bei *Dedicator of cytokinesis protein 11* handelt es sich um ein Signalprotein aus der Gruppe der Nukleotidaustauschfaktoren, welches als Aktivator des kleinen G-Proteins Cdc42 fungiert. Cdc42 ist an der Regulation von verschiedenen Signalwegen beteiligt, welche wiederum diverse Zellfunktionen wie z.B. Endozytose, Zellzyklus, Morphologie und Migration steuern.

Das *FMRFa-like protein precursor 11* ist an Neuropeptidsignalwegen beteiligt.

Guanylate cyclase receptor-type gcy-1 und *peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)* katalysieren die Synthese des sekundären Botenstoffes cGMP aus GTP unter Abspaltung eines Diphosphats.

14-3-3-like-protein gehört zu einer Familie regulatorischer Proteine, die mehrere funktionell unterschiedliche Signalproteine binden kann. Exemplarisch reguliert das 14-3-3-Protein in *C. elegans* den *daf-2*/Insulin-ähnlichen Signalweg, welcher wiederum den Metabolismus, die Entwicklung, die Stressresistenz und auch die Langlebigkeit beeinflusst (104).

Auch bei *Synembryn* handelt es sich um ein Signalprotein aus der Gruppe der Nukleotidaustauschfaktoren, welches mehrere G-Proteine aktivieren kann.

Phosphatidylinositol-3-kinase age-1 ist ein Homolog der Phosphatidylinositol-3-Kinase, was eine Phosphorylierung der 3'-OH-Position am Inositolring von bestimmten Phospholipiden in der Zellmembran katalysiert. Als Signaltransduktionsmolekül übernimmt sie eine Schlüsselrolle beim Zellwachstum, bei der Zellproliferation, Migration, Differenzierung und auch Zelladhäsion.

Die *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15* ist eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, welche die MAP-Kinase-Kinase aktiviert. Beide gehören zum MAP-Kinase-Weg, der wiederum einen mehrstufigen Signaltransduktionsweg darstellt. Der MAP-Kinase-Weg reguliert die Embryogenese, die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum und den programmierten Zelltod.

3',5'-cyclic phosphodiesterase pde-5 ist ein Protein aus der Gruppe der Hydrolasen, welche die second messenger cAMP und cGMP in AMP bzw. GMP umwandeln kann, indem es die Phosphodiesterbindung spaltet.

Das *Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein* ist an der Synthese von sekundären Botenstoffen beteiligt. Hierbei phosphoryliert die Phosphatidylinositol-3-Kinase an der 3-Hydroxylgruppe des Inositolringes. Produkte der Phosphatidylinositol-3-kinase sind die second messenger PI-3-P, PI-3,4-P und PI-3,4,5-P. Die Phosphatidylinositol-4-kinase wiederum bildet Schritt 1 bei der Synthese des second messengers Inositol-1'4'5'-triphosphat, indem es die 4-Hydroxylgruppe des Inositolringes phosphoryliert. Die PI-3 und PI-4-Kinase teilen eine Domäne an ihrem C-terminalen Abschnitt.

Bei *Stress-activated protein kinase jnk-1*, auch Mitogen-activated protein kinase genannt, handelt es sich um ein Signaltransduktionsprotein, welches für eine zelluläre Reizweiterleitung, insbesondere von Stresssignalen wie z.B. UV-Bestrahlung, Chemokine oder Interleukine, sorgt.

Das *MEGF3, EGF-like-domain, multiple 2, cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2, epidermal growth factor-like 2, multiple epidermal growth factor-like domains 3* ist ein Protein aus der Flamingo-Untereinheit der Cadherin-Superfamilie. Sie

ist an der kontaktvermittelten Kommunikation beteiligt, wobei Cadherin-Domänen als homophile Bindungsregionen fungieren und die EGF-ähnlichen Domänen bei der Zelladhäsion und den Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mitwirken. Spezifische Funktionen sind nicht bekannt.

Das *Arsenite-resistance protein 2 containing protein* zeigt eine Beteiligung im nukleären RNA-Metabolismus. Hierbei interagiert sie mit dem Nuclear Cap-Binding Complex (CBC) und vermittelt transkriptionsabhängig Interaktionen mit verschiedenen RNA-Prozessierungs- und Transportmaschinen.

Phosphatidylethanolamine-binding protein ist bei der Steuerung diverser Signalwege beteiligt. Dazu gehört exemplarisch die Hemmung des MAPK-Weges (105), die Hemmung des NF- κ B-Weges (106), die Regulation von heterotrimeren G-Proteinen (107) sowie die Inhibition der Serinprotease (108). Bei *Toxocara canis* ist PEBP, welches zuerst als TES-26 bezeichnet wurde und später die Umbenennung in Tc-PEB-1 erfolgte (109), ein ES-Protein, bei der die Vermutung aufgestellt wurde, dass es bei der Immunevasion beteiligt ist (110, 111). Bei *Trichuris muris* (Mauspeitschenwurm) wird das ES-Protein Tm16 identifiziert, welches der PEBP-Superfamilie zugeordnet wurde. Tm16 weist einen großen Bindungshohlraum auf, welcher verschiedene Liganden, die an der Signaltransduktion, Zellmigration und -regulation beteiligt sind, aufnehmen kann (112). Basierend auf diesen Erkenntnissen wird auch beim *A. lumbricoides* PEBP vermutet, dass sie eine wichtige Rolle beim Überleben des Parasiten im Wirt spielt (113).

Das *RhoGEF domain containing protein* ist bei der Aktivierung von Mitgliedern der Rho-Familie beteiligt, indem sie die GDP-Freisetzung und GTP-Bindung fördern.

Es wurden in der Summe 6 Chaperone identifiziert, wovon wiederum 1 eine PC-Modifikation aufweist (siehe Tabelle 5).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
47	Asuum fasta	Heat shock 70 kDa protein A	41.6	6.8	40.6
306	Asuum fasta	Heat shock 70 kDa protein F	72.7	6.3	26.2
46	ES Nematoden	Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)	70.8	5.3	29.3
307	Asuum fasta	Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)	71.5	6.1	26.5
211	Asuum fasta	T-complex protein 1 subunit epsilon	39.6	7.8	40.0
55	ES Nematoden	T-complex protein 1, epsilon subunit	59.5	5.6	28.9

Tabelle 5: Chaperone

Das PC-modifizierte ES-Protein ist rot markiert.

Das *Heat shock 70 kDa protein A* und *Heat shock 70 kDa protein F* sowie das *Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)* sind aus der Gruppe der Hitzeschockproteine, die klassischerweise als zytosolisch molekulare Chaperone an der Proteinfaltung und auch Proteinentfaltung vor einem Membrantransport beteiligt sind. Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass Hitzeschockproteine auch immunstimulierend und -suppressiv wirken können (114, 115). Ahmed et al beschreiben 2004, dass das *Toxoplasma gondii*-HSP-70 immunsuppressive Eigenschaften aufweist. HSP-70 zeigt hier nicht nur eine stimulierende Wirkung bei der kontinuierlichen Produktion von Th2-Zytokinen, sondern reduziert auch die Bildung von Stickoxid, welches normalerweise die Immunantwort aktiviert (116).

Das *T-complex protein 1 subunit epsilon* bzw. *T-complex protein 1, epsilon subunit* ist Bestandteil des Chaperonin-haltigen T-Komplexes (TRiC), eines molekularen Chaperon-Komplexes, der die Faltung von Proteinen bei der ATP-Hydrolyse unterstützt.

Es wurden in der Summe 20 ES-Proteine aus der Gruppe der Translation und Proteinsynthese identifiziert, wovon wiederum 1 Protein eine PC-Modifikation aufweist (siehe Tabelle 6).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
301	Asuum fasta	60S ribosomal protein L5	13.2	4.6	35.6
1	Asuum fasta	60S ribosomal protein L13	24.7	11.9	20.2
2	Asuum fasta	60S ribosomal protein L13	24.7	11.9	20.2
146	Asuum fasta	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15	63.2	10.1	17.8
233	Asuum fasta	28S ribosomal protein S22	48.3	6.6	21.2
56	Asuum fasta	Argonatie ALG-new2	107.9	9.8	20.0
11	Asuum fasta	Far upstream element-binding protein 2, partial	22.5	6.2	45.8
26	Asuum fasta	Ribosome production factor 2, partial	39.2	11.0	27.8
85	Asuum fasta	Ribosome production factor 2, partial	40.6	10.7	34.3
53	Asuum fasta	Nuclear hormone receptor family member nhr-86	29.9	10.6	32.3
75	Asuum fasta	H2B 1/2/3/4/6	13.5	10.9	56.6
41	ES Nematoden	BTB/POZ domain containing protein	71.1	6.2	20.4
126	ES Nematoden	BTB/POZ domain containing protein	61.2	5.8	33.6
181	Asuum fasta	BTB/POZ domain containing protein	44.0	9.8	33.4
348	ES Nematoden	BTB/POZ domain containing protein	71.1	6.2	20.4
164	ES Nematoden	Transcription initiation factor IIB	32.8	9.3	33.4
246	Asuum fasta	Transcription factor E2F7	70.9	9.7	20.5
290	Asuum fasta	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	96.5	5.6	32.8
77	Asuum fasta	TAR DNA-binding protein 43	48.8	6.1	15.9
212	Asuum fasta	Brix domain containing protein 1 homolog	32.5	10.7	44.8

Tabelle 6: Translation und Proteinsynthese

Das PC-modifizierte ES-Protein ist rot markiert.

Das 60S ribosomal protein L5, das 60S ribosomal protein L13, das U3 small nucleolar RNA-associated protein 15, welches auch 60S ribosomal protein L35a genannt wird, sowie das 28S ribosomal protein S22 sind Bestandteile des Ribosoms, welches wiederum einen wichtigen Baustein für die Proteinbiosynthese darstellt. Hierbei bindet die kleine ribosomale Untereinheit messenger-RNAs (m-RNAs) und übersetzt die codierte Nachricht durch Auswahl verwandter Aminoacyltransfer-RNA-Moleküle (t-RNA). Die große ribosomale Untereinheit besitzt das Peptidyltransferasezentrum, welches die Polypeptidpolymerisation der von tRNAs gelieferten Aminosäuren ermöglicht.

Argonatie ALG-new2, auch ALG-5 genannt, gehört zu den Argonautenproteinen, welche eine relevante Rolle bezüglich der Aktivierung und Regulation von Genen spielen. Sie ist an dem posttranskriptionellen Gen-Silencing beteiligt. Zum Gen-Silencing zählt man die RNA-Interferenz (RNAi) sowie den durch microRNA bedingten mRNA-Abbau.

Das Far upstream element-binding protein 2 gehört zu der einzelsträngigen DNA-bindenden Proteinfamilie und ist an der Regulierung der Transkription und Posttranskription beteiligt.

Das *Ribosome production factor 2* ist an der Ribosombiogenese beteiligt.

Das *Nuclear hormone receptor family member nhr-86* gehört zu den Kernhormonrezeptoren und zeigt eine DNA-bindende Transkriptionsfaktoraktivität. Kernhormonrezeptoren weisen eine intrazelluläre Sensorfunktion auf, welche nach Erkennung spezifischer endogener und exogener Liganden eine adaptive Wirtsreaktion bewirken kann. Peterson et al beschreibt 2019, dass bei *C. elegans* NHR-86 eine Transkriptionsantwort auslöst, welche einen Schutz gegen das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ermöglicht (117).

Das *H2B 1/2/3/4/6* gehört zur Familie der Histone, welche eine wichtige Rolle bei der Verpackung der DNA spielen. Die DNA wird nämlich um sogenannte Histonoktamere gewickelt, welche aus jeweils zwei H2A, H2B, H3 und H4 Histonen gebildet werden. Die Einheit aus DNA und Histonen wird Nukleosom genannt.

Bei *BTB/POZ domain containing protein* handelt es sich um Transkriptionsregulatoren. Es wird angenommen, dass sie ihre Wirkung durch die Kontrolle der Chromatinstruktur zeigen.

Das *Transcription initiation factor IIB* bindet bei der Zusammenstellung des Präinitiationskomplexes an den Promoter-TFIID-TFIIA-Komplex (DA-Komplex), sodass sich der DAB-Komplex bildet. An den DAB-Komplex wiederum dockt die RNA-Polymerase II an. Die RNA-Polymerase II katalysiert die Bildung der prä-mRNA, snoRNAs, mancher snRNAs, siRNA und miRNA.

Das *Transcription factor E2F7* wirkt in der Regel als Transkriptionsrepressor. Sie ist an verschiedenen Prozessen wie Angiogenese, Polyploidisierung spezialisierter Zellen und DNA-Schadensantwort beteiligt.

Das *U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1* spielt eine Rolle beim mRNA-Spleißen als Bestandteil des U4/U6-U5-Tri-snRNP, welches wiederum ein Baustein des Spleißosoms darstellt.

Bei *TAR DNA-binding protein 43* handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsrepressor, welcher an chromosomal integrierte TAR-DNA bindet.

Das *Brix domain containing protein 1 homolog* ist ein Protein, welches für die Biogenese der ribosomalen 60S-Untereinheit essenziell ist.

Es wurden in der Summe 20 ES-Proteine aus der Gruppe des Energie- und Redox-Metabolismus identifiziert, wovon wiederum 5 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 7).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
114	Asuum fasta	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	82.3	9.1	21.4
269	Asuum fasta	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	39.7	6.3	31.7
134	ES Nematoden	dehydrogenase E1 component	28.9	8.7	23.7
331	Asuum fasta	pyruvate dehydrogenase type II alpha subunit, partial	43.2	8.8	33.5
27	Asuum fasta	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	68.8	5.8	29.9
94	Asuum fasta	Glucose-6-phosphate isomerase	64.1	6.8	35.1
95	Asuum fasta	glucose-6-phosphate isomerase	75.8	9.0	23.3
22	ES Nematoden	fructose-bisphosphate aldolase 1	43.4	9.1	40.5
23	Asuum fasta	Fructose-bisphosphate aldolase 1	40.4	8.6	52.0
21	Asuum fasta	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.1	7.0	33.5
120	Asuum fasta	Phosphoglycerate kinase, partial	44.7	7.0	55.7
42	Asuum fasta	enolase	47.4	6.0	61.7
30	Asuum fasta	flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase	70.5	8.8	19.1
28	Asuum fasta	flavoprotein subunit of complex II (Caenorhabditis elegans)	70.4	6.2	20.4
115	Asuum fasta	Alcohol dehydrogenase NADP+ A	36.6	6.2	42.1
291	Asuum fasta	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	52.6	6.2	27.6
314	Asuum fasta	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex subunit 10	32.1	6.0	38.6
275	ES Nematoden	H+ or Na+-translocating NADH Dehydrogenase Family NADH dehydrogenase (ubiquinone)flavoprotein 1, mitochondrial	58.6	9.8	16.0
162	Asuum fasta	phosphoenolpyruvate carboxykinase	72.2	6.4	30.5
163	ES Nematoden	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	45.1	6.5	34.0

Tabelle 7: Energie- und Redox-Metabolismus

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

Propionyl-CoA carboxylase alpha chain ist ein Protein, welches an der Succinyl-CoA-Synthese aus Propanoyl-CoA beteiligt ist.

Die Proteine *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha*, die *dehydrogenase E1 component*, die *pyruvate dehydrogenase type II alpha subunit* sowie die *Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex* sind an der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ beteiligt. Die Pyruvatdehydrogenase ist essenziell zur Energiegewinnung, da es die Glykolyse mit dem Citratzyklus verbindet.

Glucose-6-phosphate isomerase und *Fructose-bisphosphate aldolase 1* bzw. *Fuctosebisphosphate aldolase 1* bilden den zweiten und vierten bzw. letzten Schritt bei der Umwandlung von Glukose in Glycerinaldehyd-3-phosphat. Dies sind wichtige Schritte zur Verwertung bzw. zum Speichern der Energie in Kohlenhydraten mittels der Glykolyse bzw. Glukoneogenese.

Glycerinaldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, *Phosphoglycerate kinase* und *2-phospho-D-glycerate hydrolyase (enolase bzw. enol-1)* sind Enzyme, welche bei der Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in Pyruvat in 3 von 5 Schritten beteiligt sind.

Flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase sowie *flavoprotein subunit of complex II (Caenorhabditis elegans)* bilden die Untereinheit der Succinatdehydrogenase, welche unter Beteiligung an Komplex II der mitochondrialen Elektronentransportkette für den Elektronentransfer von Succinat auf Ubichinon verantwortlich ist. Hierbei wird Ubichinon zu Ubichinol reduziert sowie Succinat in Fumarat umgewandelt.

Das Protein *Alcohol dehydrogenase NADP⁺ A* weist eine Oxidoreduktaseaktivität auf und sorgt für die Generierung des NADP⁺, welches in mehreren Schritten der Glykolyse benötigt wird.

Das *Cytochrome-b-c1 complex subunit 1* ist Bestandteil des Transmembrankomplexes Ubichinol-Cytochrom-C-Oxidoreduktase, welche wieder Teil der mitochondrialen Elektronentransportkette darstellt und die oxidative Phosphorylierung antreibt.

NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex subunit 10 sowie *H⁺ or Na⁺ translocating NADH Dehydrogenase Family NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, mitochondrial* sind Bestandteile des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette bzw. der mitochondrialen Membran-Atmungskette NADH-Dehydrogenase.

Die *phosphoenolpyruvate carboxykinase* bzw. *phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]* sind wichtige Enzyme des Glukosestoffwechsels. Im Gegensatz zur PEPCCK von Wirbeltieren, welche als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glukoneogenese die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat unter Decarboxylierung katalysiert, arbeitet die PEPCCK parasitärer Nematoden in umgekehrter Richtung im Sinne der Glykolyse, indem sie das Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat carboxyliert und diesen in den mitochondrialen Metabolismus einführt (118).

Es wurden in der Summe 22 ES-Proteine aus der Gruppe des Protein- und Aminosäuren-Metabolismus identifiziert, wovon wiederum 3 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 8).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
71	ES Nematoden	glutamatdehydrogenase	56.8	7.8	46.9
72	Asuum fasta	Glutamat dehydrogenase 2	55.2	7.8	45.7
261	Asuum fasta	Glutamat dehydrogenase1	63.8	9.3	22.3
13	Asuum fasta	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1, partial	128.9	5.8	19.3
74	Asuum fasta	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs gon-1	241.0	9.7	6.8
81	Asuum fasta	Neprilysin-1	174.6	4.9	15.0
82	ES Nematoden	family M13 unassigned peptidases	175.2	4.9	23.1
123	Asuum fasta	Proteasome subunit beta type-5	31.2	5.7	50.7
125	ES Nematoden	proteasome catalytic subunit 3 (Brugia malayi)	34.0	6.2	50.0
159	Asuum fasta	Aminoacylase-1	48.7	6.8	30.2
220	Asuum fasta	Prolyl endopeptidase	92.9	8.9	21.5
242	ES Nematoden	family M1 unassigned peptidases (Caenorhabditis elegans)	34.2	5.3	47.7
251	Asuum fasta	BTB and MATH domain-containing protein 40	45.8	9.2	19.7
263	Asuum fasta	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	35.9	4.8	25.5
324	Asuum fasta	Aminopeptidase N	178.2	4.9	17.5
325	Asuum fasta	Netrin unc-6, partial	68.5	10.4	19.4
36	ES Nematoden	subfamily S1A unassigned peptidases (Brugia malayi)	49.8	6.3	30.4
321	ES Nematoden	subfamily SB9 unassigned peptidases (Caenorhabditis elegans)	101.5	8.6	18.3
268	ES Nematoden	serpin B	35.2	5.0	31.2
271	Asuum fasta	Serpin-like protein	30.5	6.1	39.3
272	Asuum fasta	serpin B	33.4	5.3	39.1
273	Asuum fasta	Serpin B6	41.4	5.0	33.0

Tabelle 8: Protein- und AS-Metabolismus

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

Die *glutamatdehydrogenase*, *Glutamat dehydrogenase 2* und *Glutamat dehydrogenase 1* bilden einen zentralen Baustein des Aminosäurenstoffwechsels bei der es zur oxidativen Desaminierung, d.h. zur Freisetzung der Aminogruppe einer Aminosäure in Form von Ammoniak, kommt. Hierbei kann die *Glutamatdehydrogenase* als Cofaktor sowohl NAD⁺ als auch NADP⁺ nutzen. Das dabei entstehende, zytotoxische Ammoniak kann über den Harnstoffzyklus zu Harnstoff umgewandelt und anschließend mit dem Urin ausgeschieden werden.

Das *E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1* bildet den dritten Schritt (Ligation) bei der Bindung von Ubiquitin an das zu entsorgende Protein (Ubiquitinierung).

Das *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs gon-1* ist eine sekretierte Metalloprotease mit vielfältigen Funktionen. Zum einen wird sie für die regelrechte Gonadenmorphogenese benötigt, zum anderen ist sie auch am Verdau der Komponenten der extrazellulären Matrix während der Entwicklung sowie bei

pathologischen Zuständen beteiligt (ECM-Remodellierung). Außerdem zeigt sie eine Beteiligung bei der Förderung des Transports einer Vielzahl von sekretorischen Molekülen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat.

Bei *Neprilysin-1* handelt es sich um eine Endopeptidase. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Neuropeptidspiegel, von der angenommen wird, dass viele für die Modulation der Muskelaktivität in Nematoden verantwortlich sind.

Das *family M13 unassigned peptidases* stellt eine Gruppe von Metallopeptidasen dar, die zur MEROPS-Peptidase Familie M13 gehören. Die M13-Familie umfasst das Neprilysin, das Endothelin-konvertierende Enzym I (ECE-1), das Erythrozytenoberflächenantigen KELL (ECE-3), das phosphatregulierende Gen auf dem X-Chromosom (PHEX), die löslichen sekretierten Endopeptidasen (SEP) und die schädigungsinduzierte neuronale Endopeptidase (DINE)/X-konvertierende Enzym (XCE).

Das *Proteasome subunit beta type-5* stellt eine von 17 Untereinheiten des 20S-Proteasomkomplexes. Sie bildet zusammen mit anderen Beta-Untereinheiten eine proteolytische Kammer für den Substratabbau. Sie spaltet hydrophobe Aminosäuren („Chymotrypsin-like“). Abgebaut werden beschädigte Proteine zur Kontrolle der Proteinqualität oder relevanter regulatorischer Proteinkomponenten für dynamische biologische Prozesse. Eine wesentliche Funktion des Immunproteasoms ist die Verarbeitung von Klasse-I-MHC-Peptiden.

Auch bei *proteasome catalytic subunit 3 (Brugia malayi)* handelt es sich um eine Untereinheit des 20S-Proteasoms.

Die *Aminoacylase-1*, auch *N-acyl-L-amino-acid amidohydrolase* genannt, katalysiert die Hydrolyse von N-acylierten oder N-acetylierten Aminosäuren mit Ausnahme von L-Aspartat.

Die *Prolyl endopeptidase* gehört zur Gruppe der Endopeptidasen. Sie ist eine Prolin-spezifische Serinprotease, die Peptidbindungen an der Carboxylseite von Prolinresten in kurzstreckigen Polypeptidketten (Länge von bis zu 30 Aminosäuren) spaltet.

Das *family M1 unassigned peptidases (Caenorhabditis elegans)* stellt eine Gruppe von Metallopeptidasen dar, die zur MEROPS-Peptidasen Familie M1 gehören. Ein wichtiger Vertreter der Gruppe ist die Aminopeptidase N.

Das *BTB and MATH domain-containing protein 40* ist ein substratspezifischer Adapter eines E3-Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplexes, welcher die Ubiquitinierung und den anschließenden proteasomalen Abbau von Zielproteinen vermittelt.

Bei *Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3* hingegen handelt es sich um eine E2-konjugiertes Enzym, welches für das Zytoplasma zum Vakuolentransport, zur Autophagie sowie zur mitochondrialen Homöostase notwendig ist.

Aminopeptidase N katalysiert die Abspaltung einzelner Aminosäuren vom N-terminalen Ende eines Proteins. Sie dient der Regulierung des Peptidhormonspiegels sowie der Verdauung von Proteinen im Darm.

Das *Netrin unc-6, partial* stellt extrazelluläre Liganden dar, welche an ihre Rezeptoren binden und so eine Rolle bei der Regulation der Axonführung von Nervenzellen spielen.

Bei *subfamily S1A unassigned peptidases (Brugia malayi)* handelt es sich um eine Gruppe von Proteasen aus der Trypsinfamilie. Vertreter dieser Proteasen sind exemplarisch Acrosin, die Blutgerinnungsfaktoren VII, IX, X, XI und XII, Thrombin, Plasminogen und Protein C, das Cathepsin G, Chymotrypsine, die Komplementkomponenten C1r, C1s, C2 und die Komplementfaktoren B,D und I, zytotoxische Zellproteasen, Duodenase I, Elastasen 1,2,3A,3B, Enterokinasen, das Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator, das Hepsin, Drüsenkallikreine, das Plasma-Kallikrein, Mastzellproteasen, das Myeloblastin, die Plasminogenaktivatoren vom Urokinase- und Gewebetyp, Trypsine I, II, III und IV sowie Tryptasen.

Bei *subfamily SB9 unassigned peptidases (Caenorhabditis elegans)* handelt es sich um eine Gruppe von Proteasen, welche einen weiten Bereich von Peptidasenaktivität, einschließlich Exopeptidase-, Endopeptidase-, Oligopeptidase- und Omega-Peptidase-Aktivität umfassen. Vertreter der MEROPS-Peptidase-Familie S9 sind die Prolylendopeptidase, die Oligopeptidase B, die Dipeptidylpeptidase IV, die Dipeptidylaminopeptidasen A und B sowie die Acylpeptidhydrolase.

Serpin B, Serpin-like protein und *Serpin B6* sind Proteine aus der Familie der Serpine und sind in der Lage die Aktivität von Serinproteasen zu inhibieren (Serpin=Serin-Protease-Inhibitoren). Allerdings weisen viele andere Vertreter der Serpin-Familie diese Eigenschaft nicht auf. Die proteasehemmenden Serpine sind in der MEROPS-Datenbank im Clan I4 wiederzufinden. Molehin et al beschreibt 2012, dass Serpine in ES-Produkten

von Nematoden immunologische Reaktionen oder Funktionen abschwächen können (119). Wang et al wiederum berichtet, dass Serpine die Aktivität von Wirtsproteasen, z.B. Trypsin und Chymotrypsin, negativ beeinflussen können. Außerdem wird vermutet, dass Serpine auch die Oberfläche von sich entwickelnden Larven maskieren und so ermöglichen, dass die Larven während ihrer Passage durch den Wirt dem Wirtsimmunsystem entgehen (25).

Es wurden in der Summe 120 ES-Proteine aus der Gruppe des allgemeinen Metabolismus identifiziert, wovon wiederum 26 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 9).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
12	Asuum fasta	hyaluronoglycosaminidase 4	25.0	9.6	32.4
17	Asuum fasta	putative achaete scute target 1	72.5	9.5	17.0
177	Asuum fasta	Past1; putative achaete scute target 1	72.5	9.5	17.0
18	Asuum fasta	MFP2	38.1	6.7	44.1
20	ES Nematoden	MFP2	44.3	9.1	40.2
24	Asuum fasta	Uridine-cytidine kinase 2-B	28.6	6.5	20.4
25	Asuum fasta	uridine monophosphate kinase	31.9	8.0	18.3
32	ES Nematoden	SNF2 family N-terminal domain containing protein	103.5	6.9	17.4
38	Asuum fasta	DNA topoisomerase 2 [Ascaris suum]	158.5	9.2	21.0
39	Asuum fasta	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	44.6	6.3	35.1
44	Asuum fasta	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	20.2	9.8	40.0
48	ES Nematoden	Vacuolar assembly protein VPS41 homolog	92.3	5.6	26.2
49	Asuum fasta	Import inner membrane translocase subunit tim-44, partial	37.2	6.3	40.6
50	ES Nematoden	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto aciddehydrogenase complex	15.8	7.6	45.1
52	Asuum fasta	protein sorting-associated protein 13b	230.9	5.7	15.7
61	Asuum fasta	Genome polyprotein	349.9	5.4	15.6
73	Asuum fasta	Endoribonuclease dcr-1	224.2	5.5	17.2
86	Asuum fasta	Structural maintenance of chromosomes protein 2	136.3	8.5	28.7
97	Asuum fasta	DNA polymerase I	118.4	5.6	20.2
103	Asuum fasta	Bloom syndrome protein	122.0	9.7	13.8
107	Asuum fasta	Golgin subfamily A member 5	67.4	6.1	19.7
135	ES Nematoden	DNA replication licensing factor MCM5	31.0	9.6	27.2
180	Asuum fasta	DNA replication licensing factor mcm-5	61.9	9.6	26.7
139	Asuum fasta	Apolipoprotein	353.4	9.4	13.3
152	ES Nematoden	Ribophorin I family protein	64.0	8.9	24.3
153	Asuum fasta	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	64.5	7.1	25.8
165	Asuum fasta	Alkylated DNA repair protein alkB 1	43.6	9.5	34.4
167	Asuum fasta	Rabenosyn-5	66.7	5.9	30.7
170	ES Nematoden	Tomosyn (vertebrate synaptic protein)	18.1	9.0	67.7
171	Asuum fasta	ATP-dependent RNA helicase DDX41	73.6	6.4	28.6
174	Asuum fasta	Multidrug resistance-associated protein 1	139.6	9.2	10.1
178	Asuum fasta	EH domain-containing protein 4	72.6	9.4	15.9
187	ES Nematoden	Cu/Zn superoxide dismutase	10.6	6.3	63.7
188	Asuum fasta	Superoxide dismutase Cu-Zn	16.9	6.0	51.6
206	ES Nematoden	kinase 2	43.8	9.0	27.7
214	ES Nematoden	kinase 8	25.4	9.9	26.4
209	Asuum fasta	Protein lin-7 B	20.3	10.1	47.5
210	Asuum fasta	Beta 1,4-mannosyltransferase egh	56.9	8.9	28.2
215	Asuum fasta	Chain A, The Solution Structure Of Aba-1a Saturated With Oleic Acid	15.2	6.1	64.9
216	Asuum fasta	polyprotein allergen/antigen	126.0	8.8	13.5
217	Asuum fasta	allergen, partial	45.1	7.9	23.8
303	Asuum fasta	Polyprotein ABA-1	122.3	9.0	29.9
349	ES Nematoden	ABA-1 (Fragment)	108.3	9.0	33.4
226	ES Nematoden	tRNA modification GTPase TrmE family protein	21.4	10.1	27.4
229	ES Nematoden	3-dehydrogenase	26.1	5.4	26.3
240	ES Nematoden	Type III restriction enzyme, res subunit family protein	77.9	9.3	23.6
259	Asuum fasta	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	91.3	5.1	13.2
262	ES Nematoden	oligomeric Golgi complex subunit 3	83.9	5.6	14.4
270	Asuum fasta	Lig3; ligase III, DNA, ATP-dependent	65.9	10.1	15.2
274	Asuum fasta	Cold-shock' DNA-binding domain containing protein	28.7	11.0	25.8
305	Asuum fasta	DNA topoisomerase 2	172.2	9.0	16.7
334	Asuum fasta	Chromatin-remodelling complex ATPase chain isw-1	121.6	6.4	20.3
14	Asuum fasta	Tissue factor pathway inhibitor, partial	128.7	5.5	12.8
83	Asuum fasta	Multifunctional protein ADE2	28.0	9.6	49.6
155	Asuum fasta	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	362.1	5.8	12.7
43	ES Nematoden	CDKSRAP3-like protein	57.6	5.0	27.5
3	Asuum fasta	Partitioning defective protein 3	130.9	9.9	17.1
318	Asuum fasta	Cell division cycle 5-related protein	86.5	6.7	22.2
341	ES Nematoden	replication licensing factor MCM7; minichromosome maintenance protein 7 (cell division control protein 47)	83.4	5.8	23.2
62	ES Nematoden	Epithelial Na+ Channel (ENaC) Family Mechanosensory protein 2	31.5	4.8	37.3
93	Asuum fasta	Canalicular Bile Acid Transporter (C-BAT) Family Selenoprotein P Receptor Family LDL receptor-related protein 2	25.8	9.2	36.8

113	ES Nematoden	Na ⁺ -transportin Carboxylic Acid Decarboxylase (NaT-DC) Family Methylmalonyl-CoA decarboxylase gamma chain	81.8	9.1	21.6
116	ES Nematoden	Voltage-gated K ⁺ Channel beta-subunit (Kvbeta)	40.3	5.1	34.1
142	ES Nematoden	Transient Receptor Potential Ca ²⁺ Channel (TRP-CC)	55.9	10.0	30.3
151	ES Nematoden	Toxic Hok/Gef Protein (Hok/Gef) Family Putative Cholesterol Transporter (Start1)	25.7	7.8	52.6
175	ES Nematoden	Cation Symporter Family Glycoside-Pentoside-Hexuronide	17.8	10.5	36.5
179	ES Nematoden	Protein transport protein SEC61 beta subunit	9.5	12.3	51.1
190	ES Nematoden	H ⁺ -or Na ⁺ -translocating F-type, V-type and A-type ATPase	79.7	9.0	9.2
223	ES Nematoden	Synaptosomal Vesicle Fusion Pore (SVF-Pore)	93.3	6.4	27.8
230	Asuum fasta	multivesicular body protein 2a	31.5	9.1	24.5
231	ES Nematoden	K ⁺ channel tetramerisation domain containing protein	9.3	4.2	37.3
299	Asuum fasta	Annexin Family Ryanodine-Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor Ca ²⁺ Channel (R.R-CaC)	42.5	4.8	34.2
31	ES Nematoden	ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily Nuclear mRNA Exporter (mRNA-E) Family Eukaryotic initiation factor 4A-III	84.0	6.7	16.6
9	ES Nematoden	Non ABC Multidrug Exporter (N-MDE)	49.4	10.3	38.7
313	ES Nematoden	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	101.2	4.9	39.2
221	Asuum fasta	Non ABC Multidrug Exporter (N-MDE)	65.3	6.9	19.6
296	Asuum fasta	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	37.2	4.8	22.2
6	Asuum fasta	Vitellogenin-6	207.3	6.9	22.6
5	Asuum fasta	Vitellogenin-6	104.5	9.6	38.2
4	ES Nematoden	vit-5	199.7	7.9	23.4
191	Asuum fasta	Syntenin-1	23.3	9.6	44.8
16	Asuum fasta	Sorting nexin-1	50.8	5.6	32.1
78	Asuum fasta	Transmembrane protein 66	32.9	8.8	23.5
79	ES Nematoden	vasopressin-activated calcium mobilizing putative receptor protein	94.4	8.7	22.3
150	Asuum fasta	Golgi apparatus protein 1	139.2	6.0	23.2
168	ES Nematoden	FYVE zinc finger family protein	66.7	5.9	30.7
227	Asuum fasta	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	140.3	5.3	7.9
252	Asuum fasta	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	25.5	10.2	38.2
298	Asuum fasta	Annexin A11	36.6	5.0	45.3
33	Asuum fasta	Transmembrane and TPR repeat-containing protein	86.3	10.0	24.9
88	Asuum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin	32.5	6.7	49.3
173	Asuum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin	31.8	6.4	39.7
258	Asuum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin lec-3	38.5	8.7	44.6
87	Asuum fasta	Urate Transporter (UAT) Family GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GA-LACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL)	33.3	6.7	118.0
260	ES Nematoden	Incompletely characterized transport systems; Putative transport proteins; Urate Transporter (UAT) Family; GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL) (UAT) - Rattus norvegicus (Rat)	37.9	6.8	47.0
172	ES Nematoden	Urate Transporter (UAT) Family GALECTIN-9 (36 KDA. BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN)	48.0	6.5	24.2
248	Asuum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160	47.6	9.4	41.2
249	Asuum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160	43.1	5.7	50.6
266	Asuum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160	39.5	7.0	42.5
282	Asuum fasta	C-type lectin protein 160, partial	55.5	4.8	31.6
328	Asuum fasta	C-type lectin protein 160	60.1	8.5	27.2
327	ES Nematoden	C-type LECTin family member (clec-62)	38.3	5.4	42.5
89	Asuum fasta	Chain A, The Structure Of Ascaris Hemoglobin Domain I	17.9	6.3	50.7
197	Asuum fasta	Glutathione S-transferase 2	19.4	6.9	32.1
198	ES Nematoden	Glutathione-S-transferase	29.7	5.8	28.4
100	Asuum fasta	hemoglobin	40.6	6.1	32.8
102	Asuum fasta	Extracellular globin	40.6	6.1	32.8
40	ES Nematoden	Melibiase family protein	47.4	6.3	32.9
64	ES Nematoden	UDPglucose 6-dehydrogenase	54.6	6.8	12.7
131	Asuum fasta	Peroxioredoxin	21.5	7.8	36.9
132	Asuum fasta	thioredoxin peroxidase	21.6	6.2	36.9
213	Asuum fasta	alpha/beta-glucosidase agdC	108.9	5.1	21.1
278	Asuum fasta	Globin-like protein 9	56.2	10.5	16.1
281	ES Nematoden	glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase	21.3	7.7	44.6
293	Asuum fasta	2-oxoglutarate dehydrogenase, partial	12.8	10.1	52.3
309	Asuum fasta	acyltransferase	50.2	9.6	27.6
322	ES Nematoden	beta-lactamase TEM	13.1	5.7	49.1
337	ES Nematoden	PH domain containing protein; K07187 insulin receptor substrate 1	110.3	6.0	22.7
346	Asuum fasta	NADH dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur protein 7	23.3	10.4	21.4
183	Asuum fasta	Sulfhydryl oxidase 1	77.5	8.9	12.5

Tabelle 9: Allgemeiner Metabolismus

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

Die *Hyaluronoglucosaminidase 4* ist ein Protein, welches als Chondroitinsulfat-spezifische Endo-Beta-N-Acetylgalactosaminidase wirkt, d.h. es wirkt hydrolytisch gegenüber Chondroitinsulfatketten und sorgt für den Abbau dieser in Oligosaccharide. Die Bildung von Proteoglykanen erfolgt durch die kovalente Bindung von Chondroitinsulfatketten an Proteine. Proteoglykane stellen einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix von Bindegeweben dar. Außerdem finden sich Proteoglykane an der Oberfläche vieler Zelltypen, wo sie eine Beteiligung an einer Vielzahl von zellulären Prozessen aufweisen. Hierzu gehört die Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Zell-Zell-Gewebemorphogenese, die extrazelluläre Matrixablagerung und Gewebemorphogenese.

Das *putative achaete scute target 1* spielt eine Rolle bei der Endozytose von IGF1-Rezeptoren.

Das *MFP2* ist ein Protein, welches die MSP-Polymerisation im Rahmen der *Ascaris*-Spermienmotilität verstärkt (120).

Uridine-cytidine kinase 2-B, welches auch als Uridine kinase bezeichnet wird, ist an der CTP-Biosynthese aus Cytidin beteiligt und bildet hierbei den ersten von drei Schritten. Außerdem ist dieses Enzym in der Lage Uridin zu phosphorylieren und somit zu UMP umzuwandeln. Auch das *uridine monophosphate kinase* wandelt unter demselben Mechanismus Uridin in UMP um und ist somit am Pyrimidinmetabolismus beteiligt.

Das *SNF2 family N-terminal domain containing protein* gehört zur Gruppe an Proteinen, welche an vielen zellulären Prozessen wie z.B. Transkriptionsregulation, DNA-Reparatur, DNA-Rekombination und Chromatin-Abwicklung beteiligt sind.

Die *DNA topoisomerase 2* katalysiert das ATP-abhängige Brechen und Wiederverbinden von doppelsträngiger DNA.

Die *Alpha-N-acetylgalactosaminidase* gehört zur Gruppe der Glykosidasen und katalysiert die Abspaltung des N-Acetylgalactosaminrests von Glykoproteinen und Glykolipiden sowie Proteoglykanen.

Das *Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform* ist für den Transport von Phospholipiden zwischen Membranen verantwortlich. Zu den Phospholipiden gehört exemplarisch das Phosphatidylinositol sowie das Phosphatidylcholin.

Das *Vacuolar assembly protein VPS41 homolog* wirkt am vesikelvermittelten Proteintransport in lysosomale Kompartimente. Hierzu werden auch der endozytische Membrantransport sowie die autophagischen Pfade gezählt.

Das *Import inner membrane translocase subunit tim-44* ist ein Baustein, welches durch Rekrutierung von mitochondrialen HSP70 und seinen Co-Chaperonen dafür sorgt, dass eine Proteintranslokation von der inneren Membran in die Matrix des Mitochondriums unter Verwendung von ATP als Energiequelle möglich wird.

Das *Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto-aciddehydrogenase complex* bildet einen von drei enzymatischen Komponenten des Alpha-Keto-Dehydrogenase-Komplexes, welches Alpha-Ketosäuren zu Acyl-CoA und Kohlenstoffdioxid katalysieren. Sie ist bei Zuckermangel erforderlich und unterliegt somit einem Art Zuckersensormechanismus, an welchem wiederum Serin/Threonin-Kinasen und Phosphatasen beteiligt sind.

Das *protein sorting-associated protein 13b* ist ein Baustein des Golgi-Apparats und wirkt an der Sortierung und am Transport von Proteinen innerhalb der Zelle.

Das *Genome polyprotein* spielt eine Rolle bei der Virusreplikation. Sie zeigt eine RNA-Bindungs-, und Nukleotidbindungsaktivität. Außerdem kann sie die Autophagie der Wirtszellen fördern.

Die *Endoribonuclease dcr-1 bzw. das DCR-1* ist an der Spaltung doppelsträngiger RNA im RNA-Interferenz (RNAi)-Pfad beteiligt. Sie ist erforderlich für das Vermeidungsverhalten von kleinen RNAs, welche wiederum von pathogenen Bakterien stammen.

Das *Structural maintenance of chromosomes protein 2* gehört zu den SMC-Komplexen, welche wiederum eine große Familie von ATPasen darstellen, die an vielen Aspekten der Organisation und Dynamik von Chromosomen höherer Ordnung beteiligt sind.

Die *DNA polymerase I*, auch *DNA-directed DNA polymerase* genannt, katalysiert die DNA-Synthese aus Desoxyribonukleotiden an einer DNA-Matrize.

Das *Bloom syndrome protein*, auch *DNA helicase* genannt, kommt im Zellkern vor und zeigt eine Beteiligung bei der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden.

Bei *Golgin subfamily A member 5*, auch *Golgin-84* genannt, handelt es sich um einen integralen Bestandteil des Golgi-Apparats, welches zum Anbinden bzw. zur Andockung von Vesikeln an die Golgi-Membran benötigt wird.

Das *DNA replication licensing factor MCM5* bzw. *DNA replication licensing factor mcm-5* ist Bestandteil des MCM-Komplexes, welches wiederum mutmaßlich einer replikativen Helikase entspricht. Diese ist für die Initiierung und Verlängerung der DNA-Replikation essenziell.

Das *Apolipoprotein* gehört zur Familie der austauschbaren Apolipoproteinen, welche wiederum eine wichtige Rolle beim Lipidtransport und auch beim Lipoproteinstoffwechsel einnehmen.

Das *Ribophorin I family protein* ist ein Baustein des Oligosaccharyltransferase-Komplexes, welcher wiederum in der Membran vom Endoplasmatischen Retikulum wiederzufinden ist und für die N-Glykosylierung von anderen Proteinen notwendig ist.

Das *Alpha-(1,6)-fucosyltransferase* gehört zur Familie der Glykosyltransferasen, welche wiederum im Rahmen der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteine Glykosylreste entweder als N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum oder als O-Glykosylierung im Golgi-Apparat übertragen. Glykosyltransferasen katalysieren zudem die Glykosylierung von Glykolipiden.

Bei *Alkylated DNA repair protein alkB 1* handelt es sich um eine Dioxygenase, welches für die Reparatur von Alkylierungsschäden an DNA und RNA verantwortlich ist.

Das *Rabenosyn-5* wirkt an der Membranfusion von frühen Endosomen und spielt eine Rolle beim Endosomen-Recycling.

Das *Tomosyn* reguliert die Exozytose von synaptischen Vesikeln.

Das *ATP-dependent RNA helicase DDX41*, auch *RNA helicase* genannt, ist nahezu an allen RNA-Stoffwechselprozessen (Transkription), dem RNA-Processing, der Translation und auch dem RNA-Abbau beteiligt.

Das *Multidrug resistance associated protein 1* transportiert ein breites Spektrum von Substraten, einschließlich Arzneimittel, Schwermetallione, Giftstoffe und Konjugate von Glutathion, Glucuronid sowie Sulfate und kann mit einer Arzneimittelresistenz und Krankheitsanfälligkeit einhergehen.

Das *EH domain-containing protein 4* ist ein ATP- und membranbindendes Protein, welches die Membranreorganisation steuert. Sie spielt eine entscheidende Rolle beim frühen endosomalen Transport.

Die *Cu/Zn superoxide dismutase* bzw. *Superoxide dismutase Cu-Zn* hat die Funktion Radikale (Superoxide), welche in den Zellen produziert werden und eine toxische Wirkung auf biologische Systeme zeigen, zu eliminieren.

Kinase 2 und *kinase 8* gehören zur Gruppe der Proteinkinasen, welche den Transfer des Gammaphosphats von Nukleotidtriphosphaten (in den meisten Fällen ATP) zu einem oder mehreren Aminosäurenresten eines Proteins ermöglichen und dadurch zu einer Konformationsänderung des betroffenen Proteins herbeiführen, sodass die Funktion des Proteins beeinflusst wird. Diese Phosphorylierung ist ein reversibler Prozess und kann durch Phosphoproteinphosphatasen rückgängig gemacht werden.

Das *Protein lin-7 B* ist ein Bestandteil des Komplexes aus LIN7A, LIN7B, LIN7C, CASK und APBA-1, welches gekoppelt an das Motorprotein KIF17 den Transport von Vesikeln entlang der Mikrotubuli ermöglichen. Hierbei handelt es sich um ein Vesikel, welches die N-Methyl-D-Aspartat (kurz: NMDA) -Rezeptoruntereinheit NR2B enthält.

Bei *Beta 1,4-mannosyltransferase Egh* handelt es sich um ein Homolog von *Drosophila-egghead* (Egh). Sie bildet einen Teil des Vier-Komponenten-Glykosylierungsweges, welches der Resistenz gegen bakterielle Toxine dient.

Bei *Chain A, The Solution Structure of ABA-1a saturated with oleic acid*, das *polyprotein allergen/antigen*, das *allergen, partial*, das *Polyprotein ABA-1* und auch das *ABA-1 (Fragment)* handelt es sich um das Polyprotein ABA-1 oder um Bestandteile desselben. Das Polyprotein ABA-1 gehört zur Gruppe der Nematoden-Polyprotein-Allergene (NPA). NPAs bilden wiederum eine Klasse von Lipid-bindenden Proteinen, welche nur in Nematoden vorkommen. Diese werden als große, sich tandemartig wiederholende Polyproteine hergestellt und anschließend posttranslational in kleine Lipidbindungsproteine gespalten. Sie spielen eine zentrale Rolle beim Transport kleiner hydrophober Verbindungen zwischen den Geweben von Nematoden. Zudem wirken sie bei der Nährstoffaufnahme, der Immunmodulation sowie den IgE-Antikörper-basierenden Reaktionen bei Infektionen mit. Bei den meisten Nematodenarten, insbesondere ascariden und filarialen Nematoden, ist die Wiederholungseinheit der NPAs identisch. Das ABA-1 ist hierbei die am häufigsten vorkommende Wiederholungseinheit.

Das *tRNA modification GTPase TrmE family protein* ist ein im Mitochondrium befindliches Protein, welches an der tRNA-Modifikation beteiligt ist.

Bei *3-dehydrogenase* bzw. L-Threonin-3-Dehydrogenase handelt es sich um ein zinkbindendes, NAD-abhängiges Enzym, welches am Threonin-Katabolismus beteiligt ist.

The Type III restriction enzyme, res subunit family protein ist ein Bestandteil der DEAD- und DEAH-Box-Helikasen, welche am Abwickeln von Nukleinsäuren beteiligt sind.

Das *Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3* bildet eine Komponente des konservierten oligomeren Golgi (COG)-Komplexes und ist für die normale Golgi-Morphologie und -Lokalisierung erforderlich.

Die *Lig3; ligase III, DNA, ATP-dependent* ist eine DNA-Ligase, d.h. es verbindet DNA-Fragmente im Rahmen der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und DNA-Rekombination.

Das *Cold-shock DNA-binding domain containing protein* gehört zu den sogenannten „Kälteschock“-Proteinen von Zellen, welche dafür sorgen, dass die Zellen bei Temperaturen, die unter der optimalen Wachstumstemperatur liegen, überleben.

Die *DNA topoisomerase 2* dient der Kontrolle der topologischen DNA-Zustände durch temporäres Brechen und anschließendes Wiederverbinden von DNA-Strängen.

Das *Chromatin-remodelling complex ATPase chain isw-1* enthält eine energieübertragende Komponente eines Nucleosom-Remodeling-Faktor-ähnlichen Komplexes, welcher das ATP-abhängige Gleiten von Nucleosomen katalysieren und die Transkription von Chromatin erleichtern.

Das *Tissue factor pathway inhibitor* kann eine reversible Hemmung von Faktor Xa bewirken.

Das *Multifunctional protein ADE2*, auch SAICAR synthetase genannt, ist an der IMP-Biosynthese über den De-novo-Weg beteiligt, welches wiederum einen Teil des Purinstoffwechselwegs darstellt.

Das *Vacuolar protein sorting-associated protein 13A* ist ein Protein, welches für die Bildung und auch Stabilisierung von ER-Mitochondrien-Kontaktstellen für den Transfer von Lipiden notwendig ist.

Das *CDK5RAP3-like protein* gilt als potenzieller Regulator der CDK5-Aktivität. Bei CDK5 wiederum handelt es sich um eine Kinase, welches in vielen zellulären Prozessen, u.a. Exozytose synaptischer Vesikel, beteiligt ist.

Partitioning defective protein 3 sorgt für eine asymmetrische Zellteilung sowie für das polarisierte Wachstum während der Embryogenese.

Bei *Cell division cycle 5-related protein* handelt es sich um ein DNA-bindendes Protein, welches an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist. Es kann als Transkriptionsaktivator Wirkung zeigen. Außerdem spielt sich eine Rolle beim prä-mRNA-Spleißen als wichtige Komponente von vorkatalytischen, katalytischen und postkatalytischen Spleißosomkomplexen.

Das *replication licensing factor MCM7; minichromosome maintenance protein 7 (cell division control protein 47)* stellt ein Baustein des MCM-Komplexes dar, welches als DNA-Helikase für die Initiierung der DNA-Replikation im Rahmen der Zellteilung relevant ist.

Beim *Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) Family Mechanosensory protein 2* handelt es sich einen membranständigen, konstitutiv aktiven Ionenkanal, welcher neben Natriumionen auch durchlässig für Protonen und Lithium-Ionen ist. Die ENaC spielt eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Na⁺- und K⁺-Konzentrationen in Epithelien sowie extrazellulären Flüssigkeiten.

Das *Canalicular Bile Acid Transporter (C-BAT) Family Selenoprotein P Receptor Family LDL receptor-related protein 2*, auch Megalin genannt, findet sich in der Epithelgewebemembran und spielt eine wesentliche Rolle bei der Absorption vieler Stoffe in die Zelle durch Membrantransport (Endozytose).

Das *Na⁺-transportin Carboxylic Acid Decarboxylase (NaT-DC) Family Methylmalonyl-CoA decarboxylase gamma chain* ist Bestandteil der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, welches wiederum zur NaT-DC-Familie gehört. Durch die im Rahmen der Decarboxylierung gewonnen Energie werden bis zu zwei Natriumionen aus dem Zytoplasma der Zelle ausgeschleust. Bislang ist dieses System nur von Bakterien bekannt.

Voltage-gated K⁺ Channel beta subunit ist ein wichtiger Bestandteil spannungsabhängiger Kaliumkanäle und modifiziert das K⁺-Kanal-Gating.

Bei *Transient Receptor Potential Ca²⁺ Channel (TRP-CC)* handelt es sich um einen Kalziumkanal mit transienten Rezeptorpotential.

Das *Toxic Hok/Gef Protein (Hok/Gef) Family Putative Cholesterol Transporter (Start1)* ist an dem Cholesterintransport beteiligt. Bei START handelt es sich hierbei um die lipidbindende Domäne.

Das *Cation Symporter Family Glycoside-Pentoside-Hexuronide* katalysiert die Aufnahme von Zuckermolekülen (meistens Glykoside) in Symport mit einem einwertigen Kation, exemplarisch H⁺ oder Na⁺, aber auch Lithium-Ionen.

Das *Protein transport protein SEC61 beta subunit* bildet eine Untereinheit des kanalbindenden SEC61-Translokokomplexes, welcher den Transport von Signalpeptidhaltigen Vorläuferpolypeptiden durch das endoplasmatische Retikulum vermittelt.

Das *H⁺-or Na⁺-translocating F-type, V-type and A-type ATPase* ist ein membranständiges Enzym, welches mittels der Energie aus der ATP-Hydrolyse einen Protonengradienten erzeugt. In Endosomen exemplarisch sorgen H⁺ ATPasen vom V-type dafür, dass durch Erniedrigung des pH-Wertes internalisierte Rezeptoren sich von ihren Liganden trennen, sodass der Rezeptor recycelt werden kann.

Das *Synaptosomal Vesicle Fusion Pore (SVF-Pore)* ist ein Protein, welches bei der Fusion von Membranen, zum Beispiel im Rahmen einer Exozytose von Vesikeln, mitwirkt. Es kommt zur Verschmelzung der Zellmembran mit der Vesikelmembran.

Das *multivesicular body protein 2a* spielt eine Rolle bei der endosomalen Sortierung von in multivesikuläre Körperchen verpackte Frachtproteinen, welche anschließend in den meisten Fällen durch Fusion mit Lysosomen enzymatisch abgebaut werden.

Das *K⁺ channel tetramerisation domain containing protein* stellt einen Bestandteil der N-terminalen zytoplasmatischen Tetramerisierungsdomäne von spannungsgesteuerten K⁺-Kanälen dar. Sie ist verwandt mit der BTB/POZ-Domäne.

Das *Annexin Family Ryanoidine-Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor Ca²⁺ Channel (R.R-CaC)* umfasst Ryanoidin-Rezeptoren bzw. Inositol-Triphosphat-Rezeptoren, welche in der Membran vom Endoplasmatischen Retikulum bzw. Sarkoplasmatischen Retikulum auftreten und bei Aktivierung bzw. Öffnung des Kanals eine Freisetzung von Kalziumionen (Ca²⁺) in das Zytoplasma bewirken.

Das *ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily Nuclear mRNA Exporter (mRNA-E) Family Eukaryotic initiation factor 4A-III* ist Bestandteil des Spleißosoms und somit am Prä-mRNA-Spleißen beteiligt.

Bei *EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1* handelt es sich um eine eng verwandte Untergruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. EGF-Modul enthaltende, Mucin-ähnliche Hormonrezeptoren (EMR) werden überwiegend in Immunzellen exprimiert und binden Liganden wie zum Beispiel CD55.

Das *Non ABC Multidrug Exporter (N-MDE)* spielt mutmaßlich eine Rolle bei der transportvermittelten Arzneimittelresistenz.

Das *Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha* ist ein wichtiger Baustein für den Transfer einer Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Einheit von Farnesyl- bzw. Geranylgeranyldiphosphat auf ein Cystein an der vierten Position vom C-Terminus mehrerer Proteine mit C-terminalen Sequenz Cys-aliphatisch-aliphatisch-X. Diese Proteine können anschließend an die Zellmembran verankert werden. Der beschriebene Mechanismus wird insgesamt auch als (posttranslationale) Prenylierung bezeichnet. Zu den wichtigen prenylierbaren Proteinen gehört das RAS-Protein, welches als Signaltransduktionsprotein u.a. essenziellen Einfluss auf Zellwachstum und -differenzierung hat.

Die Proteine *Vitellogenin-6* und *vit-5* sind im Darm synthetisierte, carbonylierte Eidotterproteine, welche vielfältige Funktionen aufweisen können. Im Larvenstadium steht hierbei die Funktion als Nährstoff- und Energielieferant im Vordergrund. Untersuchungen an *C. elegans*-Würmern im Adultstadium hingegen haben ergeben, dass Vitellogenin-6 aufgrund der nachgewiesenen Metallionen-Bindungskapazität eine Antioxidansfunktion zugesprochen wurde (121). Dies soll eine Langlebigkeit der adulten Würmer ermöglichen.

In vielen Organismen beeinflusst *Syntenin-1* aufgrund der funktionellen Vielfalt seiner Bindungspartner viele intrazelluläre Prozesse. Somit ist sie relevant für das Zellwachstum, die Entwicklung und auch für die Zelldifferenzierung. Welche Rolle Syntenin-1 bei *Ascaris suum* spielt, ist bislang nicht erforscht. Allerdings zeigen Untersuchungen an der Trematode *Schistosoma mansoni*, dass bei Mäusen die Injektion von rekombinant hergestellten Syntenin eine Th1-Immunantwort induzieren sowie die Wurmlast und die Anzahl der Leberpathologien verringern kann (122).

Beim Protein *Sorting Nexin-1* wird angenommen, dass sie den Abbau internalisierter EGF-Rezeptoren (internalized epidermal growth factor-receptor) durch Bindung seiner Phox-Domäne an Phosphatidylinositol-3-monophosphat und Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat reguliert.

Das *Transmembran protein 66*, auch Store-operated calcium entry-associated regulatory factor genannt, schützt die Zelle vor einer Ca^{2+} -Überladung. Nach dem Nachfüllen des endoplasmatischen Reticulums mit Ca^{2+} -Ionen wird durch Inaktivierung der SOCE (store-operated calcium entry)-Aktivität eine weitere Ca^{2+} -Einfuhr in die Zelle verhindert.

Das *vasopressin activated calcium mobilizing putative receptor protein* zeigt einen inhibierenden Effekt auf die zelluläre Proliferation.

Das *Golgi apparatus protein 1* wird auch als Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor bezeichnet und bindet an den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) sowie E-Selektin, welches als Zelladhäsionslektin auf Endothelzellen die Bindung von Neutrophilen vermittelt.

Das *FYVE zinc finger family protein* besitzt eine FYVE-Zinkfinger-Domäne, welche Phosphatidylinositol-3-phosphat in Abhängigkeit von seiner Metallionenkoordination und den basischen Aminosäuren binden kann. Die Domäne ist nach den cysteinreichen Proteinen Fab1, YOTB, Vac 1 und EEA1 benannt.

Das *KN motif and ankyrin repeat domain containing protein 1* spielt eine Rolle bei der Zytoskelettbildung. Es kann durch Hemmung der Bildung von Aktinfasern die Aktinfaserpolymerisation regulieren.

Das *Thioredoxin-related transmembrane protein 2* stellt ein Protein dar, welches am endoplasmatischen Retikulum und an Mitochondrien assoziiert ist, und wahrscheinlich zelluläre Redoxzustände reguliert. Somit ergibt sich eine Regulatorfunktion an posttranslationalen Proteinmodifikationen, an der Proteinfaltung und der Mitochondrienaktivität der Zelle.

Annexin A11 ist ein Calcium-abhängig Phospholipid-bindendes Protein, welches eine wichtige Rolle bei der Zellteilung, dem Vesikeltransport und der Apoptose spielt.

Bei *Transmembrane and TPR repeat-containing protein*, auch Dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase genannt, handelt es sich um eine Glykosyltransferase.

Bei den Proteinen *32 kDa beta-galactoside-binding lectin*, *32 kDa beta-galactoside-binding lectin lec-3* und dem mehrfach identifizierten *36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN* handelt es sich um Galektine. Zudem wurde mehrere C-Typ-Lektin-Domänen-enhaltende Proteine mit dem Namen *C-type lectin domain-containing protein 160* nachgewiesen. Des Weiteren wurden das *C-type lectin protein 160* sowie das *C-type Lectin family member (clec-62)* identifiziert. Diese Lektine, Galektine und C-Typ-Lektin-Domänen-enhaltende Proteine spielen eine Rolle bei der Nematodenabwehr vor der mikrobiellen Umgebung im Darmtrakt des Wirtes (123).

Bei *Chain A, The Structure of Ascaris Hemoglobin Domain I* handelt es sich um einen Bestandteil des *Ascaris-suum*-Hämoglobins, welches in der perienterischen Flüssigkeit nachweisbar ist und sich verglichen mit den Säugetier-Hämoglobinen mit einer besonders hohen Sauerstoffaffinität kennzeichnet (124).

Das Protein *Glutathion-S-transferase 2* bzw. *Glutathion-S-transferase* gehört zu den Entgiftungsenzymen, welche die nukleophile Addition des Tripeptids Glutathion an endogene und xenobiotische Toxine katalysieren. Die Glutathion-S-transferase (GST) zeigt sich zudem als schützendes Antigen bei der Impfung gegen Trematodeninfektionen (125, 126). Insgesamt kristallisiert sich die GST als wichtiges Protein für das Überleben des Parasiten im Wirt, weshalb es auch ein potenzielles Ziel für die Impfung gegen Parasiteninfektionen darstellt.

Das Protein *hemoglobin* bzw. *Extracellular globin* zeichnet sich durch eine sehr hohe Sauerstoffaffinität aus. Sie könnte als Sauerstofffänger für die Sterolbiosynthese verwendet werden.

Melibiase family protein spielt eine Rolle beim Abbau von zuckerhaltigen Fettstoffen (Glykosphingolipiden).

Die *Udp-glucose 6-dehydrogenase* wandelt UDP-alpha-D-Glucose in UDP-alpha-D-Glucuronat um, welches als Ausgangsmaterial für die Glykosaminoglykan-Synthese (Hyaluron, Chondroitinsulfat und Heparansulfat) dient.

Das *Peroxiredoxin* ist eine thiol-spezifische Peroxidase, welche die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser bzw. Alkoholen katalysiert.

Bei *thioredoxin peroxidase* handelt es sich genauso wie Peroxiredoxin um ein Antioxidans, welches die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden zu Wasser bzw. Alkoholen katalysiert. Dadurch bietet sie den Parasiten Schutz vor Sauerstoffradikalen, welche von den Immuneffektorzellen freigesetzt werden.

Die *alpha/beta-glucosidase agdC* gehört zur Gruppe der Glykosylhydrolasen, welche die glykosidische Bindung zwischen zwei oder mehr Kohlenhydraten oder einer Kohlenhydrat- und einer Nicht-Kohlenhydrat-Einheit hydrolysieren.

Das *Globin-like protein 9* zeichnet sich durch seine Häm- und Sauerstoffbindungsfunktion aus.

Die *glycoprotein-6-alpha-L-fucosyltransferase* gehört zur Gruppe der Glykosyltransferasen. Diese finden sich in der Regel im Rahmen der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen entweder als N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum oder als O-Glykosylierung im Golgi-Apparat. Auch die Glykosylierung von Glykolipiden wird durch Glykosyltransferasen katalysiert. Hier erfolgt beim glycoprotein-6-alpha-L-fucosyltransferase der Fucose-Transfer von GDP-Fucose zu N-verknüpften komplexen Glykopeptiden.

Die *2-oxoglutarate dehydrogenase* ist Bestandteil des Citrazyklus und wirkt an der Umwandlung von 2-Oxoglutarat in Succinyl-CoA.

Das Protein *acyltransferase* sorgt für die Übertragung eines Acylrestes von einem Donor auf einen Akzeptor.

Beta-lactamase, TEM gehört zu den Klasse A Beta-Laktamasen, welche in der Lage sind, ein großes Spektrum an β -Laktam-haltigen Antibiotika zu spalten.

Das *PH domain containing protein; K07187 insulin receptor substrate 1* spielt eine Schlüsselrolle bei der Signalübertragung von Insulinrezeptoren und Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptoren (IGF-1-Rezeptoren) zu den intrazellulären PI3K/Akt- und Erk MAP-Kinasewegen.

Bei *NADH dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur protein 7* handelt es sich um eine für die katalytische Aktivität relevante Untereinheit des Komplex I (NADH Dehydrogenase)

der Atmungskette, welches eine Oxidoreduktase darstellt. Hierbei wird NADH oxidiert, das Ubichinon (Coenzym Q) reduziert und es kommt zur Protonentranslokation aus dem Matrixraum in den Intermembranraum des Mitochondriums.

Die *Sulphydryl oxidase 1* katalysiert die Bildung von Disulfidbrückenbindungen aus Thiolgruppen. Hierbei kommt es auch zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid.

Es wurden in der Summe 62 ES-Proteine aus der Gruppe der Nicht-klassifizierbaren Proteine identifiziert, wovon wiederum 9 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 10).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
10	Asum fasta	protein 17	20.3	9.3	35.2
29	ES Nematoden	WBGene00004127 locus:pqn-40 status:Partially_confirmed	26.1	10.5	42.8
35	ES Nematoden	WBGene0002 1078 status:Partially_confirmed	50.2	9.1	46.3
45	ES Nematoden	protein C01C10.2	33.6	5.7	33.8
57	ES Nematoden	CBR-GST-7 protein	17.4	4.9	30.7
58	Asum fasta	WBGene00077763 status:Predicted	15.9	10.5	59.0
66	ES Nematoden	subunit processome component 20 homolog	67.9	5.8	27.8
67	ES Nematoden	WBGene00001573 locus:gei-16 status:Confirmed	51.9	10.0	34.0
84	ES Nematoden	WBGene00021309 status:Partially_confirmed	21.6	7.8	55.1
91	Asum fasta	WBGene00009598 Sushi domain status:Predicted	208.8	5.6	17.2
101	Asum fasta	CBR-GLB-1 protein	40.6	6.0	32.8
104	Asum fasta	protein tag-278	132.3	5.5	17.9
106	ES Nematoden	aciduria and homocystinuria type D homolog	30.3	6.1	23.8
112	ES Nematoden	Protein Sprint	54.9	5.6	23.6
117	ES Nematoden	protein C12orf4 homolog	61.9	5.5	21.8
121	ES Nematoden	Cysteine rich repeat family protein	137.6	5.9	27.9
133	ES Nematoden	protein T05H10.3	8.8	10.2	79.5
141	Asum fasta	Protein C17C3.11	18.4	9.9	40.4
143	ES Nematoden	protein C2orf43 homolog	38.2	7.8	39.7
147	ES Nematoden	CBR-LFI-1 protein	154.3	5.1	21.2
154	Asum fasta	CBR-LFI-1 protein	158.8	5.7	24.3
166	ES Nematoden	Temporarily Assigned Gene name family member (tag-241)	34.9	4.5	45.8
185	ES Nematoden	complex subunit 8	113.7	6.3	17.9
189	ES Nematoden	phosphatase	25.5	8.8	30.4
200	ES Nematoden	SCP-like extracellular protein	10.2	7.7	48.9
201	Asum fasta	Ancylostoma secreted protein	24.9	6.0	28.8
202	Asum fasta	CBR-LFI-1 protein	17.9	5.8	44.5
204	Asum fasta	Protein TAG-241, isoform b	183.7	6.3	16.4
205	ES Nematoden	RhoGAP domain containing protein	77.4	7.0	28.2
222	Asum fasta	Coiled-coil domain-containing protein	79.7	9.5	31.3
232	Asum fasta	WBGene00011288 status:Partially_confirmed UniProt: Q21887_CAEEEL protein_id:CAA94355.2%HMM_hit%1.4e-48	13.6	6.6	32.2
237	Asum fasta	CBR-LEV-11 protein, isoform b	30.6	4.6	39.4
243	ES Nematoden	CBR-TTR-46 protein	15.3	4.9	48.6
253	Asum fasta	esterase D	28.7	6.4	61.7
254	Asum fasta	CBR-TTH-1 protein	21.8	5.9	44.0
265	Asum fasta	Coiled-coil domain-containing protein 102B	37.2	5.5	38.9
267	ES Nematoden	complex subunit 1 homolog	166.6	5.7	22.3
287	Asum fasta	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	170.0	4.9	22.2
289	ES Nematoden	KH domain containing protein	41.1	5.1	25.6
292	Asum fasta	Retrovirus-related Pol polyprotein from type-1 retrotransposable element R2	152.9	10.1	14.0
300	Asum fasta	WBGene0001 1288 status:Partially_confirmed	139.0	13.6	74.2
308	Asum fasta	WBGene00007212 status:Confirmed	16.3	5.1	39.0
311	Asum fasta	Disco-interacting protein 2 C	172.9	9.0	13.8
315	ES Nematoden	PDZ domain protein	31.1	5.3	35.0
323	ES Nematoden	CBR-GST-7 protein	23.5	7.7	54.9
330	Asum fasta	TraB domain-containing protein	56.2	5.3	31.7
340	Asum fasta	feline sarcoma viral/V-FPS fujnami aviansarcoma viral oncogene homolog	59.9	6.5	18.0
342	ES Nematoden	domain-containing protein 2	321.4	5.3	17.5
344	Asum fasta	Mast C-terminus family protein	139.5	9.8	19.8
345	Asum fasta	DeHydrogenases, Short chain family member (dhs-15)	29.3	5.7	42.8
351	ES Nematoden	factor CWC22 homolog	90.0	9.5	19.3
353	Asum fasta	antigen OS=Onchocerca volvulus GN=OV17 PE=2 SV=1	18.2	4.4	72.2
196	ES Nematoden	CBR-CYP-44A1 protein	29.3	10.2	38.7
8	ES Nematoden	WBGene00016024 locus:glb-7 status:Partially_confirmed	46.7	7.0	41.0
148	Asum fasta	mushroom body defect	208.0	5.3	24.0
160	ES Nematoden	DNA-binding protein, 42 kDa containing protein	46.6	6.9	24.8
124	ES Nematoden	Cytoplasmic Membrane-Periplasmic Auxiliary-1 (MPA1)	280.8	5.1	22.0
239	ES Nematoden	Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family Ezrin/Radixin/Moesin-binding Phosphoprotein 50 (EBP50)	54.8	7.0	29.6
288	ES Nematoden	Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family Ezrin/Radixin/Moesin-binding Phosphoprotein 50 (EBP50)	22.6	9.8	45.5
228	ES Nematoden	Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family Ankyrin	140.4	5.3	7.9
338	Asum fasta	Thyroid adenoma-associated protein	153.1	6.4	15.3
319	Asum fasta	Oxidoreductase yhdf	29.2	5.7	34.1

Tabelle 10: Nicht-klassifizierbare Proteine.

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

Es wurden in der Summe 34 ES-Proteine aus der Gruppe der unbekannt Proteine identifiziert, wovon wiederum 3 eine PC-Modifikation aufweisen (siehe Tabelle 11).

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
15	ES Nematoden	protein	70.7	10.0	27.9
34	ES Nematoden	protein	36.9	10.5	47.7
51	ES Nematoden	protein	32.8	5.8	39.6
60	Asuum fasta	protein	11.4	9.3	41.7
63	ES Nematoden	protein	12.5	11.2	62.6
70	ES Nematoden	protein	44.0	5.5	27.1
80	ES Nematoden	protein	14.2	11.3	56.6
96	ES Nematoden	protein	7.9	10.7	82.9
118	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	61.8	5.5	21.8
127	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	51.8	9.5	19.7
138	Asuum fasta	Protein C32D5.7 [Caenorhabditis elegans]	49.2	9.2	31.5
140	ES Nematoden	%193%76.6839378238342%1e-90	21.8	6.0	57.2
144	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	40.0	7.8	33.9
145	ES Nematoden	protein	15.3	9.4	40.1
156	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	38.4	5.8	26.3
157	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	40.8	6.3	29.4
161	ES Nematoden	protein	132.0	7.1	13.3
176	Asuum fasta	protein	6.1	10.4	88.9
199	ES Nematoden	protein	31.1	10.3	32.4
224	ES Nematoden	protein	41.1	10.9	25.7
225	Asuum fasta	protein	18.6	6.7	53.8
244	ES Nematoden	protein	13.2	10.7	48.7
277	ES Nematoden	protein	155.9	6.7	5.2
280	Asuum fasta	protein	9.1	9.1	72.2
285	Asuum fasta	protein	6.5	10.2	58.9
297	ES Nematoden	protein	107.0	9.8	19.0
302	ES Nematoden	protein	7.2	9.7	46.2
312	ES Nematoden	protein	33.2	9.7	43.6
332	ES Nematoden	protein	160.8	6.4	19.0
335	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	239.1	6.0	9.3
336	Asuum fasta	Unknown, partial [Ascaris suum]	19.1	10.7	36.9
347	ES Nematoden	protein	132.1	4.7	8.7
350	Asuum fasta	protein	9.1	9.1	72.2
137	ES Nematoden	protein	106.3	5.9	30.9

Tabelle 11: Unbekannte Proteine

Die PC-modifizierten ES-Proteine sind rot markiert.

3.2 Identifizierung der PC-modifizierten ES-Proteine

Etwa zwei Drittel der identifizierten PC-modifizierten ES-Proteinen zeigten eine Beteiligung an Stoffwechselregulationen (64 %), darunter 49 % am allgemeinen Stoffwechsel, 9 % am Energie- und Redox-Metabolismus sowie 6 % am Protein- und Aminosäuren-Metabolismus. 5 % der identifizierten Proteine sind strukturgebend. Daneben wurden Signaltransduktionsproteine (4 %), Proteine aus der Gruppe der Translations- und Proteinsynthese (2 %) sowie Chaperone (2 %) identifiziert. Ein Großteil der identifizierten Proteine ist unbekannt (6 %) oder nicht-klassifizierbar (17 %). Insgesamt ähnelt das Verteilungsmuster der PC-modifizierten ES-Proteine dem Verteilungsmuster der gesamten Anzahl an ES-Proteinen.

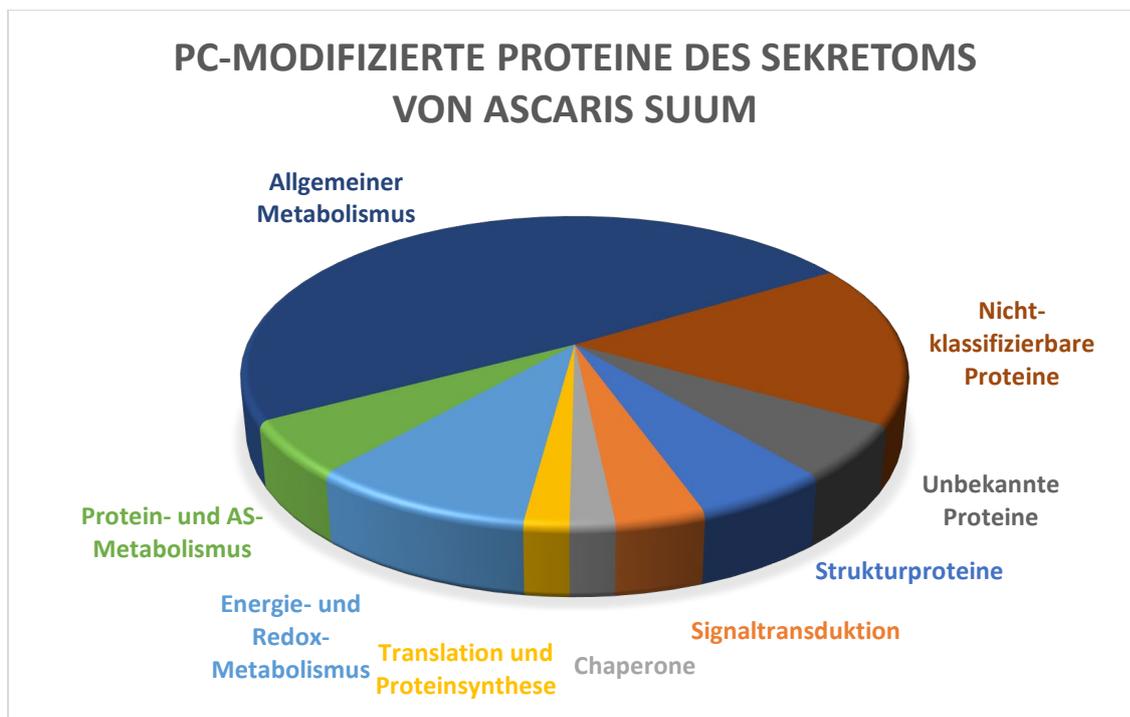


Abbildung 17: Kreisdiagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der PC-modifizierten ES-Proteine

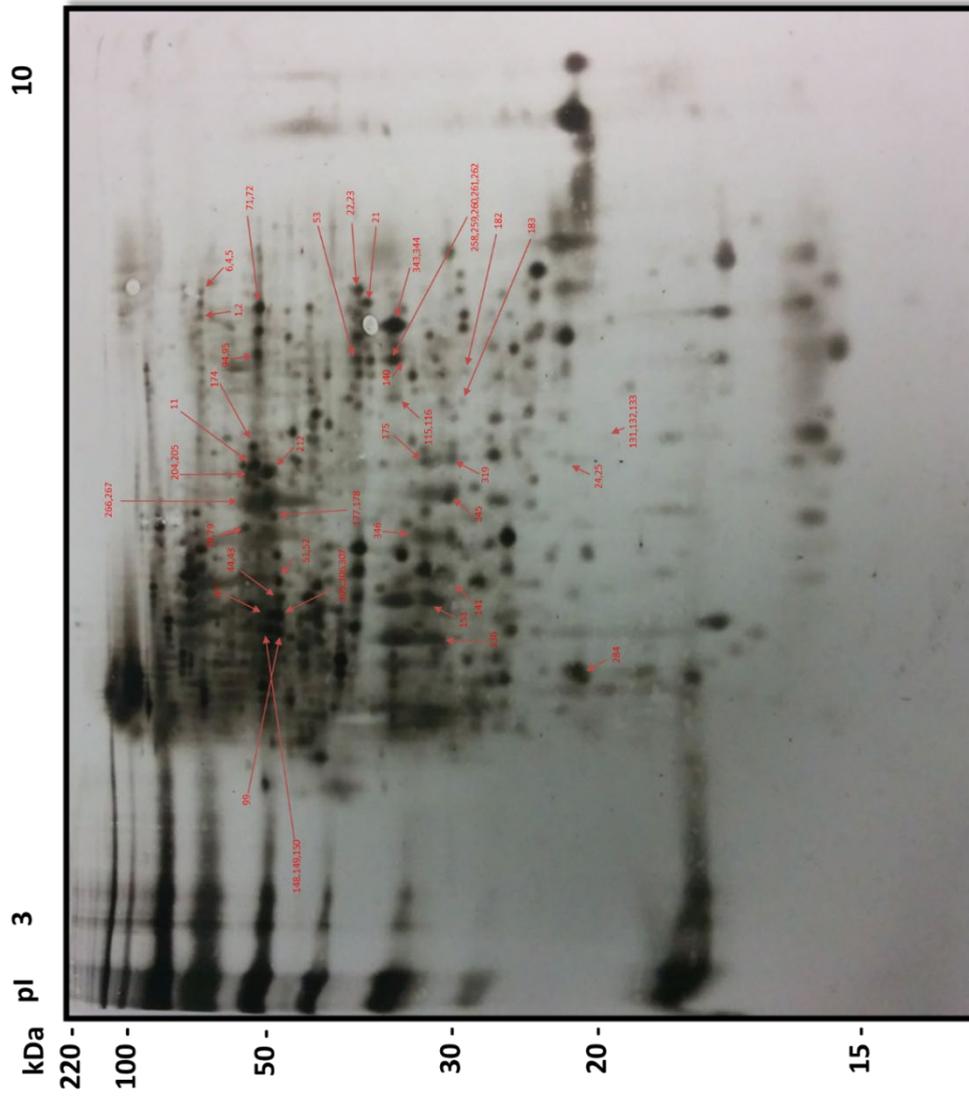


Abbildung 18: Blot-Folie mit Nachweis von PC-modifizierten ES-Proteinen von *Ascaris suum*

Phosphorylcholin-modifizierte exkretorisch-sekretorische Proteine

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
6	Asuum fasta	Vitellogenin-6 [Ascaris suum]	207.3	6.9	22.6
4	ES Nematoden	vit-5	199.7	7.9	23.4
5	Asuum fasta	Vitellogenin-6 [Ascaris suum]	104.5	9.6	38.2
78	Asuum fasta	Transmembrane protein 66	32.9	8.8	23.5
79	ES Nematoden	vasopressin-activated calcium mobilizing putative receptor protein	94.4	8.7	22.3
149	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial [Ascaris suum]	227.9	5.4	21.3
150	Asuum fasta	Golgi apparatus protein 1	139.2	6.0	23.2
284	Asuum fasta	Cytoskeleton-associated protein 5	165.2	7.8	15.8
343	Asuum fasta	Tropomodulin family protein	52.3	10.0	28.9
182	ES Nematoden	complex subunit FAM21A	92.2	4.9	21.5
183	Asuum fasta	Sulfhydryl oxidase 1	77.5	8.9	12.5
258	Asuum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin lec-3	38.5	8.7	44.6
99	ES Nematoden	peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	117.4	5.7	20.1
307	Asuum fasta	Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)	71.5	6.1	26.5
212	Asuum fasta	Brix domain containing protein 1 homolog	32.5	10.7	44.8
94	Asuum fasta	Glucose-6-phosphate isomerase	64.1	6.8	35.1
95	Asuum fasta	Cbr-gpi-1 ; C.briggsae CBR-GPI-1 protein; K01810 glucose-6-phosphate isomerase	75.8	9.0	23.3
22	ES Nematoden	fructose-bisphosphate aldolase 1	43.4	9.1	40.5
23	Asuum fasta	Fructose-bisphosphate aldolase 1	40.4	8.6	52.0
21	Asuum fasta	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.1	7.0	33.5
131	Asuum fasta	Peroxioredoxin	21.5	7.8	36.9
132	Asuum fasta	thioredoxin peroxidase	21.6	6.2	36.9
319	Asuum fasta	Oxidoreductase yhdF	29.2	5.7	34.1
346	Asuum fasta	NADH dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur protein 7	23.3	10.4	21.4
71	ES Nematoden	glutamatdehydrogenase	56.8	7.8	46.9
72	Asuum fasta	Glutamat dehydrogenase 2	55.2	7.8	45.7
261	Asuum fasta	Glutamat dehydrogenase1	63.8	9.3	22.3
24	Asuum fasta	Uridine-cytidine kinase 2-B	28.6	6.5	20.4
25	Asuum fasta	uridine monophosphate kinase	31.9	8.0	18.3
44	Asuum fasta	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	20.2	9.8	40.0
52	Asuum fasta	protein sorting-associated protein 13b	230.9	5.7	15.7
97	Asuum fasta	DNA polymerase I	118.4	5.6	20.2
148	Asuum fasta	mushroom body defect	208.0	5.3	24.0
174	Asuum fasta	Multidrug resistance-associated protein 1 [Ascaris suum]	139.6	9.2	10.1
177	Asuum fasta	Past1; putative achaete scute target 1	72.5	9.5	17.0
178	Asuum fasta	EH domain-containing protein 4 [Ascaris suum]	72.6	9.4	15.9
259	Asuum fasta	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3 [Ascaris suum]	91.3	5.1	13.2
262	ES Nematoden	oligomeric Golgi complex subunit 3	83.9	5.6	14.4
305	Asuum fasta	DNA topoisomerase 2 [Ascaris suum]	172.2	9.0	16.7
43	ES Nematoden	CDK5RAP3-like protein	57.6	5.0	27.5
151	ES Nematoden	Toxic Hok/Gef Protein (Hok/Gef) Family Putative Cholesterol Transporter (Start1)	25.7	7.8	52.6
260	ES Nematoden	Incompletely characterized transport systems; Putative transport proteins; Urate Transporter (UAT) Family; GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL) (UAT) - Rattus norvegicus (Rat)	37.9	6.8	47.0
266	Asuum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160 [Ascaris suum]	39.5	7.0	42.5
133	ES Nematoden	protein T05H10.3	8.8	10.2	79.5
141	Asuum fasta	Protein C17C3.11	18.4	9.9	40.4
204	Asuum fasta	Protein TAG-241, isoform b	183.7	6.3	16.4
205	ES Nematoden	RhoGAP domain containing protein	77.4	7.0	28.2
267	ES Nematoden	complex subunit 1 homolog	166.6	5.7	22.3
344	Asuum fasta	Mast C-terminus family protein	139.5	9.8	19.8
345	Asuum fasta	DeHydrogenases, Short chain family member (dhs-15)	29.3	5.7	42.8
51	ES Nematoden	protein	32.8	5.8	39.6
140	ES Nematoden	%193%76.6839378238342%1e-90	21.8	6.0	57.2
336	Asuum fasta	Unknown, partial [Ascaris suum]	19.1	10.7	36.9

Tabelle 12: PC-modifizierte ES-Proteine

Bei der Dursicht der einzelnen PC-modifizierten ES-Proteine fällt auf, dass sich auch Nicht-*A.suum*-Proteine, wie z.B. das *Incompletely characterized transport systems; Putative transport proteins; Urate Transporter (UAT) Family; GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL) (UAT) – Rattus norvegicus (Rat)*, vorfinden.

4 Diskussion

4.1 Vergleich von PC-ES-Produkten mit PC-Totalextrakt (TE)-Produkten sowie Vergleich von ES-Produkten im Adult- und Larvenstadium von *Ascaris suum*

Im Rahmen einer Parasiteninfektion spielt unter anderem die Interaktion zwischen Wirts- und Parasitenproteinen eine große Rolle und bestimmt hauptsächlich das Ergebnis einer Infektion. Als exkretorisch-sekretorische Antigene (ES-Antigene) bezeichnet man die Gesamtheit aller Moleküle, Enzyme und metabolischen Produkte, welche zusammen mit kutikularem Material von Parasiten in die Umgebung ausgeschieden werden. Zum Teil stammen diese ES-Antigene von speziellen exkretorisch-sekretorischen Organen, zum Teil stammen sie allerdings auch von der Körperoberfläche der Helminthen (127). Seit Jahrzehnten werden ES-Antigene verschiedener parasitärer Erreger (Nematoden, Trematoden und andere Spezies) insbesondere bezüglich ihrer Wirkungsweise erforscht. Hierbei ergaben viele Untersuchungen, dass ES-Produkte vor allem immunmodulatorische Eigenschaften aufweisen (128–130). Einen besonderen Stellenwert auf dieser Ebene genießen ES-Proteine mit einer Phosphorylcholin-Modifikation. PC-modifizierte ES-Antigene können nämlich die B- und T-Zellproliferation inhibieren und somit immunsuppressiv wirken. Sie dämpfen die Th1-Immunantwort und begünstigen dafür vermehrt die Reaktion vom Th2-Typ.

Insbesondere mit der Fertigstellung und Veröffentlichung der Genomsequenz von *Ascaris suum* durch Jex et al im Jahre 2011 fanden nun auch hier vermehrt proteomische Untersuchungen statt (30). Zuletzt untersuchten Wang et al 2013 exkretorisch-sekretorische Proteine verschiedener Larvenstadien von *Ascaris sumum* (25). Timm et al hingegen identifizierten 2016 in der Gesamtanzahl 59 verschiedene PC-modifizierte Proteine aus dem Totalextrakt sowie aus den einzelnen Organen/Gewebearten von *Ascaris suum* (Kutikula, Hypodermis, Muskulatur, Intestinum, Uterus) (56). Ergänzend zu diesen Studien ergaben die Resultate dieser Arbeit 354 exkretorisch-sekretorische Proteine des adulten *Ascaris suum*, wovon wiederum 53 eine PC-Modifikation aufwiesen.

Vergleicht man die PC-ES-Proteine mit den PC-modifizierten Proteinen aus dem Totalextrakt bzw. den einzelnen Gewebearten/Organen von *Ascaris suum*, zeigt sich eine

Überlappung in nur vier Proteinen. Hierzu zählt das Protein Vitellogenin-6 aus der Gruppe des Allgemeinen Metabolismus, die Glucose-6-Phosphat-Isomerase und Fructose-Bisphosphat-Aldolase 1 aus der Gruppe des Energie- und Redox-Metabolismus sowie die Glutamathydrogenase 1 aus der Gruppe des Protein- und Aminosäuremetabolismus (siehe Abbildung 19).

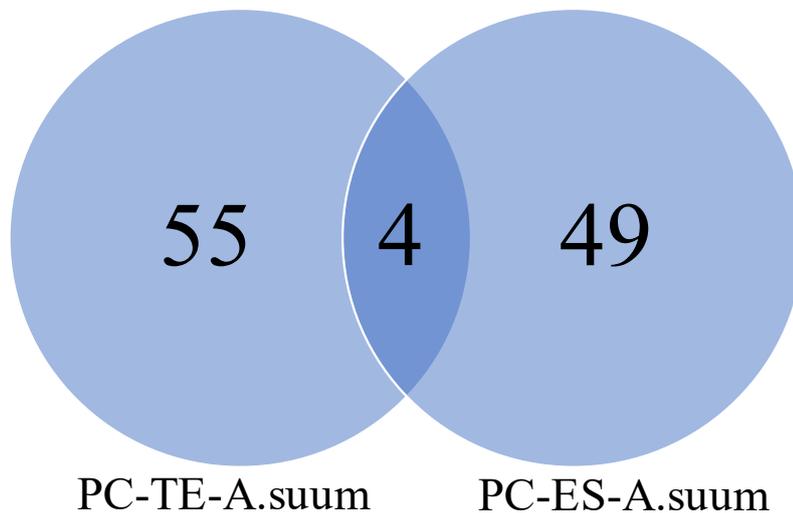


Abbildung 19: Venn-Diagramm der PC-modifizierten Proteine aus dem Totalextrakt bzw. den einzelnen Organen/Gewebearten von adulten *Ascaris suum* Würmern sowie den PC-modifizierten exkretorisch-sekretorischen Proteinen von adulten *Ascaris suum* Würmern

Ein möglicher Grund für die geringe Überlappung könnte die bekannte vielfältige Funktion der PC-Modifikation an Proteinen sein. Während die PC-Modifikation den ES-Proteinen primär immunmodulatorische Eigenschaften verleihen und damit entscheidend Wirt-Parasit-Interaktionen beeinflussen (siehe hierzu 4.3), spielt die PC-Modifikation an Proteinen des Totalextraktes bzw. der einzelnen Organe von *Ascaris suum* eventuell primär eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Fertilität.

Bei Vitellogenin 6, welches auch im PCom von *C. elegans* identifiziert wurde (55), handelt es sich um ein carbonyliertes Eidotterprotein, welches im Darm synthetisiert wird und vor allem während des Eierlegens sezerniert wird. Im Larvenstadium steht hierbei die Funktion als Nährstoff- und Energielieferant im Vordergrund. Auch bei älteren Nematoden, welche keine Eier mehr legen, wurde eine Synthese von Vitellogenin 6 festgestellt. Aufgrund der nachgewiesenen Metallionen-Bindungskapazität wurde von verschiedenen Forschern die Vermutung aufgestellt, dass es möglicherweise auch dem Schutz vor oxidativer Schädigung dient (121, 131). Glucose-6-Phosphat-Isomerase und

Fructose-Bisphosphat-Aldolase 1 sind wichtige Enzyme der Glykolyse und Gluconeogenese. Glutamatdehydrogenase 1 wiederum ist ein Teil des Stickstoffmetabolismus.

Vergleicht man exkretorisch-sekretorische Proteine adulter *Ascaris suum*-Würmer mit den exkretorisch-sekretorischen Proteinen von Larvenstadien (25) zeigt sich eine Überlappung in vier Proteinen von L3-egg-ES-Produkten, in einem Protein von L3-lung-ES-Produkten sowie in sechs Proteinen von L4-ES-Produkten (siehe Abbildung 20). Bei den vier überlappenden Proteinen von L3-egg-ES-Produkten handelt es sich um das Tropomyosin, das 32 kDa beta-galactoside-binding lectin, die Histone H2B.1/H2B.2 sowie das Serpin-like protein. Aus der Gruppe der L3-lung-ES-Produkte findet sich das Nephilysin-1 als einziges überlappendes ES-Protein, welches allerdings auch in den L4-ES-Produkten vorhanden ist. Die Fructose-bisphosphatase aldolase 1, die Phosphoenolpyruvate carboxykinase GTP, die Sucrase-isomaltase, das C-type lectin protein 160 sowie das Zonadhesin sind weitere L4-ES-Produkte, welche sich auch im Sekretom adulter Würmer wiederfinden.

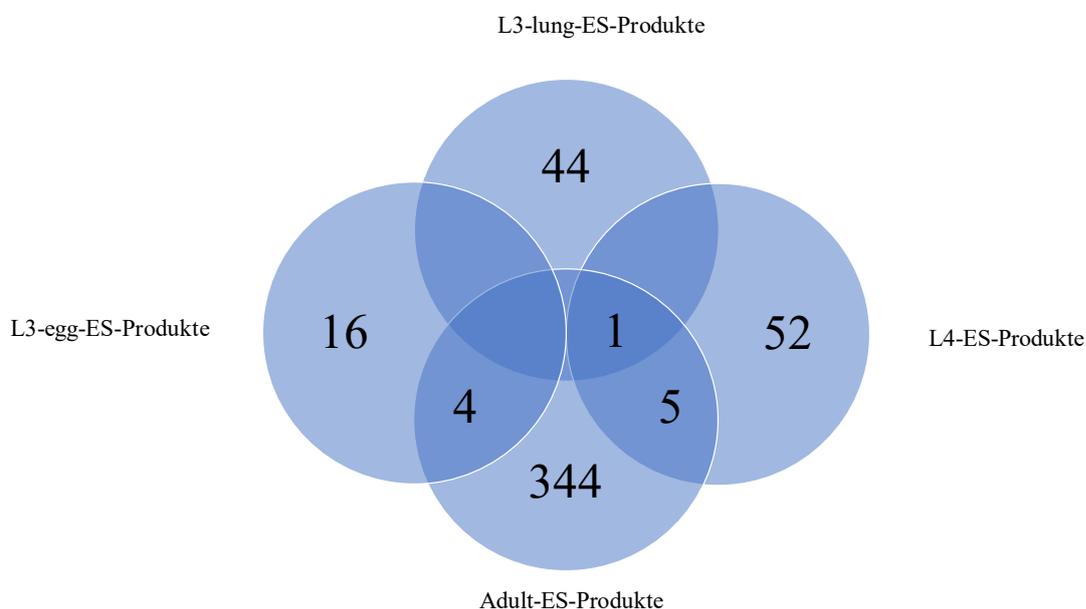


Abbildung 20: Venn-Diagramm der ES-Proteine aus den Larvenstadien L3-egg, L3 lung und L4 sowie dem Adultstadium von *Ascaris suum*

Insgesamt fällt auch hier auf, dass die Anzahl überlappender ES-Proteine zwischen adulten *A. suum*-Würmern und Larvenstadien gering ausfällt. Hieraus lässt sich schließen, dass der Übergang vom Larvenstadium zum Adultstadium mit einer deutlichen Änderung des ES-Spektrums einhergeht. In der Arbeit von Wang et al zeigte sich eine ähnliche Verteilung auch beim Vergleich der einzelnen Larvenstadien von *Ascaris suum* untereinander, insbesondere L3-egg-ES-Produkte differieren deutlich von L3-lung-ES-Produkten sowie L4-ES-Produkten (25) (siehe Abbildung 21). Eine Stadienspezifität der ES-Moleküle zeigte sich zuvor auch bei der Analyse des Sekretoms von *Brugia malayi* durch Bennuru et al (132) (siehe Abbildung 22). Im Unterschied zu dieser Arbeit wurde hier zusätzlich zwischen Weibchen und Männchen im Adultstadium unterschieden.

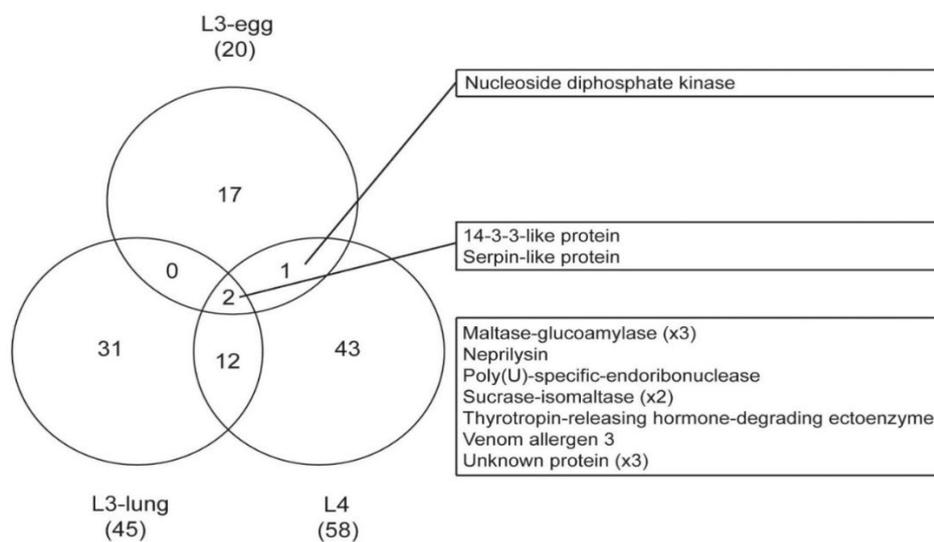


Abbildung 21: Venn-Diagramm der ES-Proteine aus den Larvenstadien L3-egg, L3 lung und L4 (25)

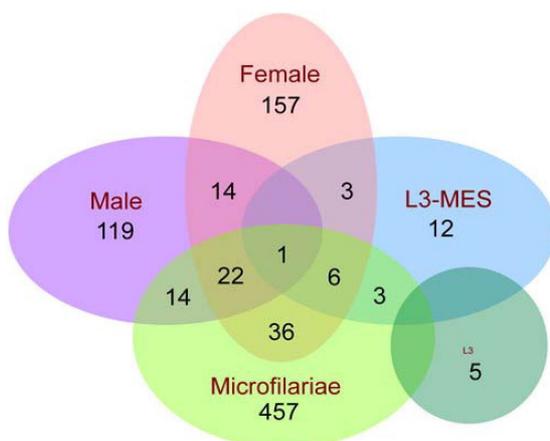


Abbildung 22: Venn-Diagramm der ES-Proteine aus adulten Männchen und Weibchen, Mikrofilarien sowie den Larvenstadien von *Brugia malayi* (132)

Möglicher Grund für die Stadienspezifität der Mehrzahl der ES-Proteine ist, dass Parasiten – wie hier das *Ascaris suum*- je nach Lebensstadium und Aufenthaltsort unterschiedlichen Herausforderungen ausgesetzt sind sowie unterschiedliche Ziele verfolgen. Die aus infektiösen Eiern schlüpfende Larven im L2 Stadium halten sich im Darm auf und beabsichtigen, die Darmwand und ihre Blutgefäße schnellstmöglich zu penetrieren, um im Anschluss über die Pfortader in die Leber zu gelangen und sich dort zum L3-Stadium weiterzuentwickeln. Nach dem Weiterschweben der L3-Larven über das rechte Herz in die Lungengefäße ist das Ziel der L3-Larven in der Lunge wiederum, über die Alveolen die Luftröhre bzw. den Rachen zu erreichen. Die L4-Larven sowie die adulten *A. suum*-Würmer halten sich schlussendlich über viele Jahre im proximalen Dünndarm auf und sezernieren andere neue ES-Proteine, um exemplarisch ihre mikrobielle Umgebung zu modulieren. Diese Überlegung findet Unterstützung in der von Midha et al 2018 veröffentlichten Arbeit, bei der nachgewiesen wird, dass *Ascaris suum* im L4-Stadium und Adultstadium antimikrobielle Faktoren sezerniert, während L3-Larven keine antibakterielle Aktivität zeigen (123).

4.2 Vergleich des Sekretoms von *A. suum* mit den Sekretomen anderer Helminthen

4.2.1 *C. elegans*

Phylogenetisch handelt es sich bei *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) um einen freilebenden, nicht-parasitären Nematoden aus der Familie der sogenannten Rhabditiden. Morphologisch ist sie unter anderem durch ihre transparente Kutikula gekennzeichnet. Hervorzuheben ist zudem, dass es sich hier in den allermeisten Fällen um einen sogenannten Hermaphroditen bzw. Konsekutivzwitter handelt, welcher im Laufe seiner Entwicklung zuerst Spermien und dann auch Oozyten bildet sowie sich so durch Selbstbefruchtung fortpflanzt. Nur etwa 0,3 % aller *C. elegans*-Würmer sind Männchen. Für das Wachstum und die Reproduktion benötigt *C. elegans* eine feuchte Umgebung und eine gemäßigte Temperatur sowie Sauerstoff und Mikroorganismen (in erster Linie Bakterien) als Nahrungsgrundlage. Die Größe der Eier, welche die Embryonen enthalten, beträgt in etwa 50 µm. Adulte *C. elegans*-Würmer hingegen sind im Durchschnitt ca. 2 mm lang. Die Gesamtlebensdauer liegt bei etwa 14 Tagen, der Entwicklungszyklus hingegen dauert 3 Tage. Im Rahmen der Entwicklung von *C. elegans*-Wurmern werden vier Larvenstadien unterschieden. Nach dem Beenden der Gastrulationsphase des Embryos in der Gebärmutter erfolgt die Ablage in den freien Lebensraum, wo es nach etwa 14 Stunden schlüpft, und das L1-Stadium erreicht. Nach ca. 25 Stunden ergibt sich eine erste Häutung (L2-Stadium), nach ca. 32 Stunden die zweite (L3-Stadium) und nach etwa 40 Stunden die dritte Häutung (L4-Stadium). Das Stadium des adulten und somit geschlechtsreifen Hermaphroditen wird nach 50 Stunden erreicht (133). Herrscht Nahrungsmangel oder liegen ungünstige Umweltbedingungen vor, können L2-Larven als sogenannte Dauerlarve bis zu drei Monate überleben, indem sie den Stoffwechsel ändern und vorerst eine weitere Entwicklung verhindern. Liegen erneut günstigere Umweltbedingungen und ausreichend Nahrung vor, wird das Dauerlarvenstadium beendet und der Entwicklungszyklus fortgesetzt.

Grabitzki et al analysierten 2008 das PCom von *C. elegans* in allen Larvenstadien sowie im Adultstadium (55). Hierbei wurden insgesamt 73 PC-modifizierte Proteine identifiziert, wobei die Mehrzahl der Proteine im Gemisch aus Eistadium, Dauerlarvenstadium, den Larvenstadien L1-L4 und dem Adultstadium (38 PC-Proteine) vorzufinden waren, dicht gefolgt vom synchronisierten Eistadium (20 PC-Proteine) sowie

dem synchronisierten Adultstadium (11 PC-Proteine). Weitere Ergebnisse dieser Arbeit weisen daraufhin, dass bei einem Großteil dieser Proteine die PC-Modifikation über N-Glykane erfolgt. Bei den übrigen Proteinen ohne N-Glykosylierungsstelle könnte PC möglicherweise auch über ein O-Glykan oder sogar direkt am Protein verknüpft sein.

Vergleiche mit dem PCom von *A. suum* im Adultstadium zeigen eine Überlappung in 12 PC-modifizierten Proteinen, wobei es sich bei den meisten um Vertreter des Energie- und Redoxmetabolismus (Protein disulfid isomerase A3, Propionyl-CoA carboxylase beta chain, Phosphoglycerate kinase und Fructose-bisphosphate aldolase 1) sowie Chaperone (Heat shock 70 kDa protein C und Heat shock 70 kDa protein A sowie Chaperonin Hsp-60) handelt. Diesen folgen Proteine aus der Gruppe des Protein- und Aminosäuremetabolismus (Glutamate dehydrogenase 1 und Glutamate dehydrogenase 2), dem allgemeinen Metabolismus (Enolase) sowie das Strukturprotein Vitellogenin-6 (56).

Foks et al untersuchten 2017 das Sekretom der L1-Larven von *C. elegans* und identifizierten hierbei 38 ES-Proteine, wobei ein Großteil dieser einen Einfluss auf die Entwicklungsschritte zeigen. Exemplarisch ist das nachgewiesene nukleäre Laminin (LMN-1) relevant für die Zellformation und -stabilität (134). Für die Entwicklung stellen sich zudem das GIP-2 sowie das REPO-1 als relevante ES-Proteine dar. Das SET-9 wiederum ist ein Protein, was die Lebensdauer beeinflusst. Zuletzt ist auch das abnormal cell lineage protein 19 (LIN-19) erwähnenswert, da es die Mitose, die rezeptorvermittelte Endozytose oder auch die Larvenentwicklung beeinflusst. Außerdem zeigt es einen negativen Einfluss auf die Proliferation sowie das multizelluläre organische Wachstum (135).

Vergleicht man das Sekretom von *C. elegans* und *A. suum* finden sich multiple Proteine, die in beiden Nematoden vorkommen und teilweise auch bei beiden eine PC-Modifikation aufweisen. Exemplarisch zu erwähnen sind hier das Vitellogenin-6, das HSP-70 sowie die Fructose-Bisphosphat-Aldolase 1. Die beiden erstgenannten spielen zudem eine wichtige Rolle im Rahmen der Wirt-Parasit-Interaktionen bzw. im Rahmen des Infektionsgeschehens und weisen zum Teil immunmodulatorische Eigenschaften auf (siehe hierzu 4.3). Weiter fällt auf, dass sowohl das Sekretom von *C. elegans* als auch von *A. suum* viele nicht-näher-klassifizierbare und unbekannte Proteine vorliegen.

4.2.2 *Brugia malayi*

Bei *Brugia malayi* handelt es sich um einen parasitären Nematoden aus der Gruppe der Filarien, welche vor allem das Lymphsystem des Wirtes befällt und in seiner maximalen Ausprägungsform das Krankheitsbild einer Elephantiasis verursachen kann. Die Größe der Larven beträgt zwischen 200 und 300 μm . Die adulten Würmer hingegen messen eine Länge von bis zu 2,5 cm (Männchen) bzw. 6 cm (Weibchen). Das Besondere an *B. malayi* ist, dass ein Teil der Entwicklung innerhalb der Mücken stattfindet, welche anschließend infektiöse Larven durch einen Moskitostich an den Endwirt überträgt. Diese infektiösen L3-Larven entwickeln sich innerhalb von sechs bis zwölf Monaten zu adulten Nematoden, paaren sich und setzen eine Großzahl an behüllten Mikrofilarien in den Blutkreislauf des Endwirtes frei. Die Mikrofilarien unterliegen einem Tagesrhythmus. Daher ist die größte Menge an Mikrofilarien zwischen Mitternacht und 2 Uhr früh nachweisbar. In der Regel werden auch in dieser Zeitspanne durch erneuten Stich die behüllten Mikrofilarien von Moskitos aufgenommen. Im Verdauungstrakt der Mücken löst sich die Hülle der Mikrofilarien auf. Diese verlassen hierauf mittels einer Chitinaseaktivität den Mitteldarm und gelangen in den Thorax, wo sie sich zur L1-Larve weiterentwickeln. Die L1-Larven wiederum reifen zu L3-Larven heran und siedeln sich unter anderem in der Speicheldrüse der Mücken an. Der Kreis schließt sich, wenn diese infektiösen L3-Larven bei erneutem Mückenstich an den Wirt übertragen werden.

Hewitson et al untersuchten 2008 exkretorisch-sekretorische Produkte adulter Würmer von *Brugia malayi* und identifizierten hierbei 80 ES-Proteine (128). Unter diesen fand sich exemplarisch die Leucylaminopeptidase (LAP). Das LAP bildet das homologe Protein zu ES-62 von *A. viteae*, ist ebenfalls von einer Phosphorylcholin-Modifikation gekennzeichnet (136) und zeigt antiinflammatorische Eigenschaften auf (90). Als weiteres ES-Protein zeigte sich die kutikuläre Glutathion-Peroxidase gp29, welches offenbar parasitäre Lipide vor reaktiven Sauerstoffangriff beschützen kann (137). Das Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF-1) stellte ein ES-Protein dar, welches eine ungerichtete Migration von Makrophagen verhindern kann (138, 139). Des Weiteren gehört das glykolytische Enzym Triosephosphat-Isomerase (TPI) zu den am häufigsten sezernierten Proteinen. GAL-1 und GAL-2 sind Galektine, welche eine Subgruppe der Lektine darstellt und zur Gruppe der zuckerbindenden Proteine gezählt wird. Durch ihre sogenannte Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (CRD) haben diese eine Affinität für N-

Acetyllactosamine (140, 141). Das Vorhandensein ihrer Polyactosamin-Liganden, welches durch die Aktivität Golgi-ständiger Glykosyltransferasen reguliert wird, ist für die Bindung der Galektine an die Ziel-Glykoproteine entscheidend (142, 143). Die Liganden bilden mit den Glykoproteinen sogenannte Galektin-Glykoprotein-Gitter, welches die Signalschwelle für die T-Zellaktivierung anheben und somit eine Immunsuppression bewirken kann (143, 144). In Helminthen konnte bislang Galektinen keine Funktion zugeschrieben werden. Bei Galektinen in Säugetieren weiß man hingegen, dass sie die Eigenschaft haben, Th1- und Th2-vermittelte Entzündungsreaktionen verhindern zu können (145, 146). Bei Western-Blot-Analysen mit einem PC-spezifischen monoklonalen Antikörper stellt sich neben LAP auch die N-Acetylglucosaminyltransferase (GlcNAcT) als weiteres PC-tragendes ES-Protein heraus (128). Bislang ist unbekannt, ob das hier identifizierte ES-Protein GlcNAcT auch im extrazellulären Milieu eine Glykosylierung und Galektinbindung bewirken kann.

Moreno und Geary et al führten 2008 eine globale stadien- und geschlechtsspezifische Sekretomanalyse von *Brugia malayi* durch. Hierbei wurden in der Summe 228 ES-Proteine von Mikrofilarien sowie männlichen und weiblichen adulten Würmern identifiziert (147). Als potenziell immunmodulatorische ES-Proteine wurden hier ebenfalls LAP, GAL-1, ein Homolog von MIF-1 sowie das CPI-2 in allen Stadien und Geschlechtern identifiziert. Zudem zeigte sich auch hier ein häufiger Nachweis der glykolytischen Proteine TPI und Enolase. Weiter wurde im Sekretom adulter Würmer eine Isoform des menschlichen MIF (MIF-2) und das GAL-2 nachgewiesen. Der größte Anteil an ES-Proteinen von Mikrofilarien haben Einfluss auf Entwicklungsprozesse und regulieren die Aktivität von Enzymen, wobei sich die Gruppe der Proteaseinhibitoren als größte funktionelle Klasse herausstellte.

Ein Vergleich der Sekretome von *Brugia malayi* und *Ascaris suum* zeigt, dass beide mehrere sowohl PC-modifizierte als auch immunmodulatorisch wirksame ES-Proteine aufweisen. Ähnlichkeiten findet man auch auf der Ebene der Larvenstadien, wobei hier ein Großteil der ES-Proteine Entwicklungsprozesse sowie Enzymaktivitäten beeinflussen.

4.2.3 *Schistosoma japonicum*

Schistosomen, welche auch Pärchenegel genannt werden, gehören zur Gruppe der parasitär lebenden Trematoden (Saugwürmer). *Schistosoma japonicum* ist eine von 83 bekannten Schistosomenarten und gehört genauso wie *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum* und *Schistosoma mekongi* zu den Verursachern der Darmbilharziose, auch intestinale Schistosomiasis genannt. *Schistosoma haematobium* hingegen ist Verursacher der Blasenbilharziose, welche auch als urogenitale Schistosomiasis bezeichnet wird.

Je nach Art produzieren adulte Pärchenegel Eier, welche zusammen mit dem Stuhl oder dem Urin des Endwirtes in warmen Süßwassergewässern freigesetzt werden. Hier schlüpfen aus den Eiern vielzellige Wimpernlarven, auch Miracidium genannt, welche wiederum von Süßwasserschnecken aufgenommen werden. Innerhalb der Schnecken entwickeln sich aus den Wimpernlarven Sporozysten. Diese vermehren sich asexuell und produzieren Zerkarien, welche wiederum in das Süßwasser ausgeschieden werden. Zerkarien schwimmen mithilfe ihres Ruderschwanzes zum Endwirten, durchbohren deren Haut und wandeln sich zum sogenannten Schistosomulum um. Das Schistosomulum dringt in Blutgefäße ein, wandert zur Leber und erreicht dort das Adultstadium. Im letzten Schritt wandern die Schistosomen als Pärchen zu ihren Bestimmungsorten, wo sie sich paaren und Eier produzieren. Bei *S. japonicum* handelt es sich hier um die Mesenterialvene des Darms.

Liu et al untersuchten 2009 exkretorisch-sekretorische Proteine adulter Würmer von *Schistosoma japonicum* und identifizierten hierbei 101 Proteine (148). Die Freisetzung dieser ES-Produkte erfolgt entweder an der Oberfläche der Magenepithelien und/oder am Integument. Das am häufigsten identifizierte ES-Protein war das FABP (Fettsäurebindendes Protein), die Gruppe der Hitzeschockproteine (HSP) wurde hingegen als größte Proteingruppe entdeckt. Innerhalb der HSP-Gruppe bildet das HSP-70s das am häufigsten vorkommende Protein. Verschiedene Studien haben ergeben, dass Hitzeschockproteine sowohl immunstimulierende als auch immunsuppressive Eigenschaften aufweisen können (114, 115). Exemplarisch beschrieben Ahmed et al 2004, dass das *Toxoplasma gondii*-HSP-70 eine Immunsuppression bewirkt. HSP-70 zeigt hier nämlich nicht nur eine stimulierende Wirkung bei der kontinuierlichen

Produktion von Th2-Zytokinen, sondern reduziert auch die Bildung von Stickoxid, welches normalerweise die Immunantwort aktiviert (116).

Unter den Larvenstadien wird dem Schistosomulum eine besondere Bedeutung beigemessen, da es durch die sezernierten Proteine das Wirtsimmunsystem beeinflussen kann (149). Als Umgehungsstrategie wird exemplarisch das „molekulare Mimikry“ diskutiert. Hiermit ist die Produktion von Antigenen gemeint, welche den Wirtsmolekülen ähneln (150–152). McLaren et al beschrieben zudem 1984, dass Schistosomen in der Lage sind, sich mit Wirtsmolekülen zu tarnen (153). Andere Studien hingegen berichten die Bewirkung einer Immunmodulation durch Interferenz mit dem Wirtsimmunsystem (129, 154–156). Untersuchungen am Schistosomulum von *Schistosoma mansoni* ergaben eine antiinflammatorische Aktivität des Proteins Sm16.8 (157).

Vergleiche zwischen dem Sekretom von *Schistosoma japonicum* und *Ascaris suum* ergeben, dass das ES-Proteom in *S. japonicum* hauptsächlich aus Fettsäure-bindenden Proteinen und Hitzeschockproteinen (HSP-70, HSP-90 und HSP-97) besteht, wohingegen die Mehrzahl an ES-Proteinen von *A. suum* dem allgemeinen Metabolismus sowie dem Energie- und Redoxmetabolismus zugeordnet wurden. Bei beiden Sekretomen finden sich Proteine, welchen eine immunmodulatorische Funktion zugesprochen wird.

4.3 Mögliche Funktionen der identifizierten und teilweise PC-modifizierten Proteine im Rahmen des Infektionsgeschehens

Im analysierten ES-Spektrum der adulten *A. suum*-Würmer finden sich viele Proteine, über welche bereits aus vorausgegangenen Untersuchungen von spezifischen *A. suum*-Proteinen sowie anderen nicht-*A. suum*-spezifischen Parasitenproteinen relevante Funktionen bekannt sind, die das Infektionsgeschehen beeinflussen können.

Als beginnendes Beispiel sind die identifizierten, z.T. PC-modifizierten HSP-70-Proteine (*Heat shock 70 kDa protein A*, *Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp 70)*, *Heat shock 70 kDa protein F*) zu nennen. Diese gehören zur Gruppe der Hitzeschockproteine, welche sowohl intrazellulär als auch extrazellulär vorkommen können und im Allgemeinen unter Stressbedingungen eine zytoprotektive Rolle einnehmen. Intrazellulär sind Hitzeschockproteine klassischerweise als zytosolisch molekulare Chaperone an der Proteinfaltung und auch Proteinentfaltung vor einem Membrantransport beteiligt. Extrazellulär werden immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben (158). Diese können abhängig von bestimmten Bedingungen (hauptsächlich der HSP-Art sowie ihrer Konzentration) sowohl pro- als auch antiinflammatorische Folgereaktionen auslösen. HSP-70-Proteine sind mit chronisch-inflammatorischen Erkrankungen assoziiert und fördern die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen, indem sie mit dendritischen Zellen und Monozyten sowie Suppressorzellen, auch regulatorische T-Zellen genannt, interagieren. Durch Bindung an die endozytischen Rezeptoren kommt es zur Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, welches wiederum zur Immunsuppression führt (158, 159). Hierbei wird in dendritischen Zellen zudem die CD86- und MHC-Klasse-II-Expression herunterreguliert sowie die TNF- α -Produktion gehemmt. In Monozyten wiederum wird die IFN- γ -Produktion inhibiert. Auf molekularer Ebene führt die Bindung des HSP-70 an endozytische Rezeptoren zu einer MyD88-Aktivierung des anliegenden Toll-like-receptors 2 (TLR2), welches wiederum eine Phosphorylierung von ERK bewirkt. Das phosphorylierte ERK aktiviert einen unbestimmten Transkriptionsfaktor, welcher an den IL-10-Genpromoter bindet und eine Hochregulierung der IL-10-Produktion auslöst (siehe Abbildung 23).

Auch in der im Jahr 2004 veröffentlichten Arbeit von Ahmed et al wird beschrieben, dass das *Toxoplasma gondii*-HSP-70 immunsuppressive Eigenschaften aufweist. HSP-70 zeigt hier nicht nur eine stimulierende Wirkung bei der kontinuierlichen Produktion von

Th2-Zytokinen, sondern reduziert auch die Bildung von Stickoxid, welches normalerweise die Immunabwehr aktiviert (116).

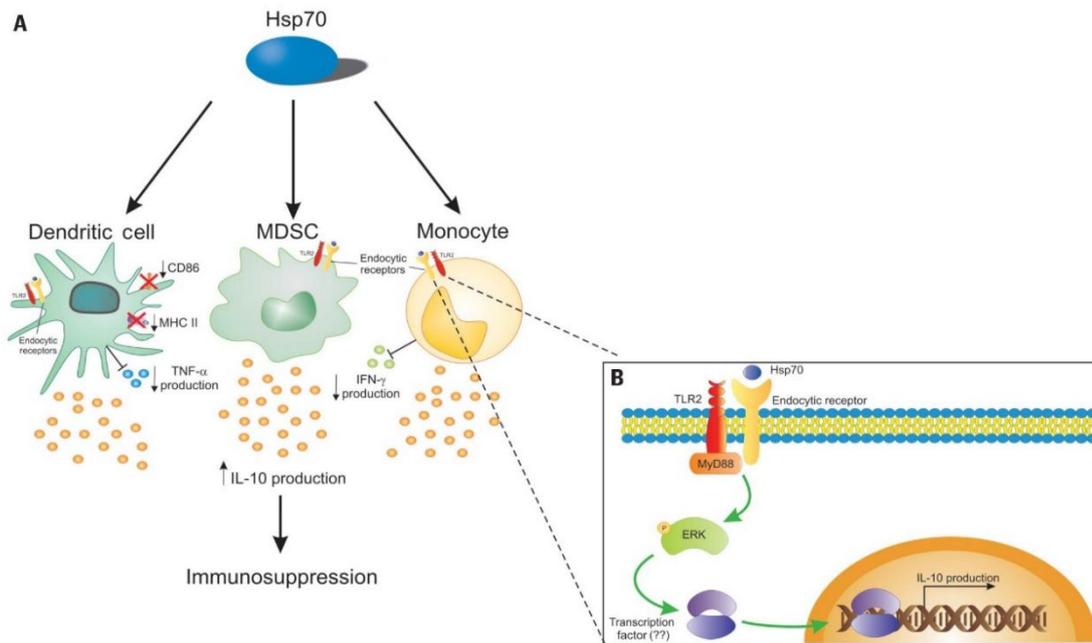


Abbildung 23: Immunsuppression durch HSP-70 (159)

Im Sekretom von *A. suum* finden sich viele Lektine (*C-type Lectin family member (clec-62)*, *C-type lectin protein 160*), Galektine (*32 kDa beta-galactoside-binding lectin, 32 kDa beta-galactoside-binding lectin lec-3, 36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN*) und C-Typ-Lektin-Domänen-enhaltende Proteine (*C-type lectin domain-containing protein 160*). Auch hier weisen mehrere der genannten Proteine eine PC-Modifikation auf. Midha et al beschreibt 2018, dass die meisten dieser ES-Proteine sowie andere sezernierte Proteine im Adult- und auch Larvenstadium antimikrobielle Eigenschaften aufweisen und *Ascaris suum* vor der mikrobiellen Umgebung im Darmtrakt des Wirtes schützen (123). Dies trägt dazu bei, dass eine langanhaltende Persistenz dieser Darmparasiten ermöglicht wird. In einer weiterführenden aktuellen Arbeit aus dem Jahr 2021 analysierten ebenfalls Midha et al die Funktionen des auch hier nachgewiesenen ES-Proteins AsCTL-42 (UniProt-Name: *C-type lectin domain-containing protein 160*), ein 42kDa schweres Signalpeptid-enhaltendes CTL-Protein, welches aus im Darm lebenden adulten *A. suum*-Würmern rekombinant hergestellt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass AsCTL-42 zum einen in der Lage ist, eine Invasion von Wirtsdarmepithelzellen durch Salmonellen zu reduzieren, zum anderen aber auch eine

Bindung an ausgewählte CTL-Rezeptoren des Wirtes eingehen kann (160). Auch Williams et al sowie Wang et al berichten, dass der in seiner adulten Form im proximalen Dünndarm befindliche Darmparasit *Ascaris suum*, Modulationen in der mikrobiellen Zusammensetzung des proximalen Dickdarms, einem Ort mit hoher Bakterienbelastung, bewirken kann (161, 162).

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass die oben genannten ES-Proteine und andere von Parasiten sezernierte Proteine an der triadischen Wechselwirkung zwischen *Ascaris*, Mikrobiotika und den Wirtszellen maßgebend Einfluss ausüben können.

Phosphatidylethanolamine-binding protein ist ein weiteres wichtiges ES-Protein, welches bei der Steuerung diverser Signalwege beteiligt ist. Dazu gehört exemplarisch die Hemmung des MAPK-Weges (105), die Hemmung des NF- κ B-Weges (106), die Regulation von heterotrimeren G-Proteinen (107) sowie die Inhibition der Serinprotease (108). Bei *Toxocara canis* ist Phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP), welches zuerst als TES-26 bezeichnet wurde und später die Umbenennung in Tc-PEB-1 erfolgte (109), ein ES-Protein, bei der die Vermutung aufgestellt wurde, dass es bei der Immunevasion beteiligt ist (110, 111). Bei *Trichuris muris* (Mauspeitschenwurm) wird das ES-Protein Tm16 identifiziert, welches der PEBP-Superfamilie zugeordnet wurde. Tm16 weist einen großen Bindungshohlraum auf, welcher verschiedene Liganden, die an der Signaltransduktion, Zellmigration und -regulation beteiligt sind, aufnehmen kann (112). Basierend auf diesen Erkenntnissen wird auch in der von Mohd-Shaharuddin et al 2021 veröffentlichten Arbeit vermutet, dass das *A. lumbricoides* (eine *Ascaris suum* eng verwandte Spezie) PEBP eine wichtige Rolle beim Überleben des Parasiten im Wirt spielt (113).

Das *Nuclear hormone receptor family member nhr-86* gehört zu den Kernhormonrezeptoren und zeigt eine DNA-bindende Transkriptionsfaktoraktivität. Kernhormonrezeptoren weisen eine intrazelluläre Sensorfunktion auf, welche nach Erkennung spezifischer endogener und exogener Liganden eine adaptive Wirtsreaktion bewirken kann. Peterson et al beschreibt 2019, dass bei *C. elegans* NHR-86 eine Transkriptionsantwort auslöst, welche einen Schutz gegen das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ermöglicht (117). Möglicherweise bietet auch das hier identifizierte Nuclear hormone receptor family member nhr-86 im *A. suum*-Sekretom Schutz gegen das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*.

Serpin B, *Serpin-like protein* und *Serpin B6* sind Proteine aus der Familie der Serpine und sind in der Lage die Aktivität von Serinproteasen zu inhibieren (Serpine=Serin-Protease-Inhibitoren). Allerdings weisen viele andere Vertreter der Serpin-Familie diese Eigenschaft nicht auf. Die proteasehemmenden Serpine sind in der MEROPS-Datenbank im Clan I4 wiederzufinden. Molehin et al beschreibt 2012, dass Serpine in ES-Produkten von Nematoden immunologische Reaktionen oder Funktionen abschwächen können (119). Wang et al wiederum berichtet, dass Serpine die Aktivität von Wirtsproteasen, z.B. Trypsin und Chymotrypsin, negativ beeinflussen können. Außerdem wird vermutet, dass Serpine auch die Oberfläche von sich entwickelnden Larven maskieren und so ermöglichen, dass die Larven während ihrer Passage durch den Wirt dem Wirtsimmunsystem entgehen (25).

Das sezernierte *Multidrug resistance associated protein 1* transportiert ein breites Spektrum von Substraten, einschließlich Arzneimittel, Schwermetallionen, Giftstoffe und Konjugate von Glutathion, Glucuronid sowie Sulfate und kann mit einer Arzneimittelresistenz und Krankheitsanfälligkeit einhergehen. Hierdurch kann möglicherweise die Wirkung antihelminthisch wirkender Medikamente reduziert werden.

Das Polyprotein ABA-1 (*Chain A, The Solution Structure of Aba-1a saturated with oleic acid, polyprotein allergen/antigen, allergen, partial, ABA-1 (Fragment), Polyprotein ABA-1*) gehört zur Gruppe der so genannten Nematoden-Polyprotein-Allergene (NPA), welche eine Klasse von Lipid-bindenden Proteinen bilden. NPAs kommen nur in Nematoden vor und werden als große, sich tandemartig wiederholende Polyproteine hergestellt. Im Anschluss erfolgt die posttranslationale Spaltung in kleine Lipidbindungsproteine. NPAs spielen eine zentrale Rolle beim Transport kleiner hydrophober Verbindungen zwischen den Geweben von Nematoden. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Nährstoffaufnahme sowie in IgE-Antikörper-basierenden Reaktionen bei Infektionen, welche sich wiederum eher im Sinne einer Th2-Immunantwort entzündungshemmend auswirken. Insbesondere in ascariden und filarialen Nematodenarten ist die Wiederholungseinheit der NPAs sehr ähnlich bis identisch. Das ABA-1 ist hierbei die am häufigsten vorkommende Wiederholungseinheit (163).

Die PC-modifizierten Proteine *Vitellogenin-6* und *vit-5* sind im Darm synthetisierte, carbonylierte Eidotterproteine, welche vielfältige Funktionen aufweisen können. Im

Larvenstadium steht hierbei die Funktion als Nährstoff- und Energielieferant im Vordergrund. Untersuchungen an *C. elegans*-Würmern im Adultstadium hingegen haben ergeben, dass Vitellogenin-6 aufgrund der nachgewiesenen Metallionen-Bindungskapazität eine Antioxidansfunktion zugesprochen wurde (121). Dies soll eine Langlebigkeit der adulten Würmer ermöglichen.

Bei *Chain A, The Structure of Ascaris Hemoglobin Domain I* handelt es sich um einen Bestandteil des *Ascaris suum*-Hämoglobins, welches in der perienterischen Flüssigkeit nachweisbar ist und sich verglichen mit den Säugetier-Hämoglobinen mit einer besonders hohen Sauerstoffaffinität kennzeichnet (124). In der 1999 veröffentlichten Arbeit von Minning et al wird erwähnt, dass *Ascaris*-Hämoglobin fast 25.000-mal stärker Sauerstoff bindet als das menschliche Hämoglobin. Außerdem stellen Sie die Vermutung auf, dass *Ascaris*-Hämoglobin unter Verwendung von endogen produziertem Stickstoffmonoxid als „Desoxygenase“ fungiert und so für die Entgiftung von Sauerstoff sorgt bzw. die perienterische Flüssigkeit hypoxisch hält (164).

Bei *thioredoxin peroxidase* handelt es sich genauso wie bei *Peroxiredoxin* um ein Antioxidans, welches die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden zu Wasser bzw. Alkoholen katalysiert. Dadurch bietet sie den Parasiten Schutz vor Sauerstoffradikalen, welche von den Immuneffektorzellen freigesetzt werden.

Hansen et al berichten 2019 neben Proteinen auch von verschiedenen miRNAs enthaltenden identifizierten extrazellulären Vesikeln von *A.suum*-Würmern im Adult- und auch Larvenstadien, welche ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften vorweisen sollen (165). Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich bei miRNAs (Abkürzung für microRNA) um posttranskriptionale Genregulatoren handelt, welche auf komplementären mRNA-Molekülen die Translation bzw. Synthese von bestimmten Proteinen verhindern, in seltenen Fällen auch hochregulieren können. Des Weiteren beschreiben auch Fromm et al 2015 und 2017 von immunregulatorischen miRNAs in extrazellulären Vesikeln der Trematode *Fasciola hepatica* (166, 167).

Insgesamt lässt sich zusammenfassend sagen, dass Helminthen wie hier das *Ascaris suum* in der Entwicklung von sezernierbaren immunmodulatorischen Produkten (Proteine, RNAs, aber auch Lipide und Kohlenhydrate) einzigartig platziert sind und hierdurch das Infektionsgeschehen maßgebend beeinflussen können (168).

4.4 Methodische Diskussion

Zur Analyse des *A. suum*-Sekretoms wurde eine hauseigene etablierte und weitestgehend optimierte Methode verwendet. Obwohl sich diese bereits in vielen vorausgegangenen Arbeiten bewährt hat, ist davon auszugehen, dass einige sezernierte Proteine nicht detektiert werden konnten. Insbesondere bei der Durchsicht der PC-modifizierten ES-Proteine fällt auf, dass die meisten ein Molekulargewicht von >30 kDa aufweisen (siehe Abbildung 18). Ein häufig vorkommendes Phänomen sowie potenzieller Erklärungsansatz für den geringen Nachweis kleiner PC-ES-Proteine (<30 kDa) ist die Gefahr, dass sie von Proteinen mit einer höheren Konzentration verdeckt bzw. maskiert werden können. Eine zu niedrige Konzentration der kleinen Proteine erschweren somit den Nachweis und erfordern möglicherweise eine weitere Aufkonzentrierung. Hinzu kommt eine eventuell unzureichende Proteinauflösung im verwendeten Lysis-Puffer. Hinweis hierfür ist auch der wiederholt nachweisbare vertikale Streifen im basischen Bereich des untersuchten Gels. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion von Phosphorylcholin-modifizierten Proteinen durch Immunoblotting mittels des PC-spezifischen monoklonalen Antikörpers TEPC-15 sowie dem ECL-Verfahren (siehe hierzu 2.2.11). Nachteil dieser Methode ist der hohe Zeitaufwand sowie die notwendige zueinander abgestimmte Optimierung der Versuchsbedingungen (Puffersystem, Trennverfahren, Gelkonzentration, Blockierungsreagenz, Inkubationszeit, Konzentration des Primärantikörpers sowie Sekundärantikörpers usw.). Bei der Analyse des PC-ES-Proteoms konnte das zu starke Hintergrundsignal im sauren Bereich der Blot Folie bzw. des X-Rays trotz Variation des Blockierungsreagenzes und der Antikörperkonzentration nicht signifikant reduziert werden. Als alternative Methode zur Phosphoproteindetektion bietet sich die Anreicherung der PC-Proteine mittels Affinitätschromatographie an.

Bei der Analyse des Sekretoms fällt auf, dass neben sekretierten Proteinen auch vereinzelt typisch intrazelluläre Proteine, wie z.B. *H2B 1/2/3/4/6* und *Actin-2* nachgewiesen werden (siehe hierzu 3.1.). Grund hierfür ist möglicherweise eine Zellschädigung mit konsekutivem Austritt von intrazellulären Proteinen in das RPMI 1640-Medium durch zu häufige Waschvorgänge sowie zu lange Inkubationszeiten im Rahmen der In-vitro-Kultivierung (siehe hierzu 2.2.1). Eine weitere Optimierung der Inkubationsbedingungen könnte möglicherweise eine Reduktion des metabolischen Stresses und somit auch eine geringere Kontamination des Sekretoms bewirken.

4.5 Ausblick

Für die Sicherstellung eines langfristigen Überlebens der weltweit häufigsten Darmparasiten *Ascaris lumbricoides* und *Ascaris suum* sind immunmodulatorische Wirt-Parasit-Wechselwirkungen essenziell. Exkretorisch-sekretorische Proteine, insbesondere solche, welche eine Phosphorylcholin-Modifikation aufweisen, bilden hierbei einen entscheidenden Baustein in der Vermittlung dieser Wechselwirkungen. Ergänzend zur PCom-Analyse sowie Sekretomanalyse der Larvenstadien hat die Identifikation von ES-Proteinen bzw. PC-ES-Proteinen adulter *Ascaris suum*-Würmer das Wissen über die biologische Zusammensetzung verschiedener Kompartimente und Sekretionsprodukte erweitert. Zusätzliche Vergleiche mit Proteom- und PCom-Analysen anderer Nematoden und Trematoden lassen viele Parallelen erkennen. Die PC-Modifikation der Proteine genießt aufgrund seiner vielfältigen Funktion einen besonderen Stellenwert. Neben der immunmodulatorischen Eigenschaft haben viele Untersuchungen gezeigt, dass sie auch für die Fertilität und Entwicklung von Nematoden von besonderer Relevanz ist. Trotz mehrerer Versuche bleibt weiterhin die Kenntnis über die Enzyme, welche für den PC-Transfer auf Proteine, Glykoproteine und Glykoshingolipide verantwortlich sind, aus. Daher sollten hier weitere Untersuchungen stattfinden, da im Falle einer Identifikation der PC-Transferase neue Ansatzpunkte zur Medikamentenentwicklung gegen Nematodeninfektionen entstehen werden.

5 Zusammenfassung

Multizelluläre Parasiten (z. B. Nematoden, Trematoden und Cestoden) setzen Proteine und andere Moleküle in ihre Wirte frei, die so genannten exkretorischen und sekretorischen (ES) Produkte. Diese ES-Produkte besitzen z.T. immunmodulatorische Aktivitäten, die nicht nur eine langfristige Persistenz ermöglichen, sondern auch eine schwere Pathologie aufgrund einer Modulation der zellulären Immunantworten verhindern. Im Allgemeinen wird die T-Helfer Typ 2 (TH2)-Immunantwort favorisiert, wohingegen die TH1-Immunantwort gedämpft wird. Viele der ES-Produkte sind glykosyliert. Zudem wurde gezeigt, dass mehrere ES-Proteine zusätzlich mit Phosphorylcholin (PC) modifiziert sind. Außerdem wurde festgestellt, dass PC-haltige Antigene mit wichtigen proliferativen Signalwegen in B- und T-Zellen, mit der Entwicklung von dendritischen Zellen und Makrophagen sowie mit der Mastzelldegranulation interferieren. Diese Effekte tragen zu den beobachteten niedrigen Antikörper- und Zytokinspiegeln und der Beeinträchtigung der Lymphozytenproliferation bei und werden, zumindest teilweise, durch die Bindung an verschiedene cholinerge Rezeptoren, ähnlich dem Acetyl-, Propionyl- oder Butyrylcholin, vermittelt. In diesem Projekt wurden die exkretorisch-sekretorischen Produkte von *Ascaris suum* im Adultstadium untersucht. Es konnten 354 Proteine identifiziert werden, von denen 53 PC-substituiert waren.

Vergleiche mit den in vorherigen Untersuchungen festgestellten ES-Produkten im Larvenstadium zeigen, dass die Anzahl überlappender Proteine gering ausfällt. Hieraus lässt sich schließen, dass der Übergang vom Larvenstadium zum Adultstadium mit einer deutlichen Änderung des ES-Spektrums einhergeht. Die gering ausfallende Überlappung der PC-ES-Produkte mit den PC-TE-Produkten im Adultstadium ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die PC-Modifikation, abhängig vom betroffenen Kompartiment, unterschiedliche Funktionen ausführt.

Einige der hier identifizierten PC-ES-Produkte könnten an der Abwehr der Wirtsimmunantwort beteiligt sein. Ihre Rolle innerhalb dieser Mechanismen sowie ihre Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren werden Gegenstand weiterer Analysen sein.

6 Summary

Multicellular parasites (e.g. nematodes, trematodes and cestodes) release proteins and other molecules into their hosts, the so called excretory and secretory (ES) products. These ES products possess immunomodulatory activities which not only allow long-term persistence but also prevent severe pathology due to a modulation of cellular immune responses. In general the T helper type 2 (TH2) immune response is favored, whereas the TH1-type is dampened. Many of the ES products are glycosylated and several ES proteins have been shown to be additionally modified with phosphocholine (PC). PC-containing antigens have been found to interfere with key proliferative signaling pathways in B- and T cells, development of dendritic cells and macrophages and mast cell degranulation. These effects contribute to the observed low antibody and cytokine levels and impairment of lymphocyte proliferation and are, at least in part, mediated by binding to various cholinergic receptors similar to acetyl-, propionyl- or butyrylcholine.

In this project, the excretory-secretory products of adult *Ascaris suum* were examined. We could identify 354 proteins of which 53 were found to be PC-substituted.

Comparisons with the ES products found in previous studies in the larval stage show that the number of overlapping proteins is low. From this it can be concluded that the transition from the larval stage to the adult stage is accompanied by a clear change in the ES spectrum. The slight overlap between the PC-ES products and the PC-TE products in the adult stage can possibly be explained by the fact that the PC modification performs different functions depending on the compartment concerned.

Several of these identified PC-substituted ES products may be involved in the defence against the host immune response and their role within these mechanisms as well as their interaction with cellular receptors will be subject to further analyses.

7 Abkürzungsverzeichnis

A. suum	Ascaris suum
A. viteae	Acanthocheilonema viteae
ACN	Acetonitril
ASP	Aspartylprotease
ATP	Adenosintriphosphat
B. malayi	Brugia malayi
BCR	B-Cell-Rezeptor
BLNK	B cell linker protein
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C. elegans	Caenorhabditis elegans
ca.	Circa
CDP-Etn	Cytidindiphosphat-Ethanolamin
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne
CRP	C-reaktive-Protein
d.h.	das heißt
DAG	Diacetylglycerin
DAG	Diacylglycerol
DTT	Dithiotreitol
ECL	Chemilumineszenz
ES-62	Exkretorisch-sekretorisches Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kDa
et al	et alii, et aliae oder et alia
etc.	et cetera/und so weiter
Etn	Ethanolamin

FABP	Fettsäure-bindendes Protein
FcεRI	Hochaffinitätsrezeptor für die Fc-Region der ε schweren Kette von IgE
FCMD	Fukuyama-type congenital muscular dystrophy
g	Gramm
GAL	Galectin
GAP	GTPase-Aktivierungs-Protein
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcNAcT	N-Acetylglucosaminyltransferase
Grb2	Growth-factor-receptor-bound protein 2
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HRP	Horse rhabbit peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
Igα	Immunoglobulin alpha
Igβ	Immunoglobulin beta
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPG	Immobilized pH gradient
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes-Aktivationsmotiv
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LAP	Leucyl-Aminopeptidase
M	Molar

mA	Milliampere
MALDI	Matrix-assisted-laser-desorption-ionisation
max.	maximal
mg	Milligramm
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular weight bzw. Molekulargewicht
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
ng	Nanogramm
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NL	Nicht-Linear
nm	Nanometer
O. gibsoni	Onchocerca gibsoni
O. volvolus	Onchocerca volvolus
p.a.	per anno/pro Jahr
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes-molekulares Muster
PBS	Phosphate buffered saline/Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphorylcholin
pH	pondus hydronenii
pI	isoelektrischer Punkt
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C

PMT	Phosphoethanolamin-N-Methyltransferase
ppm	parts per million
Ptd-Me ₂ E	Phosphatidyl dimethylethanolamin
Ptd-MeE	Phosphatidyl monomethylethanolamin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RCF	Relative centrifugal force
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SC	Sequence Coverage bzw. Sequenzabdeckung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Shc	SH2-containing transforming Protein C1
sIg	Surface Immunoglobulin/Oberflächenimmunoglobulin
sog.	so genannt
Sos-Komplex	Son of sevenless-Komplex
<i>T. spiralis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
tert.	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	Time-of-Flight
TPI	Triosephosphat-Isomerase
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit/Einheit
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter

V	Volt
v.a.	vor allem
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
γ -Phosphatrest	Gamma-Phosphatrest
κ B	Kappa-B
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomische Klassifikation von prominenten Nematoden	2
Abbildung 2: Anatomie von <i>C. elegans</i>	5
Abbildung 3: Lebenszyklus von <i>Ascaris suum</i>	7
Abbildung 4: Postulierte Struktur für PC-haltige N-Glykane von <i>A. viteae</i> (A), <i>C. elegans</i> (B), <i>T. spiralis</i> (C), <i>O. gibsoni</i> und <i>O. volvolus</i> (D)	11
Abbildung 5: Vorkommen PC-haltiger Glykosphingolipide der Arthroserie	12
Abbildung 6: Proteine der Fukutin-Familie in <i>C. elegans</i>	14
Abbildung 7: Überblick zum Cholin-Metabolismus in Nematoden: Kennedy-, Bremer-Greenberg-, Serindecaboxylierungs-Phosphoethanolaminmethylierungsweg und Phosphoethanolamin-Methyltransferaseweg	16
Abbildung 8: B-Zell-Rezeptormodulation durch PC-ES-62	19
Abbildung 9: Hemmung der T-Zell-Antwort durch PC-ES-62	20
Abbildung 10: Modulation auf zellulärer Ebene durch PC-ES-62.....	21
Abbildung 11: Schematischer Aufbau des Verdauroboters (In-Gel-Verdau)	40
Abbildung 12: Schematischer Aufbau des Verdauroboters (On-Membrane-Verdau).....	43
Abbildung 13: Prozentuale Aufteilung der PC-modifizierten und nicht-PC-modifizierten, exkretorisch-sekretorischen Proteine	48
Abbildung 14: Flussdiagramm zu den Arbeitsschritten von der Materialgewinnung bis zur Proteinidentifikation	49
Abbildung 15: Kreisdiagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der ES-Proteine	50
Abbildung 16: 2D-Gel der ES-Produkte von <i>Ascaris suum</i>	51
Abbildung 17: Kreisdiagrammdarstellung der prozentualen Verteilung der PC-modifizierten ES-Proteine	86
Abbildung 18: Blot-Folie mit Nachweis von PC-modifizierten ES-Proteinen von <i>Ascaris suum</i>	87
Abbildung 19: Venn-Diagramm der PC-modifizierten Proteine aus dem Totalextrakt bzw. den einzelnen Organen/Gewebearten von adulten <i>Ascaris suum</i> Würmern sowie den PC-modifizierten exkretorisch-sekretorischen Proteinen von adulten <i>Ascaris suum</i> Würmern	90
Abbildung 20: Venn-Diagramm der ES-Proteine aus den Larvenstadien L3-egg, L3 lung und L4 sowie dem Adultstadium von <i>Ascaris suum</i>	91
Abbildung 21: Venn-Diagramm der ES-Proteine aus den Larvenstadien L3-egg, L3 lung und L4.....	92
Abbildung 22: Venn-Diagramm der ES-Proteine aus adulten Männchen und Weibchen, Mikrofilarien sowie den Larvenstadien von <i>Brugia malayi</i>	92
Abbildung 23: Immunsuppression durch HSP-70	101

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In-Gel-Verdau-Protokoll	41
Tabelle 2: On-Membrane-Verdau-Protokoll	44
Tabelle 3: Strukturproteine	52
Tabelle 4: Signaltransduktion	56
Tabelle 5: Chaperone	60
Tabelle 6: Translation und Proteinsynthese	61
Tabelle 7: Energie- und Redox-Metabolismus	64
Tabelle 8: Protein- und AS-Metabolismus	66
Tabelle 9: Allgemeiner Metabolismus	71
Tabelle 10: Nicht-klassifizierbare Proteine	84
Tabelle 11: Unbekannte Proteine	85
Tabelle 12: PC-modifizierte ES-Proteine	88

10 Literaturverzeichnis

1. Lochnit G, Bongaarts R, Geyer R. Searching new targets for anthelmintic strategies: Interference with glycosphingolipid biosynthesis and phosphorylcholine metabolism affects development of *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 2005; 35(8):911–23. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.02.015.
2. Bulik DA, Robbins PW. The *Caenorhabditis elegans* sqv genes and functions of proteoglycans in development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2002; 1573(3):247–57. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00391-4.
3. Tabuse Y, Nabetani T, Tsugita A. Proteomic analysis of protein expression profiles during *Caenorhabditis elegans* development using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 2005; 5(11):2876–91. doi: 10.1002/pmic.200401154.
4. Cox GN, Kusch M, Edgar RS. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *J Cell Biol* 1981; 90(1):7–17. doi: 10.1083/jcb.90.1.7.
5. Cox GN, Staprans S, Edgar RS. The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 1981; 86(2):456–70. doi: 10.1016/0012-1606(81)90204-9.
6. Blaxter ML. Cuticle surface proteins of wild type and mutant *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 1993; 268(9):6600–9.
7. Cookson E, Blaxter ML, Selkirk ME. Identification of the major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(13):5837–41. doi: 10.1073/pnas.89.13.5837.
8. Blaxter M. Nematode surface coats: Actively evading Immunity. *Parasitology Today* 1992; 8(7):243–7.
9. Damian RT. Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; 145:101–15. doi: 10.1007/978-3-642-74594-2_9.
10. WHO. (1996) *The World Health Report 1996: Fighting Disease. Fostering Development*. WHO, Geneva.
11. McKellar QA, Jackson F. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol* 2004; 20(10):456–61. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.002.
12. Lochnit G. Immunomodulation by nematodes: Structures, biosynthesis and biological implications of phosphorylcholine substituted antigens.: Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Justus-Liebig University Gießen 2003.
13. GUBANOV NM. Gigantskaia nematoda iz platsenty kitoobraznykh-Placentonema gigantissima nov gen., nov. sp. *Dokl Akad Nauk SSSR* 1951; 77(6):1123–5.
14. Bahrami AK, Zhang Y. When females produce sperm: genetics of *C. elegans* hermaphrodite reproductive choice. *G3 (Bethesda)* 2013; 3(10):1851–9. doi: 10.1534/g3.113.007914.

15. Bird AF, Bird J. *The Structure of Nematodes*. 2nd ed. San Diego: Academic Press Inc; 1991. Verfügbar unter:
<http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10665842>.
16. Altun ZF, Hall DH. *WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Nervous System - General Description*. WormAtlas 2011. doi: 10.3908/wormatlas.1.18.
17. Ward S, Thomson N, White JG, Brenner S. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 1975; 160(3):313–37. doi: 10.1002/cne.901600305.
18. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1986; 314(1165):1–340. doi: 10.1098/rstb.1986.0056.
19. Ax P. *Order in nature - system made by man*. Berlin: Springer; 2003. (Multicellular animals/ Peter Ax ; Vol. 3).
20. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 2015:1–31. doi: 10.1895/wormbook.1.177.1.
21. Coşkun A, Özcan N, Durak AC, Tolu I, Güleç M, Turan C. Intestinal ascariasis as a cause of bowel obstruction in two patients: sonographic diagnosis. *J Clin Ultrasound* 1996; 24(6):326–8. doi: 10.1002/(SICI)1097-0096(199607/08)24:6<326::AID-JCU9>3.0.CO;2-K.
22. Nag HH, Ji R. Ascariasis presenting as acute abdomen-a case report. *Indian J Surg* 2013; 75(Suppl 1):128–30. doi: 10.1007/s12262-012-0514-8.
23. Hoenigl M, Valentin T, Zollner-Schwetz I, Salzer HJF, Raggam RB, Strenger V et al. Pulmonary ascariasis: two cases in Austria and review of the literature. *Wien Klin Wochenschr* 2010; 122 Suppl 3:94–6. doi: 10.1007/s00508-010-1445-7.
24. Kanneganti K, Makker JS, Remy P. *Ascaris lumbricoides*: To Expect the Unexpected during a Routine Colonoscopy. *Case Rep Med* 2013; 2013:579464. doi: 10.1155/2013/579464.
25. Wang T, van Steendam K, Dhaenens M, Vlaminck J, Deforce D, Jex AR et al. Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(10):e2467. doi: 10.1371/journal.pntd.0002467.
26. Levine HS, Silverman PH. Cultivation of *Ascaris suum* larvae in supplemented and unsupplemented chemically defined media. *J Parasitol* 1969; 55(1):17–21.
27. Urban JF, Douvres FW. In vitro development of *Ascaris suum* from third- to fourth-stage larvae and detection of metabolic antigens in multi-well culture systems. *J Parasitol* 1981; 67(6):800–6.
28. Douvres FW, Urban JF. Factors contributing to the in vitro development of *Ascaris suum* from second-stage larvae to mature adults. *J Parasitol* 1983; 69(3):549–58.

29. F W Douvres, J F Urban. Development of *Ascaris suum* from in vivo-derived third-stage larvae to egg-laying adults In Vitro. *Proc.Helminthol.Soc.Wash.* 1986; (53):256–62.
30. Jex AR, Liu S, Li B, Young ND, Hall RS, Li Y et al. *Ascaris suum* draft genome. *Nature* 2011; 479(7374):529–33. doi: 10.1038/nature10553.
31. Lottspeich F. Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999; 38(17):2476–92. doi: 10.1002/(sici)1521-3773(19990903)38:17<2476::aid-anie2476>3.0.co;2-s.
32. Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods* 2005; 35(3):237–47. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.08.015.
33. Wollscheid B, Watts JD, Aebersold R. Proteomics/genomics and signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2004; 16(3):337–44. doi: 10.1016/j.coi.2004.03.016.
34. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405(6788):837–46. doi: 10.1038/35015709.
35. Stults JT, Arnott D. Proteomics. In: *Biological Mass Spectrometry*; Elsevier; 2005. S. 245–89 (Methods in Enzymology).
36. Clark RSB, Bayir H, Jenkins LW. Posttranslational protein modifications. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl):S407-9. doi: 10.1097/01.ccm.0000191712.96336.51.
37. Chen F, Della David, Ferrari A, Götz J. Posttranslational modifications of tau--role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targets* 2004; 5(6):503–15. doi: 10.2174/1389450043345236.
38. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; 80(2):225–36. doi: 10.1016/0092-8674(95)90405-0.
39. Merry AH, Neville DCA, Royle L, Matthews B, Harvey DJ, Dwek RA et al. Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis. *Anal Biochem* 2002; 304(1):91–9. doi: 10.1006/abio.2002.5620.
40. Schachter H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J* 2000; 17(7-9):465–83. doi: 10.1023/a:1011010206774.
41. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001; 291(5512):2364–9. doi: 10.1126/science.291.5512.2364.
42. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:1019–49. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073752.
43. Royle L, Mattu TS, Hart E, Langridge JI, Merry AH, Murphy N et al. An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins. *Anal Biochem* 2002; 304(1):70–90. doi: 10.1006/abio.2002.5619.

44. Schachter H, Chen S, Zhang W, Spence AM, Zhu S, Callahan JW et al. Functional post-translational proteomics approach to study the role of N-glycans in the development of *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Soc Symp* 2002; (69):1–21. doi: 10.1042/bss0690001.
45. Cipollo JF, Awad AM, Costello CE, Hirschberg CB. N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages. *J Biol Chem* 2005; 280(28):26063–72. doi: 10.1074/jbc.M503828200.
46. Harnett W, Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunology Today* 1999; 20(3):125–9. doi: 10.1016/s0167-5699(98)01419-4.
47. Tomasz A. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* 1967; 157(3789):694–7. doi: 10.1126/science.157.3789.694.
48. Weiser JN, Shchepetov M, Chong ST. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1997; 65(3):943–50. doi: 10.1128/IAI.65.3.943-950.1997.
49. Tomasz A, Westphal M, Briles EB, Fletcher P. On the physiological functions of teichoic acids. *J Supramol Struct* 1975; 3(1):1–16. doi: 10.1002/jss.400030102.
50. Brundish DE, Baddiley J. Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J* 1968; 110(3):573–82. doi: 10.1042/bj1100573.
51. Fletcher TC, White A, Baldo BA. Isolation of a phosphorylcholine-containing component from the turbot tapeworm, *Bothriocephalus scorpii* (Müller), and its reaction with C-reactive protein. *Parasite Immunol* 1980; 2(4):237–48. doi: 10.1111/j.1365-3024.1980.tb00056.x.
52. Meub O. Isolierung, Lokalisation und Charakterisierung Phosphorylcholin-modifizierter Proteine des Trematoden *Schistosoma mansoni*: Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Justus-Liebig University Gießen 2007.
53. Lochnit G, Grabitzki J, Henkel B, Tavernarakis N, Geyer R. First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from *Caenorhabditis elegans*: isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6. *Biol Chem* 2006; 387(10-11):1487–93. doi: 10.1515/BC.2006.186.
54. Harnett W, Houston KM, Amess R, Worms MJ. *Acanthocheilonema viteae*: phosphorylcholine is attached to the major excretory-secretory product via an N-linked glycan. *Exp Parasitol* 1993; 77(4):498–502. doi: 10.1006/expr.1993.1113.
55. Grabitzki J, Ahrend M, Schachter H, Geyer R, Lochnit G. The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 161(2):101–11. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.06.014.
56. Timm T, Grabitzki J, Severcan C, Muratoglu S, Ewald L, Yilmaz Y et al. The PCome of *Ascaris suum* as a model system for intestinal nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins and first characterization of the PC-

- epitope structures. *Parasitol Res* 2016; 115(3):1263–74. doi: 10.1007/s00436-015-4863-7.
57. Houston KM, Harnett W. Structure and synthesis of nematode phosphorylcholine-containing glycoconjugates. *Parasitology* 2004; 129(Pt 6):655–61. doi: 10.1017/s0031182004006171.
 58. Wuhrer M, Rickhoff S, Dennis RD, Lochnit G, Soboslay PT, Baumeister S et al. Phosphocholine-containing, zwitterionic glycosphingolipids of adult *Onchocerca volvulus* as highly conserved antigenic structures of parasitic nematodes. *Biochem J* 2000; 348(Pt 2):417–23.
 59. Ubeira FM, Leiro J, Santamarina MT, Sanmartin-Duran ML. Modulation of the anti-phosphorylcholine immune response during *Trichinella spiralis* infections in mice. *Parasitology* 1987; 95 (Pt 3):583–92. doi: 10.1017/S0031182000058005.
 60. Ubeira FM, Leiro J, Santamarina MT, Villa TG, Sanmartín-Durán ML. Immune response to *Trichinella* epitopes: the antiphosphorylcholine plaque-forming cell response during the biological cycle. *Parasitology* 1987; 94 (Pt 3):543–53. doi: 10.1017/S0031182000055888.
 61. Harnett W, Worms MJ, Kapil A, Grainger M, Parkhouse RM. Origin, kinetics of circulation and fate in vivo of the major excretory-secretory product of *Acanthocheilonema viteae*. *Parasitology* 1989; 99 Pt 2:229–39. doi: 10.1017/s0031182000058686.
 62. Haslam SM, Khoo K-H, Houston KM, Harnett W, Morris HR, Dell A. Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of *Acanthocheilonema viteae*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 85(1):53–66. doi: 10.1016/s0166-6851(96)02807-1.
 63. Haslam SM, Gems D, Morris HR, Dell A. The glycomes of *Caenorhabditis elegans* and other model organisms. *Biochem Soc Symp* 2002; (69):117–34.
 64. Lochnit G, Dennis RD, Geyer R. Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications. *Biol Chem* 2000; 381(9-10):839–47. doi: 10.1515/BC.2000.106.
 65. MacDonald M, Copeman DB, Harnett W. Do excretory-secretory products of *Onchocerca gibsoni* contain phosphorylcholine attached to O-type glycans? *Int J Parasitol* 1996; 26(10):1075–80.
 66. Gerdt S, Lochnit G, Dennis RD, Geyer R. Isolation and structural analysis of three neutral glycosphingolipids from a mixed population of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda:Rhabditida). *Glycobiology* 1997; 7(2):265–75. doi: 10.1093/glycob/7.2.265.
 67. Dennis RD, Lochnit G, Geyer R. Strategies for preliminary characterization of novel amphoteric glycosphingolipids. *Methods Mol Biol* 1998; 76:197–212. doi: 10.1385/0-89603-355-4:197.
 68. Lochnit G, Dennis RD, Ulmer AJ, Geyer R. Structural elucidation and monokine-inducing activity of two biologically active zwitterionic glycosphingolipids derived

- from the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 1998; 273(1):466–74. doi: 10.1074/jbc.273.1.466.
69. Grabitzki J. Massenspektrometrische Identifizierung posttranslational modifizierter Proteine aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans*: Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Justus-Liebig University Gießen 2006.
 70. Harnett W, McInnes IB, Harnett MM. ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunol Lett* 2004; 94(1-2):27–33. doi: 10.1016/j.imlet.2004.04.008.
 71. Houston KM, Harnett W. Prevention of Attachment of Phosphorylcholine to a Major Excretory-Secretory Product of *Acanthocheilonema viteae* Using Tunicamycin. *J Parasitol* 1996; 82(2):320. doi: 10.2307/3284169.
 72. Yusuf HK, Pohlentz G, Sandhoff K. Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in rat liver Golgi apparatus by blocking sugar nucleotide transport across the membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(23):7075–9. doi: 10.1073/pnas.80.23.7075.
 73. Houston KM, Cushley W, Harnett W. Studies on the site and mechanism of attachment of phosphorylcholine to a filarial nematode secreted glycoprotein. *J Biol Chem* 1997; 272(3):1527–33. doi: 10.1074/jbc.272.3.1527.
 74. Houston KM, Harnett W. Mechanisms underlying the transfer of phosphorylcholine to filarial nematode glycoproteins--a possible role for choline kinase. *Parasitology* 1999; 118 (Pt 3):311–8. doi: 10.1017/S0031182098003722.
 75. Cipollo JF, Awad A, Costello CE, Robbins PW, Hirschberg CB. Biosynthesis in vitro of *Caenorhabditis elegans* phosphorylcholine oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(10):3404–8. doi: 10.1073/pnas.0400384101.
 76. Lysenko E, Richards JC, Cox AD, Stewart A, Martin A, Kapoor M et al. The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Mol Microbiol* 2000; 35(1):234–45. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01707.x.
 77. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394(6691):388–92. doi: 10.1038/28653.
 78. Aravind L, Koonin EV. The fukutin protein family – predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Current Biology* 1999; 9(22):R836-R837. doi: 10.1016/S0960-9822(00)80039-1.
 79. Harnett W, Rzepecka J, Houston KM. How do nematodes transfer phosphorylcholine to carbohydrates? *Trends Parasitol* 2010; 26(3):114–8. doi: 10.1016/j.pt.2009.12.003.
 80. Houston K. Investigation of the nature of potential phosphorylcholine donors for filarial nematode glycoconjugates. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 123(1):55–66. doi: 10.1016/s0166-6851(02)00134-2.

81. Lochnit G, Geyer R. Evidence for the presence of the Kennedy and Bremer-Greenberg pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(4):1239–43.
82. Brendza KM, Haakenson W, Cahoon RE, Hicks LM, Palavalli LH, Chiapelli BJ et al. Phosphoethanolamine N-methyltransferase (PMT-1) catalyses the first reaction of a new pathway for phosphocholine biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 2007; 404(3):439–48. doi: 10.1042/BJ20061815.
83. Heise V. Entwicklung einer ELISA-Hochdurchsatzmethode für RNA-Interferenz-Experimente am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*: Institute of Biochemistry, Medical Faculty, Justus-Liebig University Gießen 2010.
84. Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernández F. *Trichinella* antigens: a review. *Vet Res* 1999; 30(6):559–71.
85. Harnett MM, Deehan MR, Williams DM, Harnett W. Induction of signalling anergy via the T-cell receptor in cultured Jurkat T cells by pre-exposure to a filarial nematode secreted product. *Parasite Immunol* 1998; 20(11):551–63. doi: 10.1046/j.1365-3024.1998.00181.x.
86. Harnett W, Harnett MM. Inhibition of murine B cell proliferation and down-regulation of protein kinase C levels by a phosphorylcholine-containing filarial excretory-secretory product. *J Immunol* 1993; 151(9):4829–37.
87. Deehan MR, Harnett MM, Harnett W. A filarial nematode secreted product differentially modulates expression and activation of protein kinase C isoforms in B lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159(12):6105–11.
88. Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 2000; 164(12):6453–60. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6453.
89. Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 1992; 267(32):23301–8.
90. Melendez AJ, Harnett MM, Pushparaj PN, Wong WSF, Tay HK, McSharry CP et al. Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes. *Nat Med* 2007; 13(11):1375–81. doi: 10.1038/nm1654.
91. Harnett W, Harnett MM. Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2001; 1539(1-2):7–15. doi: 10.1016/s0167-4889(01)00101-x.
92. Goodridge HS, Wilson EH, Harnett W, Campbell CC, Harnett MM, Liew FY. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *J Immunol* 2001; 167(2):940–5. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.940.
93. Houston KM, Wilson EH, Eyres L, Brombacher F, Harnett MM, Alexander J et al. Presence of phosphorylcholine on a filarial nematode protein influences

- immunoglobulin G subclass response to the molecule by an interleukin-10-dependent mechanism. *Infect Immun* 2000; 68(9):5466–8. doi: 10.1128/iai.68.9.5466-5468.2000.
94. Goodridge HS, McGuinness S, Houston KM, Egan CA, Al-Riyami L, Alcocer MJC et al. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol* 2007; 29(3):127–37. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00926.x.
95. Harnett W, Deehan MR, Houston KM, Harnett MM. Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein. *Parasite Immunol* 1999; 21(12):601–8. doi: 10.1046/j.1365-3024.1999.00267.x.
96. Pleiman CM, D'Ambrosio D, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunology Today* 1994; 15(9):393–9. doi: 10.1016/0167-5699(94)90267-4.
97. Cambier JC, Pleiman CM, Clark MR. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:457–86. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002325.
98. Goodridge HS, Deehan MR, Harnett W, Harnett MM. Subversion of immunological signalling by a filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product. *Cell Signal* 2005; 17(1):11–6. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.05.014.
99. Harnett W, Harnett MM. What causes lymphocyte hyporesponsiveness during filarial nematode infection? *Trends Parasitol* 2006; 22(3):105–10. doi: 10.1016/j.pt.2006.01.010.
100. Goodridge HS, Stepek G, Harnett W, Harnett MM. Signalling mechanisms underlying subversion of the immune response by the filarial nematode secreted product ES-62. *Immunology* 2005; 115(3):296–304. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02167.x.
101. Melendez AJ, Harnett MM, Allen JM. Crosstalk between ARF6 and protein kinase α in Fc γ RI-mediated activation of phospholipase D1. *Current Biology* 2001; 11(11):869–74. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00260-3.
102. Roberts TM, Stewart M. Role of major sperm protein (MSP) in the protrusion and retraction of *Ascaris* sperm. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 297:265–93. doi: 10.1016/B978-0-12-394308-8.00007-8.
103. Norman KR, Fazzio RT, Mellem JE, Espelt MV, Strange K, Beckerle MC et al. The Rho/Rac-family guanine nucleotide exchange factor VAV-1 regulates rhythmic behaviors in *C. elegans*. *Cell* 2005; 123(1):119–32. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.001.
104. Li J, Tewari M, Vidal M, Lee SS. The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 2007; 301(1):82–91. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.10.013.
105. Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999; 401(6749):173–7. doi: 10.1038/43686.

106. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D et al. Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2001; 21(21):7207–17. doi: 10.1128/MCB.21.21.7207-7217.2001.
107. Krosiak T, Koch T, Kahl E, Höllt V. Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(43):39772–8. doi: 10.1074/jbc.M106991200.
108. Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem* 2001; 276(1):535–40. doi: 10.1074/jbc.M002524200.
109. Maizels RM. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol* 2013; 193(4):365–74. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.032.
110. Maizels RM, Tetteh KK, Loukas A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int J Parasitol* 2000; 30(4):495–508. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00022-9.
111. Zhu X-Q, Korhonen PK, Cai H, Young ND, Nejsum P, Samson-Himmelstjerna G von et al. Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. *Nat Commun* 2015; 6:6145. doi: 10.1038/ncomms7145.
112. Liu Z, Kelleher A, Tabb S, Wei J, Pollet J, Hotez PJ et al. Identification, Characterization, and Structure of Tm16 from *Trichuris muris*. *J Parasitol Res* 2017; 2017:4342789. doi: 10.1155/2017/4342789.
113. Mohd-Shaharuddin N, Lim YAL, Ngui R, Nathan S. Expression of *Ascaris lumbricoides* putative virulence-associated genes when infecting a human host. *Parasit Vectors* 2021; 14(1):176. doi: 10.1186/s13071-021-04680-y.
114. Asea A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; (183):111–27. doi: 10.1007/978-3-540-72167-3_6.
115. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci* 2008; 33(2):71–9. doi: 10.1016/j.tibs.2007.10.005.
116. Ahmed AK, Mun H-S, Aosai F, Piao L-X, Fang H, Norose K et al. Roles of *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 in host defense against *T. gondii* infection. *Microbiol Immunol* 2004; 48(11):911–5. doi: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03611.x.
117. Peterson ND, Cheesman HK, Liu P, Anderson SM, Foster KJ, Chhaya R et al. The nuclear hormone receptor NHR-86 controls anti-pathogen responses in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2019; 15(1):e1007935. doi: 10.1371/journal.pgen.1007935.
118. Bryant C. Carbon Dioxide Utilisation, and the Regulation of Respiratory Metabolic Pathways in Parasitic Helminths. In: *Advances in Parasitology Volume 13*: Elsevier; 1975. S. 35–69 (*Advances in Parasitology*).
119. Molehin AJ, Gobert GN, McManus DP. Serine protease inhibitors of parasitic helminths. *Parasitology* 2012; 139(6):681–95. doi: 10.1017/S0031182011002435.

120. Grant RP, Buttery SM, Ekman GC, Roberts TM, Stewart M. Structure of MFP2 and its function in enhancing MSP polymerization in *Ascaris* sperm amoeboid motility. *J Mol Biol* 2005; 347(3):583–95. doi: 10.1016/j.jmb.2005.01.054.
121. Nakamura A, Yasuda K, Adachi H, Sakurai Y, Ishii N, Goto S. Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264(2):580–3. doi: 10.1006/bbrc.1999.1549.
122. Figueiredo BC, Assis NRG, Morais SB, Ricci ND, Pinheiro CS, Martins VP et al. Schistosome syntenin partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(8):e3107. doi: 10.1371/journal.pntd.0003107.
123. Midha A, Janek K, Niewienda A, Henklein P, Guenther S, Serra DO et al. The Intestinal Roundworm *Ascaris suum* Releases Antimicrobial Factors Which Interfere With Bacterial Growth and Biofilm Formation. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:271. doi: 10.3389/fcimb.2018.00271.
124. Yang J, Kloek AP, Goldberg DE, Mathews FS. The structure of *Ascaris* hemoglobin domain I at 2.2 Å resolution: molecular features of oxygen avidity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(10):4224–8. doi: 10.1073/pnas.92.10.4224.
125. Boulanger D, Trottein F, Mauny F, Bremond P, Couret D, Pierce RJ et al. Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous schistosome-derived glutathione S-transferase. *Parasite Immunol* 1994; 16(8):399–406. doi: 10.1111/j.1365-3024.1994.tb00367.x.
126. Capron A, Capron M, Dombrowicz D, Riveau G. Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3):9–15. doi: 10.1159/000053656.
127. Harnett W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol Biochem Parasitol* 2014; 195(2):130–6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.03.007.
128. Hewitson JP, Harcus YM, Curwen RS, Dowle AA, Atmadja AK, Ashton PD et al. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 160(1):8–21. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.02.007.
129. Jenkins SJ, Hewitson JP, Jenkins GR, Mountford AP. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. *Parasite Immunol* 2005; 27(10-11):385–93. doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00789.x.
130. Lightowers MW, Rickard MD. Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* 1988; 96 Suppl:S123-66. doi: 10.1017/s0031182000086017.
131. Goto S, Nakamura A, Radak Z, Nakamoto H, Takahashi R, Yasuda K et al. Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches. *Mechanisms of Ageing and Development* 1999; 107(3):245–53. doi: 10.1016/s0047-6374(98)00133-x.
132. Bennuru S, Semnani R, Meng Z, Ribeiro JMC, Veenstra TD, Nutman TB. *Brugia malayi* excreted/secreted proteins at the host/parasite interface: stage- and gender-

- specific proteomic profiling. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(4):e410. doi: 10.1371/journal.pntd.0000410.
133. Altun ZF, Hall DH. *WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction*. WormAtlas 2006. doi: 10.3908/wormatlas.1.1.
134. Kao G, Huang C, Hedgecock EM, Hall DH, Wadsworth WG. The role of the laminin beta subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*. *Dev Biol* 2006; 290(1):211–9. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.026.
135. Kipreos ET, Lander LE, Wing JP, He WW, Hedgecock EM. *cul-1* Is Required for Cell Cycle Exit in *C. elegans* and Identifies a Novel Gene Family. *Cell* 1996; 85(6):829–39. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81267-2.
136. Harnett W, Harnett MM, Byron O. Structural/functional aspects of ES-62--a secreted immunomodulatory phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4(1):59–71. doi: 10.2174/1389203033380368.
137. Tang L, Smith VP, Gounaris K, Selkirk ME. *Brugia pahangi*: the cuticular glutathione peroxidase (gp29) protects heterologous membranes from lipid peroxidation. *Exp Parasitol* 1996; 82(3):329–32. doi: 10.1006/expr.1996.0041.
138. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; 153(3731):80–2. doi: 10.1126/science.153.3731.80.
139. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; 56(1):72–7. doi: 10.1073/pnas.56.1.72.
140. Cao Z-Q, Guo X-L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein Cell* 2016; 7(5):314–24. doi: 10.1007/s13238-016-0262-9.
141. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology* 1999; 9(10):979–84. doi: 10.1093/glycob/9.10.979.
142. Daniels MA, Hogquist KA, Jameson SC. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol* 2002; 3(10):903–10. doi: 10.1038/ni1002-903.
143. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 2001; 409(6821):733–9. doi: 10.1038/35055582.
144. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 2007; 17(5):513–20. doi: 10.1016/j.sbi.2007.09.002.
145. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007; 8(8):825–34. doi: 10.1038/ni1482.

146. Kato A, Favoreto S, Avila PC, Schleimer RP. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2007; 179(2):1080–7. doi: 10.4049/jimmunol.179.2.1080.
147. Moreno Y, Geary TG. Stage- and gender-specific proteomic analysis of *Brugia malayi* excretory-secretory products. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(10):e326. doi: 10.1371/journal.pntd.0000326.
148. Liu F, Cui S-J, Hu W, Feng Z, Wang Z-Q, Han Z-G. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(6):1236–51. doi: 10.1074/mcp.M800538-MCP200.
149. Pearce EJ, Sher A. Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. *Contrib Microbiol Immunol* 1987; 8:219–32.
150. Yoshino TP, Bayne CJ. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 1983; 5(3):317–28. doi: 10.1111/j.1365-3024.1983.tb00747.x.
151. Damian RT. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* 1997; 115 Suppl:S169-75. doi: 10.1017/s0031182097002357.
152. Salzet M, Capron A, Stefano GB. Molecular Crosstalk in Host–Parasite Relationships. *Parasitology Today* 2000; 16(12):536–40. doi: 10.1016/s0169-4758(00)01787-7.
153. McLaren DJ. Disguise as an evasive stratagem of parasitic organisms. *Parasitology* 1984; 88 (Pt 4):597–611. doi: 10.1017/s0031182000085516.
154. Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(3):220–30. doi: 10.1038/nri2039.
155. van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology* 2007; 212(6):475–90. doi: 10.1016/j.imbio.2007.03.009.
156. Arruda LK, Santos ABR. Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(5):399–402. doi: 10.1097/01.all.0000182536.55650.d0.
157. Ramaswamy K, Salafsky B, Potluri S, He YX, Li JW, Shibuya T. Secretion of an anti-inflammatory, immunomodulatory factor by *Schistosomulae* of *Schistosoma mansoni*. *J Inflamm* 1995; 46(1):13–22.
158. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulators. *Molecules* 2018; 23(11). doi: 10.3390/molecules23112846.
159. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJC, Broere F, van der Zee R, Bonorino C et al. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* 2012; 3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00095.
160. Midha A, Goyette-Desjardins G, Goerdeler F, Moscovitz O, Seeberger PH, Tedin K et al. Lectin-Mediated Bacterial Modulation by the Intestinal Nematode *Ascaris suum*. *Int J Mol Sci* 2021; 22(16). doi: 10.3390/ijms22168739.

161. Williams AR, Krych L, Fauzan Ahmad H, Nejsum P, Skovgaard K, Nielsen DS et al. A polyphenol-enriched diet and *Ascaris suum* infection modulate mucosal immune responses and gut microbiota composition in pigs. *PLoS One* 2017; 12(10):e0186546. doi: 10.1371/journal.pone.0186546.
162. Wang Y, Liu F, Urban JF, Paerewijck O, Geldhof P, Li RW. *Ascaris suum* infection was associated with a worm-independent reduction in microbial diversity and altered metabolic potential in the porcine gut microbiome. *Int J Parasitol* 2019; 49(3-4):247–56. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.10.007.
163. Meenan NAG, Ball G, Bromek K, Uhrin D, Cooper A, Kennedy MW et al. Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(4):e1040. doi: 10.1371/journal.pntd.0001040.
164. Minning DM, Gow AJ, Bonaventura J, Braun R, Dewhirst M, Goldberg DE et al. *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature* 1999; 401(6752):497–502. doi: 10.1038/46822.
165. Hansen EP, Fromm B, Andersen SD, Marcilla A, Andersen KL, Borup A et al. Exploration of extracellular vesicles from *Ascaris suum* provides evidence of parasite-host cross talk. *J Extracell Vesicles* 2019; 8(1). doi: 10.1080/20013078.2019.1578116.
166. Fromm B, Trelis M, Hackenberg M, Cantalapiedra F, Bernal D, Marcilla A. The revised microRNA complement of *Fasciola hepatica* reveals a plethora of overlooked microRNAs and evidence for enrichment of immuno-regulatory microRNAs in extracellular vesicles. *Int J Parasitol* 2015; 45(11):697–702. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.06.002.
167. Fromm B, Ovchinnikov V, Høye E, Bernal D, Hackenberg M, Marcilla A. On the presence and immunoregulatory functions of extracellular microRNAs in the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol* 2017; 39(2). doi: 10.1111/pim.12399.
168. Drurey C, Maizels RM. Helminth extracellular vesicles: Interactions with the host immune system. *Mol Immunol* 2021; 137:124–33. doi: 10.1016/j.molimm.2021.06.017.

11 Anhang

11.1 Identifizierte Proteine

Strukturproteine

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
333	Asuum fasta	Intermediate filament protein A	140.7	5.9	15.9
76	ES Nematoden	Intermediate filament protein	92.3	8.5	18.4
218	Asuum fasta	intermediate filament tail domain containing protein	42.1	5.3	32.6
128	Asuum fasta	Actin-2, partial	40.2	5.6	30.3
129	Asuum fasta	Actin-2	48.2	5.1	38.0
130	Asuum fasta	Actin, partial	41.8	5.2	38.0
59	Asuum fasta	Tropomyosin	10.7	5.0	64.1
238	Asuum fasta	Tropomyosin	31.1	4.6	39.1
98	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein	197.9	5.3	19.2
105	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial	228.9	5.4	13.0
186	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein	220.3	5.3	19.5
149	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial	227.9	5.4	21.3
19	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial	146.7	5.1	17.8
108	Asuum fasta	Kinesin-like protein KIF15	116.7	6.4	15.4
119	Asuum fasta	Myosin-XVIIIa	189.7	6.3	17.7
194	Asuum fasta	Myosin-4	226.4	5.4	17.9
195	Asuum fasta	Myosin-4	169.9	5.3	20.7
122	Asuum fasta	Spectrin alpha chain	281.0	5.1	21.5
37	Asuum fasta	Spectrin beta chain	476.0	6.1	14.7
136	ES Nematoden	Kinesin motor domain containing protein	121.6	6.0	17.9
169	Asuum fasta	Basement membrane proteoglycan	90.7	4.9	24.0
192	Asuum fasta	Centrosomal protein of 97 kDa	86.1	10.0	27.6
193	ES Nematoden	myosin heavy chain B	149.6	5.2	22.0
241	Asuum fasta	Myosin heavy chain	218.2	5.5	17.3
279	Asuum fasta	Unconventional myosin heavy chain 6	244.6	9.6	18.4
234	Asuum fasta	Filamin-C	288.8	5.9	8.6
235	Asuum fasta	Filamin/ABP280 repeat family protein	397.8	6.5	8.3
247	ES Nematoden	Collagen alpha-4(VI) chain	47.4	6.0	52.9
250	ES Nematoden	Collagen alpha-5(VI) chain	43.1	3.7	50.6
256	Asuum fasta	Talin-1, partial	277.0	6.1	11.8
257	ES Nematoden	Talin 2	275.0	6.0	11.8
284	Asuum fasta	Cytoskeleton-associated protein 5	165.2	7.8	15.8
286	Asuum fasta	Laminin subunit alpha-2	51.9	6.3	25.1
343	Asuum fasta	Tropomodulin family protein	52.3	10.0	28.9
352	Asuum fasta	Band 4.1-like protein 1	420.9	6.5	12.5
354	Asuum fasta	Titin	704.8	5.0	6.5
203	Asuum fasta	Cuticle collagen 34, partial	23.4	12.4	44.3
207	Asuum fasta	Sperm-specific protein ZC168.6	10.1	9.2	84.5
294	ES Nematoden	major sperm protein 2 cytoskeletal	18.5	9.7	57.7
295	Asuum fasta	Major sperm protein isoform beta	14.2	9.1	74.0
317	Asuum fasta	major sperm protein	18.1	4.6	36.3
316	Asuum fasta	Sperm-specific class P protein 19, partial	11.7	10.1	61.7
110	Asuum fasta	Muscle M-line assembly protein unc-89	601.5	5.1	9.2
68	Asuum fasta	Muscle M-line assembly protein unc-89	717.2	5.0	11.8
219	Asuum fasta	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	55.0	7.1	26.5
283	ES Nematoden	nuclear anchorage defective protein ANC-1	73.4	6.2	25.3

Signaltransduktion

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
65	Asuum fasta	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	49.9	5.4	48.6
7	Asuum fasta	Protein vav-1	107.3	6.7	23.9
54	Asuum fasta	Tyrosine-protein kinase kin-31	51.9	9.5	29.6
339	Asuum fasta	Tyrosine-protein kinase kin-31	49.5	9.7	21.9
69	Asuum fasta	Rap guanine nucleotide exchange factor 1	67.5	5.3	22.9
90	Asuum fasta	WASH complex subunit FAM21A	92.2	4.9	24.3
182	ES Nematoden	complex subunit FAM21A	92.2	4.9	21.5
92	ES Nematoden	protein kinase 3	679.4	5.1	11.1
109	ES Nematoden	protein phosphatase	51.4	5.9	26.3
111	Asuum fasta	Dedicator of cytokinesis protein 11	204.4	6.3	11.7
184	Asuum fasta	FMRFa-like protein precursor 11	22.4	11.2	37.9
208	Asuum fasta	Guanylate cyclase receptor-type gcy-1	29.2	5.4	33.6
99	ES Nematoden	peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	117.4	5.7	20.1
236	Asuum fasta	14-3-3-like protein, partial	23.8	4.7	32.1
245	ES Nematoden	synembryn	13.0	4.9	50.9
255	Asuum fasta	Phosphatidylinositol 3-kinase age-1	123.5	6.2	11.0
264	Asuum fasta	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15	165.1	6.1	12.7
310	Asuum fasta	3',5'-cyclic phosphodiesterase pde-5, partial	8.4	5.1	66.2
320	ES Nematoden	Phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein	29.2	6.9	28.9
329	Asuum fasta	Stress-activated protein kinase jnk-1	46.0	6.0	24.1
326	ES Nematoden	MEGF3, EGF-like-domain, multiple 2, cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2, epidermal growth factor-like 2, multiple epidermal growth factor-like domains 3	65.6	10.4	20.3
158	ES Nematoden	Arsenite-resistance protein 2 containing protein	84.2	5.4	20.1
276	Asuum fasta	Phosphatidylethanolamine-binding protein	22.6	9.1	38.0
304	Asuum fasta	RhoGEF domain containing protein	96.9	8.4	15.7

Chaperone

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
47	Asuum fasta	Heat shock 70 kDa protein A	41.6	6.8	40.6
306	Asuum fasta	Heat shock 70 kDa protein F	72.7	6.3	26.2
46	ES Nematoden	Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)	70.8	5.3	29.3
307	Asuum fasta	Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)	71.5	6.1	26.5
211	Asuum fasta	T-complex protein 1 subunit epsilon	39.6	7.8	40.0
55	ES Nematoden	T-complex protein 1, epsilon subunit	59.5	5.6	28.9

Translation und Proteinsynthese

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
301	Asuum fasta	60S ribosomal protein L5	13.2	4.6	35.6
1	Asuum fasta	60S ribosomal protein L13	24.7	11.9	20.2
2	Asuum fasta	60S ribosomal protein L13	24.7	11.9	20.2
146	Asuum fasta	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15	63.2	10.1	17.8
233	Asuum fasta	28S ribosomal protein S22	48.3	6.6	21.2
56	Asuum fasta	Argonaute ALG-new2	107.9	9.8	20.0
11	Asuum fasta	Far upstream element-binding protein 2, partial	22.5	6.2	45.8
26	Asuum fasta	Ribosome production factor 2, partial	39.2	11.0	27.8
85	Asuum fasta	Ribosome production factor 2, partial	40.6	10.7	34.3
53	Asuum fasta	Nuclear hormone receptor family member nhr-86	29.9	10.6	32.3
75	Asuum fasta	H2B 1/2/3/4/6	13.5	10.9	56.6
41	ES Nematoden	BTB/POZ domain containing protein	71.1	6.2	20.4
126	ES Nematoden	BTB/POZ domain containing protein	61.2	5.8	33.6
181	Asuum fasta	BTB/POZ domain containing protein	44.0	9.8	33.4
348	ES Nematoden	BTB/POZ domain containing protein	71.1	6.2	20.4
164	ES Nematoden	Transcription initiation factor IIB	32.8	9.3	33.4
246	Asuum fasta	Transcription factor E2F7	70.9	9.7	20.5
290	Asuum fasta	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	96.5	5.6	32.8
77	Asuum fasta	TAR DNA-binding protein 43	48.8	6.1	15.9
212	Asuum fasta	Brix domain containing protein 1 homolog	32.5	10.7	44.8

Energie- und Redox-Metabolismus

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
114	Asumum fasta	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	82.3	9.1	21.4
269	Asumum fasta	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	39.7	6.3	31.7
134	ES Nematoden	dehydrogenase E1 component	28.9	8.7	23.7
331	Asumum fasta	pyruvate dehydrogenase type II alpha subunit, partial	43.2	8.8	33.5
27	Asumum fasta	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	68.8	5.8	29.9
94	Asumum fasta	Glucose-6-phosphate isomerase	64.1	6.8	35.1
95	Asumum fasta	glucose-6-phosphate isomerase	75.8	9.0	23.3
22	ES Nematoden	fructose-bisphosphate aldolase 1	43.4	9.1	40.5
23	Asumum fasta	Fructose-bisphosphate aldolase 1	40.4	8.6	52.0
21	Asumum fasta	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.1	7.0	33.5
120	Asumum fasta	Phosphoglycerate kinase, partial	44.7	7.0	55.7
42	Asumum fasta	enolase	47.4	6.0	61.7
30	Asumum fasta	flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase	70.5	8.8	19.1
28	Asumum fasta	flavoprotein subunit of complex II (Caenorhabditis elegans)	70.4	6.2	20.4
115	Asumum fasta	Alcohol dehydrogenase NADP+ A	36.6	6.2	42.1
291	Asumum fasta	Cytochrome b-c1 complex subunit 1	52.6	6.2	27.6
314	Asumum fasta	NADH dehydrogenase ubiquinone 1 beta subcomplex subunit 10	32.1	6.0	38.6
275	ES Nematoden	H+ or Na+-translocating NADH Dehydrogenase Family NADH dehydrogenase (ubiquinone)flavoprotein 1, mitochondrial	58.6	9.8	16.0
162	Asumum fasta	phosphoenolpyruvate carboxykinase	72.2	6.4	30.5
163	ES Nematoden	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	45.1	6.5	34.0

Protein- und AS-Metabolismus

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
71	ES Nematoden	glutamatdehydrogenase	56.8	7.8	46.9
72	Asumum fasta	Glutamat dehydrogenase 2	55.2	7.8	45.7
261	Asumum fasta	Glutamat dehydrogenase1	63.8	9.3	22.3
13	Asumum fasta	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1, partial	128.9	5.8	19.3
74	Asumum fasta	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs gon-1	241.0	9.7	6.8
81	Asumum fasta	Neprilysin-1	174.6	4.9	15.0
82	ES Nematoden	family M13 unassigned peptidases	175.2	4.9	23.1
123	Asumum fasta	Proteasome subunit beta type-5	31.2	5.7	50.7
125	ES Nematoden	proteasome catalytic subunit 3 (Brugia malayi)	34.0	6.2	50.0
159	Asumum fasta	Aminoacylase-1	48.7	6.8	30.2
220	Asumum fasta	Prolyl endopeptidase	92.9	8.9	21.5
242	ES Nematoden	family M1 unassigned peptidases (Caenorhabditis elegans)	34.2	5.3	47.7
251	Asumum fasta	BTB and MATH domain-containing protein 40	45.8	9.2	19.7
263	Asumum fasta	Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	35.9	4.8	25.5
324	Asumum fasta	Aminopeptidase N	178.2	4.9	17.5
325	Asumum fasta	Netrin unc-6, partial	68.5	10.4	19.4
36	ES Nematoden	subfamily S1A unassigned peptidases (Brugia malayi)	49.8	6.3	30.4
321	ES Nematoden	subfamily SB9 unassigned peptidases (Caenorhabditis elegans)	101.5	8.6	18.3
268	ES Nematoden	serpin B	35.2	5.0	31.2
271	Asumum fasta	Serpin-like protein	30.5	6.1	39.3
272	Asumum fasta	serpin B	33.4	5.3	39.1
273	Asumum fasta	Serpin B6	41.4	5.0	33.0

Allgemeiner Metabolismus

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
12	Asuum fasta	hyaluronoglucosaminidase 4	25.0	9.6	32.4
17	Asuum fasta	putative achaete scute target 1	72.5	9.5	17.0
177	Asuum fasta	Past1; putative achaete scute target 1	72.5	9.5	17.0
18	Asuum fasta	MFP2	38.1	6.7	44.1
20	ES Nematoden	MFP2	44.3	9.1	40.2
24	Asuum fasta	Uridine-cytidine kinase 2-B	28.6	6.5	20.4
25	Asuum fasta	uridine monophosphate kinase	31.9	8.0	18.3
32	ES Nematoden	SNF2 family N-terminal domain containing protein	103.5	6.9	17.4
38	Asuum fasta	DNA topoisomerase 2 [Ascaris suum]	158.5	9.2	21.0
39	Asuum fasta	Alpha-N-acetylgalactosaminidase	44.6	6.3	35.1
44	Asuum fasta	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	20.2	9.8	40.0
48	ES Nematoden	Vacuolar assembly protein VPS41 homolog	92.3	5.6	26.2
49	Asuum fasta	Import inner membrane translocase subunit tim-44, partial	37.2	6.3	40.6
50	ES Nematoden	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto aciddehydrogenase complex	15.8	7.6	45.1
52	Asuum fasta	protein sorting-associated protein 13b	230.9	5.7	15.7
61	Asuum fasta	Genome polyprotein	349.9	5.4	15.6
73	Asuum fasta	Endoribonuclease dcr-1	224.2	5.5	17.2
86	Asuum fasta	Structural maintenance of chromosomes protein 2	136.3	8.5	28.7
97	Asuum fasta	DNA polymerase I	118.4	5.6	20.2
103	Asuum fasta	Bloom syndrome protein	122.0	9.7	13.8
107	Asuum fasta	Golgin subfamily A member 5	67.4	6.1	19.7
135	ES Nematoden	DNA replication licensing factor MCM5	31.0	9.6	27.2
180	Asuum fasta	DNA replication licensing factor mcm-5	61.9	9.6	26.7
139	Asuum fasta	Apolipoprotein	353.4	9.4	13.3
152	ES Nematoden	Ribophorin I family protein	64.0	8.9	24.3
153	Asuum fasta	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase	64.5	7.1	25.8
165	Asuum fasta	Alkylated DNA repair protein alkB 1	43.6	9.5	34.4
167	Asuum fasta	Rabenosyn-5	66.7	5.9	30.7
170	ES Nematoden	Tomosyn (vertebrate synaptic protein)	18.1	9.0	67.7
171	Asuum fasta	ATP-dependent RNA helicase DDX41	73.6	6.4	28.6
174	Asuum fasta	Multidrug resistance-associated protein 1	139.6	9.2	10.1
178	Asuum fasta	EH domain-containing protein 4	72.6	9.4	15.9
187	ES Nematoden	Cu/Zn superoxide dismutase	10.6	6.3	63.7
188	Asuum fasta	Superoxide dismutase Cu-Zn	16.9	6.0	51.6
206	ES Nematoden	kinase 2	43.8	9.0	27.7
214	ES Nematoden	kinase 8	25.4	9.9	26.4
209	Asuum fasta	Protein lin-7 B	20.3	10.1	47.5
210	Asuum fasta	Beta 1,4-mannosyltransferase egh	56.9	8.9	28.2
215	Asuum fasta	Chain A, The Solution Structure Of Aba-1a Saturated With Oleic Acid	15.2	6.1	64.9
216	Asuum fasta	polyprotein allergen/antigen	126.0	8.8	13.5
217	Asuum fasta	allergen, partial	45.1	7.9	23.8
303	Asuum fasta	Polyprotein ABA-1	122.3	9.0	29.9
349	ES Nematoden	ABA-1 (Fragment)	108.3	9.0	33.4
226	ES Nematoden	tRNA modification GTPase TrmE family protein	21.4	10.1	27.4
229	ES Nematoden	3-dehydrogenase	26.1	5.4	26.3
240	ES Nematoden	Type III restriction enzyme, res subunit family protein	77.9	9.3	23.6
259	Asuum fasta	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3	91.3	5.1	13.2
262	ES Nematoden	oligomeric Golgi complex subunit 3	83.9	5.6	14.4
270	Asuum fasta	Lig3; ligase III, DNA, ATP-dependent	65.9	10.1	15.2
274	Asuum fasta	Cold-shock' DNA-binding domain containing protein	28.7	11.0	25.8
305	Asuum fasta	DNA topoisomerase 2	172.2	9.0	16.7
334	Asuum fasta	Chromatin-remodelling complex ATPase chain isw-1	121.6	6.4	20.3
14	Asuum fasta	Tissue factor pathway inhibitor, partial	128.7	5.5	12.8
83	Asuum fasta	Multifunctional protein ADE2	28.0	9.6	49.6
155	Asuum fasta	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	362.1	5.8	12.7
43	ES Nematoden	CDK5RAP3-like protein	57.6	5.0	27.5
3	Asuum fasta	Partitioning defective protein 3	130.9	9.9	17.1
318	Asuum fasta	Cell division cycle 5-related protein	86.5	6.7	22.2
341	ES Nematoden	replication licensing factor MCM7; minichromosome maintenance protein 7 (cell division control protein 47)	83.4	5.8	23.2
62	ES Nematoden	Epithelial Na+ Channel (ENaC) Family Mechanosensory protein 2	31.5	4.8	37.3
93	Asuum fasta	Canalicular Bile Acid Transporter (C-BAT) Family Selenoprotein P Receptor Family LDL receptor-related protein 2	25.8	9.2	36.8

113	ES Nematoden	Na ⁺ -transportin Carboxylic Acid Decarboxylase (NaT-DC) Family Methylmalonyl-CoA decarboxylase gamma chain	81.8	9.1	21.6
116	ES Nematoden	Voltage-gated K ⁺ Channel beta-subunit (Kvbeta)	40.3	5.1	34.1
142	ES Nematoden	Transient Receptor Potential Ca ²⁺ Channel (TRP-CC)	55.9	10.0	30.3
151	ES Nematoden	Toxic Hok/Gef Protein (Hok/Gef) Family Putative Cholesterol Transporter (Start1)	25.7	7.8	52.6
175	ES Nematoden	Cation Symporter Family Glycoside-Pentoside-Hexuronide	17.8	10.5	36.5
179	ES Nematoden	Protein transport protein SEC61 beta subunit	9.5	12.3	51.1
190	ES Nematoden	H ⁺ -or Na ⁺ -translocating F-type, V-type and A-type ATPase	79.7	9.0	9.2
223	ES Nematoden	Synaptosomal Vesicle Fusion Pore (SVF-Pore)	93.3	6.4	27.8
230	Asumum fasta	multivesicular body protein 2a	31.5	9.1	24.5
231	ES Nematoden	K ⁺ channel tetramerisation domain containing protein	9.3	4.2	37.3
299	Asumum fasta	Annexin Family Ryanodine-Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor Ca ²⁺ Channel (R.R-CaC)	42.5	4.8	34.2
31	ES Nematoden	ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily Nuclear mRNA Exporter (mRNA-E) Family Eukaryotic initiation factor 4A-III	84.0	6.7	16.6
9	ES Nematoden	Non ABC Multidrug Exporter (N-MDE)	49.4	10.3	38.7
313	ES Nematoden	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	101.2	4.9	39.2
221	Asumum fasta	Non ABC Multidrug Exporter (N-MDE)	65.3	6.9	19.6
296	Asumum fasta	Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha	37.2	4.8	22.2
6	Asumum fasta	Vitellogenin-6	207.3	6.9	22.6
5	Asumum fasta	Vitellogenin-6	104.5	9.6	38.2
4	ES Nematoden	vit-5	199.7	7.9	23.4
191	Asumum fasta	Syntenin-1	23.3	9.6	44.8
16	Asumum fasta	Sorting nexin-1	50.8	5.6	32.1
78	Asumum fasta	Transmembrane protein 66	32.9	8.8	23.5
79	ES Nematoden	vasopressin-activated calcium mobilizing putative receptor protein	94.4	8.7	22.3
150	Asumum fasta	Golgi apparatus protein 1	139.2	6.0	23.2
168	ES Nematoden	FYVE zinc finger family protein	66.7	5.9	30.7
227	Asumum fasta	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 1	140.3	5.3	7.9
252	Asumum fasta	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	25.5	10.2	38.2
298	Asumum fasta	Annexin A11	36.6	5.0	45.3
33	Asumum fasta	Transmembrane and TPR repeat-containing protein	86.3	10.0	24.9
88	Asumum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin	32.5	6.7	49.3
173	Asumum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin	31.8	6.4	39.7
258	Asumum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin lec-3	38.5	8.7	44.6
87	Asumum fasta	Urate Transporter (UAT) Family GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GA-LACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL)	33.3	6.7	118.0
260	ES Nematoden	Incompletely characterized transport systems; Putative transport proteins; Urate Transporter (UAT) Family; GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL) (UAT) - Rattus norvegicus (Rat)	37.9	6.8	47.0
172	ES Nematoden	Urate Transporter (UAT) Family GALECTIN-9 (36 KDA. BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN)	48.0	6.5	24.2
248	Asumum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160	47.6	9.4	41.2
249	Asumum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160	43.1	5.7	50.6
266	Asumum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160	39.5	7.0	42.5
282	Asumum fasta	C-type lectin protein 160, partial	55.5	4.8	31.6
328	Asumum fasta	C-type lectin protein 160	60.1	8.5	27.2
327	ES Nematoden	C-type LECTin family member (clec-62)	38.3	5.4	42.5
89	Asumum fasta	Chain A, The Structure Of Ascaris Hemoglobin Domain I	17.9	6.3	50.7
197	Asumum fasta	Glutathione S-transferase 2	19.4	6.9	32.1
198	ES Nematoden	Glutathione-S-transferase	29.7	5.8	28.4
100	Asumum fasta	hemoglobin	40.6	6.1	32.8
102	Asumum fasta	Extracellular globin	40.6	6.1	32.8
40	ES Nematoden	Melibiase family protein	47.4	6.3	32.9
64	ES Nematoden	UDPglucose 6-dehydrogenase	54.6	6.8	12.7
131	Asumum fasta	Peroxisome oxidin	21.5	7.8	36.9
132	Asumum fasta	thioredoxin peroxidase	21.6	6.2	36.9
213	Asumum fasta	alpha/beta-glucosidase agdC	108.9	5.1	21.1
278	Asumum fasta	Globin-like protein 9	56.2	10.5	16.1
281	ES Nematoden	glycoprotein 6-alpha-L-fucosyltransferase	21.3	7.7	44.6
293	Asumum fasta	2-oxoglutarate dehydrogenase, partial	12.8	10.1	52.3
309	Asumum fasta	acyltransferase	50.2	9.6	27.6
322	ES Nematoden	beta-lactamase TEM	13.1	5.7	49.1
337	ES Nematoden	PH domain containing protein; K07187 insulin receptor substrate 1	110.3	6.0	22.7
346	Asumum fasta	NADH dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur protein 7	23.3	10.4	21.4
183	Asumum fasta	Sulfhydryl oxidase 1	77.5	8.9	12.5

Nicht-klassifizierte Proteine

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
10	Asum fasta	protein 17	20.3	9.3	35.2
29	ES Nematoden	WBGene00004127 locus:pqn-40 status:Partially_confirmed	26.1	10.5	42.8
35	ES Nematoden	WBGene0002 1078 status:Partially_confirmed	50.2	9.1	46.3
45	ES Nematoden	protein C01C10.2	33.6	5.7	33.8
57	ES Nematoden	CBR-GST-7 protein	17.4	4.9	30.7
58	Asum fasta	WBGene00077763 status:Predicted	15.9	10.5	59.0
66	ES Nematoden	subunit processome component 20 homolog	67.9	5.8	27.8
67	ES Nematoden	WBGene00001573 locus:gei-16 status:Confirmed	51.9	10.0	34.0
84	ES Nematoden	WBGene00021309 status:Partially_confirmed	21.6	7.8	55.1
91	Asum fasta	WBGene00009598 Sushi domain status:Predicted	208.8	5.6	17.2
101	Asum fasta	CBR-GLB-1 protein	40.6	6.0	32.8
104	Asum fasta	protein tag-278	132.3	5.5	17.9
106	ES Nematoden	aciduria and homocystinuria type D homolog	30.3	6.1	23.8
112	ES Nematoden	Protein Sprint	54.9	5.6	23.6
117	ES Nematoden	protein C12orf4 homolog	61.9	5.5	21.8
121	ES Nematoden	Cysteine rich repeat family protein	137.6	5.9	27.9
133	ES Nematoden	protein T05H10.3	8.8	10.2	79.5
141	Asum fasta	Protein C17C3.11	18.4	9.9	40.4
143	ES Nematoden	protein C2orf43 homolog	38.2	7.8	39.7
147	ES Nematoden	CBR-LFI-1 protein	154.3	5.1	21.2
154	Asum fasta	CBR-LFI-1 protein	158.8	5.7	24.3
166	ES Nematoden	Temporarily Assigned Gene name family member (tag-241)	34.9	4.5	45.8
185	ES Nematoden	complex subunit 8	113.7	6.3	17.9
189	ES Nematoden	phosphatase	25.5	8.8	30.4
200	ES Nematoden	SCP-like extracellular protein	10.2	7.7	48.9
201	Asum fasta	Ancylostoma secreted protein	24.9	6.0	28.8
202	Asum fasta	CBR-LFI-1 protein	17.9	5.8	44.5
204	Asum fasta	Protein TAG-241, isoform b	183.7	6.3	16.4
205	ES Nematoden	RhoGAP domain containing protein	77.4	7.0	28.2
222	Asum fasta	Coiled-coil domain-containing protein	79.7	9.5	31.3
232	Asum fasta	WBGene00011288 status:Partially_confirmed UniProt: Q21887_CAEEL protein_id:CAA94355.2%HMM_hit%1.4e-48	13.6	6.6	32.2
237	Asum fasta	CBR-LEV-11 protein, isoform b	30.6	4.6	39.4
243	ES Nematoden	CBR-TTR-46 protein	15.3	4.9	48.6
253	Asum fasta	esterase D	28.7	6.4	61.7
254	Asum fasta	CBR-TTH-1 protein	21.8	5.9	44.0
265	Asum fasta	Coiled-coil domain-containing protein 102B	37.2	5.5	38.9
267	ES Nematoden	complex subunit 1 homolog	166.6	5.7	22.3
287	Asum fasta	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	170.0	4.9	22.2
289	ES Nematoden	KH domain containing protein	41.1	5.1	25.6
292	Asum fasta	Retrovirus-related Pol polyprotein from type-1 retrotransposable element R2	152.9	10.1	14.0
300	Asum fasta	WBGene0001 1288 status:Partially_confirmed	139.0	13.6	74.2
308	Asum fasta	WBGene00007212 status:Confirmed	16.3	5.1	39.0
311	Asum fasta	Disco-interacting protein 2 C	172.9	9.0	13.8
315	ES Nematoden	PDZ domain protein	31.1	5.3	35.0
323	ES Nematoden	CBR-GST-7 protein	23.5	7.7	54.9
330	Asum fasta	TraB domain-containing protein	56.2	5.3	31.7
340	Asum fasta	feline sarcoma viral/V-FPS fujnami aviansarcoma viral oncogene homolog	59.9	6.5	18.0
342	ES Nematoden	domain-containing protein 2	321.4	5.3	17.5
344	Asum fasta	Mast C-terminus family protein	139.5	9.8	19.8
345	Asum fasta	DeHydrogenases, Short chain family member (dhs-15)	29.3	5.7	42.8
351	ES Nematoden	factor CWC22 homolog	90.0	9.5	19.3
353	Asum fasta	antigen OS=Onchocerca volvulus GN=OV17 PE=2 SV=1	18.2	4.4	72.2
196	ES Nematoden	CBR-CYP-44A1 protein	29.3	10.2	38.7
8	ES Nematoden	WBGene00016024 locus:glb-7 status:Partially_confirmed	46.7	7.0	41.0
148	Asum fasta	mushroom body defect	208.0	5.3	24.0
160	ES Nematoden	DNA-binding protein, 42 kDa containing protein	46.6	6.9	24.8
124	ES Nematoden	Cytoplasmic Membrane-Periplasmic Auxiliary-1 (MPA1)	280.8	5.1	22.0
239	ES Nematoden	Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family Ezrin/Radixin/Moesin-binding Phosphoprotein 50 (EBP50)	54.8	7.0	29.6
288	ES Nematoden	Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family Ezrin/Radixin/Moesin-binding Phosphoprotein 50 (EBP50)	22.6	9.8	45.5
228	ES Nematoden	Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family Ankyrin	140.4	5.3	7.9
338	Asum fasta	Thyroid adenoma-associated protein	153.1	6.4	15.3
319	Asum fasta	Oxidoreductase yhfF	29.2	5.7	34.1

Unbekannte Proteine

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
15	ES Nematoden	protein	70.7	10.0	27.9
34	ES Nematoden	protein	36.9	10.5	47.7
51	ES Nematoden	protein	32.8	5.8	39.6
60	Asuum fasta	protein	11.4	9.3	41.7
63	ES Nematoden	protein	12.5	11.2	62.6
70	ES Nematoden	protein	44.0	5.5	27.1
80	ES Nematoden	protein	14.2	11.3	56.6
96	ES Nematoden	protein	7.9	10.7	82.9
118	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	61.8	5.5	21.8
127	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	51.8	9.5	19.7
138	Asuum fasta	Protein C32D5.7 [Caenorhabditis elegans]	49.2	9.2	31.5
140	ES Nematoden	%193%76.6839378238342%1e-90	21.8	6.0	57.2
144	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	40.0	7.8	33.9
145	ES Nematoden	protein	15.3	9.4	40.1
156	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	38.4	5.8	26.3
157	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	40.8	6.3	29.4
161	ES Nematoden	protein	132.0	7.1	13.3
176	Asuum fasta	protein	6.1	10.4	88.9
199	ES Nematoden	protein	31.1	10.3	32.4
224	ES Nematoden	protein	41.1	10.9	25.7
225	Asuum fasta	protein	18.6	6.7	53.8
244	ES Nematoden	protein	13.2	10.7	48.7
277	ES Nematoden	protein	155.9	6.7	5.2
280	Asuum fasta	protein	9.1	9.1	72.2
285	Asuum fasta	protein	6.5	10.2	58.9
297	ES Nematoden	protein	107.0	9.8	19.0
302	ES Nematoden	protein	7.2	9.7	46.2
312	ES Nematoden	protein	33.2	9.7	43.6
332	ES Nematoden	protein	160.8	6.4	19.0
335	Asuum fasta	Unknown [Ascaris suum]	239.1	6.0	9.3
336	Asuum fasta	Unknown, partial [Ascaris suum]	19.1	10.7	36.9
347	ES Nematoden	protein	132.1	4.7	8.7
350	Asuum fasta	protein	9.1	9.1	72.2
137	ES Nematoden	protein	106.3	5.9	30.9

11.2 PC-modifizierte identifizierte Proteine

Nummer auf dem Gel und Blot	Datenbank	Proteinname	MW [kDa]	pI	SC [%]
6	Asuum fasta	Vitellogenin-6 [Ascaris suum]	207.3	6.9	22.6
4	ES Nematoden	vit-5	199.7	7.9	23.4
5	Asuum fasta	Vitellogenin-6 [Ascaris suum]	104.5	9.6	38.2
78	Asuum fasta	Transmembrane protein 66	32.9	8.8	23.5
79	ES Nematoden	vasopressin-activated calcium mobilizing putative receptor protein	94.4	8.7	22.3
149	Asuum fasta	227 kDa spindle- and centromere-associated protein, partial [Ascaris suum]	227.9	5.4	21.3
150	Asuum fasta	Golgi apparatus protein 1	139.2	6.0	23.2
284	Asuum fasta	Cytoskeleton-associated protein 5	165.2	7.8	15.8
343	Asuum fasta	Tropomodulin family protein	52.3	10.0	28.9
182	ES Nematoden	complex subunit FAM21A	92.2	4.9	21.5
183	Asuum fasta	Sulfhydryl oxidase 1	77.5	8.9	12.5
258	Asuum fasta	32 kDa beta-galactoside-binding lectin lec-3	38.5	8.7	44.6
99	ES Nematoden	peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A)	117.4	5.7	20.1
307	Asuum fasta	Cation Channel-forming Heat Shock Protein-70 (Hsp70)	71.5	6.1	26.5
212	Asuum fasta	Brix domain containing protein 1 homolog	32.5	10.7	44.8
94	Asuum fasta	Glucose-6-phosphate isomerase	64.1	6.8	35.1
95	Asuum fasta	Cbr-gpi-1 ; C.briggsae CBR-GPI-1 protein; K01810 glucose-6-phosphate isomerase	75.8	9.0	23.3
22	ES Nematoden	fructose-bisphosphate aldolase 1	43.4	9.1	40.5
23	Asuum fasta	Fructose-bisphosphate aldolase 1	40.4	8.6	52.0
21	Asuum fasta	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.1	7.0	33.5
131	Asuum fasta	Peroxiredoxin	21.5	7.8	36.9
132	Asuum fasta	thioredoxin peroxidase	21.6	6.2	36.9
319	Asuum fasta	Oxidoreductase yhdF	29.2	5.7	34.1
346	Asuum fasta	NADH dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur protein 7	23.3	10.4	21.4
71	ES Nematoden	glutamatdehydrogenase	56.8	7.8	46.9
72	Asuum fasta	Glutamat dehydrogenase 2	55.2	7.8	45.7
261	Asuum fasta	Glutamat dehydrogenase1	63.8	9.3	22.3
24	Asuum fasta	Uridine-cytidine kinase 2-B	28.6	6.5	20.4
25	Asuum fasta	uridine monophosphate kinase	31.9	8.0	18.3
44	Asuum fasta	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	20.2	9.8	40.0
52	Asuum fasta	protein sorting-associated protein 13b	230.9	5.7	15.7
97	Asuum fasta	DNA polymerase I	118.4	5.6	20.2
148	Asuum fasta	mushroom body defect	208.0	5.3	24.0
174	Asuum fasta	Multidrug resistance-associated protein 1 [Ascaris suum]	139.6	9.2	10.1
177	Asuum fasta	Past1; putative achaete scute target 1	72.5	9.5	17.0
178	Asuum fasta	EH domain-containing protein 4 [Ascaris suum]	72.6	9.4	15.9
259	Asuum fasta	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3 [Ascaris suum]	91.3	5.1	13.2
262	ES Nematoden	oligomeric Golgi complex subunit 3	83.9	5.6	14.4
305	Asuum fasta	DNA topoisomerase 2 [Ascaris suum]	172.2	9.0	16.7
43	ES Nematoden	CDK5RAP3-like protein	57.6	5.0	27.5
151	ES Nematoden	Toxic Hok/Gef Protein (Hok/Gef) Family Putative Cholesterol Transporter (Start1)	25.7	7.8	52.6
260	ES Nematoden	Incompletely characterized transport systems; Putative transport proteins; Urate Transporter (UAT) Family; GALECTIN-9 (36 KDA BETA-GALACTOSIDE BINDING LECTIN) (URATE TRANSPORTER/CHANNEL) (UAT) - Rattus norvegicus (Rat)	37.9	6.8	47.0
266	Asuum fasta	C-type lectin domain-containing protein 160 [Ascaris suum]	39.5	7.0	42.5
133	ES Nematoden	protein T05H10.3	8.8	10.2	79.5
141	Asuum fasta	Protein C17C3.11	18.4	9.9	40.4
204	Asuum fasta	Protein TAG-241, isoform b	183.7	6.3	16.4
205	ES Nematoden	RhoGAP domain containing protein	77.4	7.0	28.2
267	ES Nematoden	complex subunit 1 homolog	166.6	5.7	22.3
344	Asuum fasta	Mast C-terminus family protein	139.5	9.8	19.8
345	Asuum fasta	DeHydrogenases, Short chain family member (dhs-15)	29.3	5.7	42.8
51	ES Nematoden	protein	32.8	5.8	39.6
140	ES Nematoden	%193%76.6839378238342%1e-90	21.8	6.0	57.2
336	Asuum fasta	Unknown, partial [Ascaris suum]	19.1	10.7	36.9

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiaterkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der Promotion zur Seite gestanden haben. Ganz besonderer Dank gilt an:

Prof. Dr. Günter Lochnit, der mir ein spannendes Thema für meine Promotion aussuchte und mich exzellent jahrelang mit viel Geduld betreute. Ich danke für seine kompetenten Ratschläge, seine immerwährende Hilfsbereitschaft sowie seine Motivation bis hin zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Dr. Thomas Timm, der mir während der experimentellen Phase stets unermüdlich zur Seite stand und mich in Methodik und Technik der Laborarbeit einarbeitete. Ich danke für das angenehme Arbeitsklima, für die lustigen Momente zwischendurch sowie insbesondere für sein Wissen und seine Kompetenz.

Dr. Julia Grabitzki für die Hilfestellungen vor allem in der Anfangsphase meiner Doktorarbeit und motivierende Unterstützung.

Meiner Familie, die mich immer auf vielfältige Art und Weise unterstützte und motivierte. Ich danke für den Ansporn und dafür, dass sie fortwährend daran geglaubt haben, dass ich es schaffen kann.