

Proteomanalyse des Sekretoms von *Caenorhabditis elegans*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Foks, Patricia
geb. Schlehta
aus Lich

Gießen 2017

Aus dem Biochemischen Institut Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. Günter Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Tag der Disputation: 30.05.2018

Erklärung zur Dissertation

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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 Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	1
1.1.1 Morphologie, Entwicklung und Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	1
1.1.2 Der Modellorganismus <i>C. elegans</i>	5
1.2 Proteinanalytik.....	6
1.2.1 Die Geschichte der Proteinforschung.....	6
1.2.2 Proteomik.....	6
1.3 Die Entwicklung in der RNA-Forschung.....	8
1.4 Die RNA-Interferenz (RNAi).....	10
1.4.1 Die Entdeckung der RNAi.....	10
1.4.2 Die Funktionsweise der RNA-Interferenz.....	11
1.4.3 Der Mechanismus der RNA-Interferenz bei <i>C. elegans</i>	11
1.5 <i>RNA Interference Assay</i>	13
1.6 Phosphorylcholin als posttranslationale Modifikation von Proteinen.....	13
1.7 Sekretorische Proteine von Pathogenen.....	16
1.8 Problem- und Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Materialien.....	19
2.2 Chemikalien.....	19
2.3 Methoden.....	20
2.3.1 Kultivierung von <i>C.elegans</i> auf Agarplatten.....	20
2.3.1.1 Kultivierung mit <i>E.coli</i> als Nährboden.....	20
2.3.2 Aufreinigung der <i>C. elegans</i>	21
2.3.2.1 M9-Waschung von <i>C.elegans</i>	22
2.3.2.2 Gewinnung von exkretorisch-sekretorischen Proteinen.....	22
2.3.2.3 Flüssigkultur zur Gewinnung von ES-Material.....	22
2.4 RNA-Interferenz (RNAi).....	23
2.4.1 <i>C. elegans</i> RNAi-Fütterungs-Assay.....	23
2.5 Optimierung der Proteinaufreinigung aus den Überständen der <i>C. elegans</i> -... Flüssigkultur.....	23
2.5.1 Methoden der Hämin-Entfernung.....	23
2.5.2 Gewinnung von Eiern aus <i>C. elegans</i>	24

2.5.3 Synchronisierung der einzelnen Stadien von <i>C. elegans</i>	24
2.6 Proteinfällung.....	25
2.6.1 Acetonfällung.....	25
2.6.2 Chloroform/Methanol-Fällung.....	25
2.6.3 Entsalzung durch Gelfiltration.....	26
2.6.4 Probenvorbereitung.....	26
2.6.5 Proteinbestimmung.....	26
2.7 Proteinanalytik.....	28
2.7.1 Eindimensionale Gelelektrophorese.....	28
2.7.1.1 1D-SDS-Gelelektrophorese.....	28
2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	29
2.8.1 Isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension).....	30
2.8.2 Äquilibration.....	30
2.9 Proteinfärbungen.....	31
2.9.1 Proteinfärbung mit Massenspektrometrie (MS)- kompatibler.....	
Silberfärbung.....	31
2.9.2 Proteinfärbung mit Flamingo.....	32
2.9.3 Coomassiefärbung für den in-gel Verdau.....	33
2.9.4 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel.....	33
2.9.4.1 Manueller Verdau.....	33
2.9.4.2 Automatischer in-gel Verdau mittels Verdauroboter.....	34
2.10 Die Massenspektrometrie.....	36
2.10.1 Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisations	
Flugzeitmassenspektrometrie (MADLI-TOF-MS).....	36
2.11 Datenbanksuche.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Kultivierung und Aufreinigung der <i>C. elegans</i> Würmer sowie Gewinnung... der exkretorisch-sekretorischen (ES) Proteine	39
3.2 Optimierung der Methoden der Probengewinnung.....	40
3.3 Identifizierungen der ES-Proteine.....	42
3.4 RNAi-Experimente.....	56
3.5 Vergleich der Sekretome.....	76
4. Diskussion.....	85
4.1 Die Optimierung der Methoden zur Proteinaufreinigung von <i>C. elegans</i>	85

4.2 Proteinidentifikationen aus dem Sekretom von <i>C. elegans</i>	87
4.3 ES-Produkte und ihr Einfluss auf das Immunsystem.....	89
4.4 Vergleich des Sekretoms von <i>C. elegans</i> mit den Sekretomen anderer	
Nematoden.....	90
4.4.1 <i>Brugia malayi</i>	90
4.4.2 <i>Schistosoma japonicum</i>	95
4.4.3 <i>Ascaris suum</i>	98
4.5 Veränderungen des Sekretoms durch RNAi.....	100
5. Zusammenfassung.....	106
6. Summary.....	107
7. Literaturverzeichnis.....	108
8. Anhang	131
9. Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	133

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der beiden Geschlechter des
a, b Nematoden *C. elegans*. Zarkower, D. (2006): "Somatic sex
determination", *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research
Community. Unter:
http://wormbook.org/chapters/www_somatic-sex_determ/somaticsexdetfigl.jpg (20.11.2013) Seite 2
- Abb. 2: Lebenszyklus von *C. elegans*. Clark, D.P. und Pazdernik, N.J.
(2009): „Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und
Anwendungen“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg,
S.18. Seite 3
- Abb. 3: *C. elegans* Entwicklungsstadien. Wood, W.B. (1988): "The
Nematode *Caenorhabditis elegans*", Cold Spring Harbor
Laboratory Press, New York, S. 8. Seite 4
- Abb. 4: Schematische Übersicht über die Bereiche der Proteinbiochemie.
Jungblut, P.R. und Schlüter, H. (2008): „Proteinbiochemie-
Proteinanalytik-Proteomics“, *BioSpektrum* 14. Jahrgang 01.08.,
Wissenschaft Special: Proteinanalytik/-Aufreinigung, S. 37. Seite 7
- Abb. 5: Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus. Fuchs, F.,
Ingelfinger, D., Steinbrink, S. und Boutros, M. (2006):
„Funktionelle Genomik. Genomweite RNAi-screens“,
BioSpektrum 12. Jahrgang 06.06, Wissenschaft Special: RNA-
Technologien, S. 610. Seite 12
- Abb. 6: Strukturformel der 2,5-Dehydroxybenzoesäure. Eagleson, M.
(1994): "*Concise Encyclopedia Chemistry*", Walter de Gruyter,
S. 449. Seite 35

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 7: Schematische Darstellung der MALDI-TOF MS. Schiller, J. (2004): „MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Analytik von Lipiden, Proteinen und biologischen Kohlenhydraten“, Unter: http://www.uni-leipzig.de/~biophys/research/dossier/maldi/maldi_long.htm (24.03.2014) Seite 37
- Abb. 8: Arbeitsschritte von der Materialgewinnung bis zur Identifizierung der Proteine. Quelle: Eigene Darstellung Seite 38
- Abb. 9: Auftrennung von ES-Proteinen von Überständen aus der Flüssigkultur von *C. elegans*. A, B Seite 40
- Abb. 10: Auftrennung von *C. elegans* Proteinen aus aufgereinigten A, B ES- Proteinen derselben Proben durch zweidimensionale Gelelektrophorese. Seite 41
- Abb. 11: Auftrennung der Proteine aus den Überständen von den A, B, C L1- Larven von *C. elegans* durch eindimensionale Gelelektrophorese. Seite 43
- Abb. 12: (A) Funktionelle Klassifikation von sekretorischen Proteinen von *C. elegans* aus den unterschiedlichen RNAi *knock-down*-Versuchen. Seite 78
- Abb. 12: (B) Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine von *C. elegans* nach den RNAi *knock-down*-Versuchen der drei Proteine ASP-2, ASP-6 und GalNAcT. Seite 78
- Abb. 12: (C) Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine nach ASP-2 *knock-down* aus *C. elegans*. Seite 79
- Abb. 12: (D) Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine nach ASP-6 *knock-down* aus *C. elegans*. Seite 79
- Abb. 12: (E) Prozentuale Verteilung der Proteine nach GalNAcT *knock-down* aus *C. elegans*. Seite 80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Identifizierte ES-Proteine aus den Überständen der L1-Larven von <i>C. elegans</i> .	Anhang
Tabelle 2:	Identifizierte Strukturproteine von ES-Proteinen der L1-Larven von <i>C. elegans</i> .	Seite 45
Tabelle 3:	Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von <i>C. elegans</i> , die an der Signaltransduktion beteiligt sind.	Seite 48
Tabelle 4:	Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von <i>C. elegans</i> , die an der Entwicklung beteiligt sind.	Seite 50
Tabelle 5:	Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von <i>C. elegans</i> , die am Stoffwechsel beteiligt sind.	Seite 51
Tabelle 6:	Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von <i>C. elegans</i> , die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind.	Seite 53
Tabelle 7:	Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von <i>C. elegans</i> , die keiner Funktionsgruppe zugeordnet werden konnten.	Seite 55
Tabelle 8:	Identifizierte Proteine nach ASP-6 <i>knock-down</i> aus <i>C. elegans</i> .	Seite 57
Tabelle 9:	Identifizierte Proteine nach ASP-2 <i>knock-down</i> aus <i>C. elegans</i> .	Seite 59
Tabelle 10:	Identifizierte Proteine nach GalNAcT <i>knock-down</i> aus <i>C. elegans</i> .	Seite 63
Tabelle 11:	Identifizierte Proteine aus der RNAi-Kontrolle von <i>C. elegans</i> .	Seite 69
Tabelle 12:	Identifizierte Proteine nach GalNAcT, ASP-2 und ASP-6 <i>knock-down</i> und deren Auftreten in den verschiedenen Sekretomen aus <i>C. elegans</i> .	Seite 81

Abkürzungen

A	adult
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>A. lumbricoides</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
AMPS	Ammoniumpersulfat
APC	Antigen-präsentierende Zellen
<i>A. simplex</i>	<i>Ascaris simplex</i>
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
<i>A. viteae</i>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
ASP	Aspartylprotease
ATP	Adenosyltriphosphat
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
BES	<i>Brugia malayi</i> exkretorisch-sekretorisch
bp	Basenpaare
<i>C. briggsae</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBC	<i>Cap-binding-complex</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CPI	Cystein-Protease-Inhibitor
CRD	<i>Complementarity determining regions</i>
DHB	2,5-Dihydroxibenzoessäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i> oder <i>et alia</i>
etc	etecetera

Abkürzungen

ES	Exkretorisch-sekretorisch
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ETD	<i>Electron transfer dissociation</i>
FABP	<i>Fatty acid-binding protein</i>
g	Gramm
GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	Acetamino-2-deoxy-D-Glukose, (N- Acetylglucosamin)
ggf	gegebenenfalls
GH	Glykosylhydrolase
Glc	Glukose
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HCCA	α -Cyano-4-hydroxizimtsäure
<i>H. contortus</i>	<i>Haemophilus contortus</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierter PH-Gradient
IT	Ion-Trap
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAP	Leucin-Aminopeptidase
LB	lysogeny broth
μ	Mikro
mA	Milliampere
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometer
MDPA	Methylendiphosphonsäure

Abkürzungen

MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MS	Massenspektrometer
ncRNA	<i>non-coding</i> RNA
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
p.a.	pro analysi
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PC	Phosphorylcholin
ppm	parts per million
priRNA	<i>primary</i> RNA
PTGS	<i>Posttranscriptional gene silencing</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat/Polyacryamid Gelelektrophorese
SEA	<i>schistosome soluble egg antigen</i>
shRNA	<i>small hairpin</i> Ribonukleinsäure
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. mekongi</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>
snRNP	<i>small nuclear Ribonucleoprotein Particle</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
TBPA	Thyroxin bindendes Präalbumin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenamin

Abkürzungen

TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	Tumor-Growth-Factor- β
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLP	Transthyretin-ähnliche Proteinfamilie
TPI	Triosephosphat-Isomerase
TTR	Transthyretin
tRNA	Transfer-RNA
u.a.	unter anderem
V	Volt
Vol.	Volumen
<i>V. portae</i>	<i>Venae portae</i>
W	Watt
<i>W. bancrofti</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>
z.B.	zum Beispiel
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

1 Einleitung

1.1 *Caenorhabditis elegans*

1.1.1 Morphologie, Entwicklung und Lebenszyklus von *C. elegans*

C. elegans ist ein Fadenwurm und Vertreter der Rhabditiden. Er ist ein Konsekutivzwitter, dies bedeutet, dass er sich durch Selbstbefruchtung fortpflanzen kann. Als Hermaphrodit werden zunächst Spermien, danach Oozyten gebildet. Es existieren auch Männchen – diese machen jedoch nur 0,3% der *C. elegans*-Population aus (Altun und Hall 2009).

Als frei lebender Nematode lebt er im Erdboden der meisten gemäßigten Klimazonen und ernährt sich von Mikroorganismen. Die einzigen Anforderungen für Wachstum und Reproduktion beschränken sich auf eine feuchte Umgebung, eine gemäßigte Temperatur, Sauerstoff und Bakterien als Nahrungsgrundlage. Hinsichtlich dessen gilt *C. elegans* als leicht im Labor zu handhaben (Hope 1999; Riddle 1997).

Der fadenförmige bis zylindrische Wurm wird von einer transparenten Kutikula umgeben, welche sich in die einzelnen Schichten Hypodermis, Basalzone, mediale Zone und kortikale Zone aufteilen lässt. Die kortikale und basale Zone, welche hauptsächlich kollagenöse Bestandteile aufweisen, sind durch Verstrebungen der medialen Zone unterbrochen. Die basale Zone ist durch amorphe und zwei fibrilläre Schichten gekennzeichnet, welche sich spiralig um den Wurm winden. Bezüglich ihrer Bestandteile, lässt sich die kortikale Schicht in eine äußere und eine innere Schicht aufteilen, wobei die innere Schicht hauptsächlich aus Kollagen, die äußere vor allem aber aus Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten besteht. Der Darm besteht aus drei Abschnitten, dem ektodermalen Vorder- und Enddarm, die von einer Kutikula ausgekleidet sind und dem dazwischenliegenden wenig differenziertem endodermalen Mitteldarm. Die Atmung erfolgt über die Haut (Altun und Hall 2009).

Das Nervensystem besteht aus mehreren Ganglien und Nervenfasern, welche zirkulär um den Pharynx angeordnet sind, sowie einem ventralen Markstrang. Sensillen, die Sinnesorgane der Nematoden, dienen als Mechano- bzw. Chemorezeptoren (Altun und

Hall 2009; Riddle 1997). Adulte Würmer erlangen im Durchschnitt eine Länge von zwei Millimetern, die Eier sind durchschnittlich 50 μm (siehe Abb.1).

Die Hermaphroditen haben eine auf 959 begrenzte Zellzahl, von denen 302 Nervenzellen sind. In den Uterus münden zwei Gonadenarme, wobei jeder 150 Spermien bildet, folglich können bis zu 300 Nachkommen produziert werden. Strukturell ist der adulte Wurm ein Weibchen mit gespeichertem Sperma, das im L4- Stadium produziert wird (Corsi *et al.* 2015).

Der Entwicklungszyklus von *C. elegans* beträgt drei Tage, die Lebensspanne 14 Tage. Die Eier von *C. elegans* können in flüssigem Stickstoff ungefähr 25 Jahre aufbewahrt werden, ohne dass daraus ein Verlust ihrer Lebensfähigkeit resultiert (Altun und Hall 2009; Riddle 1997).

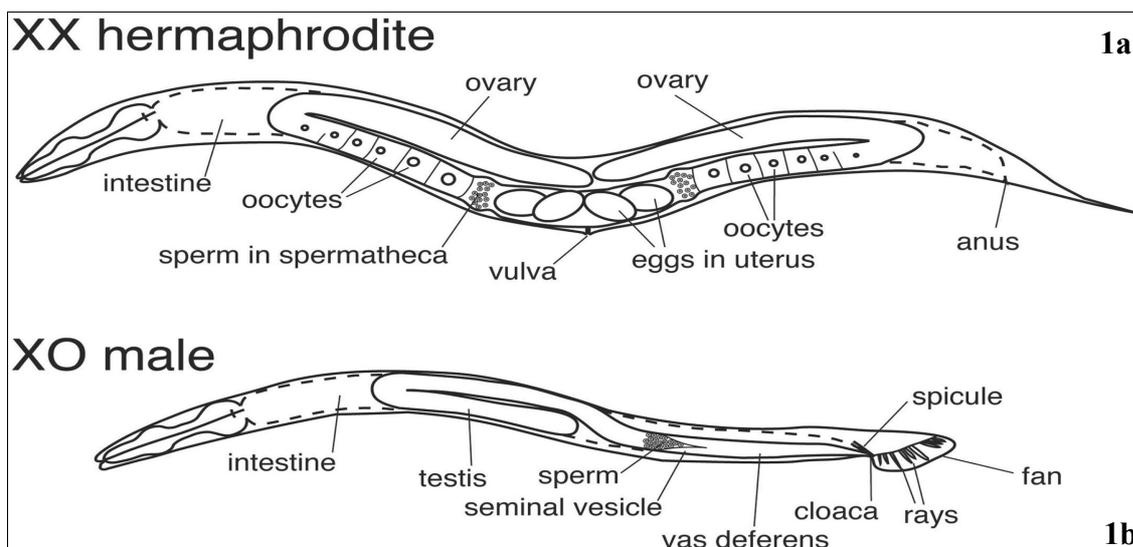


Abb. 1: Schematische Darstellung der beiden Geschlechter des Nematoden *C. elegans*. In Abbildung 1a ist ein Hermaphrodit dargestellt: Die Gonaden bestehen hier aus zwei identischen Anteilen. Hier erfolgt zuerst die Spermatogenese und im Anschluss darauf die Oogenese. Die Befruchtung der Oozyten erfolgt während der Wanderung zum Uterus. Die Abbildung 1b veranschaulicht die männliche Nematodenform von *C. elegans*. Diese hat lediglich eine Gonade und produziert ausschließlich Spermien. In beiden Geschlechtern befinden sich die proliferativen (oder Stamm-) Zellen am distalen Ende der Gonaden. Sobald die Zellen proximal zum Uterus wandern, treten sie in die Prophase der Meiose ein und beginnen somit ihre Differenzierung (Quelle: Zarkower 2006).

Einleitung

Der Entwicklungszyklus von *C. elegans* lässt sich in vier Larvenstadien (L1, L2, L3 und L4) unterteilen (siehe Abb. 2 und 3), wobei die jeweiligen Häutungen als Unterteilungskriterium dienen. Der Embryo verbleibt bis zum Ende der Gastrulation im Uterus und wird anschließend auf das Habitat abgelegt, wo er dann nach 14 Stunden schlüpft (L1) und sich zum ersten Mal nach 25 Stunden häutet (L2). Das Larvenstadium L3 wird nach 32 Stunden erreicht, das der L4-Larve nach 40 Stunden. Der adulte, geschlechtsreife Hermaphrodit erreicht sein Endstadium nach 50 Stunden (Altun und Hall 2009).

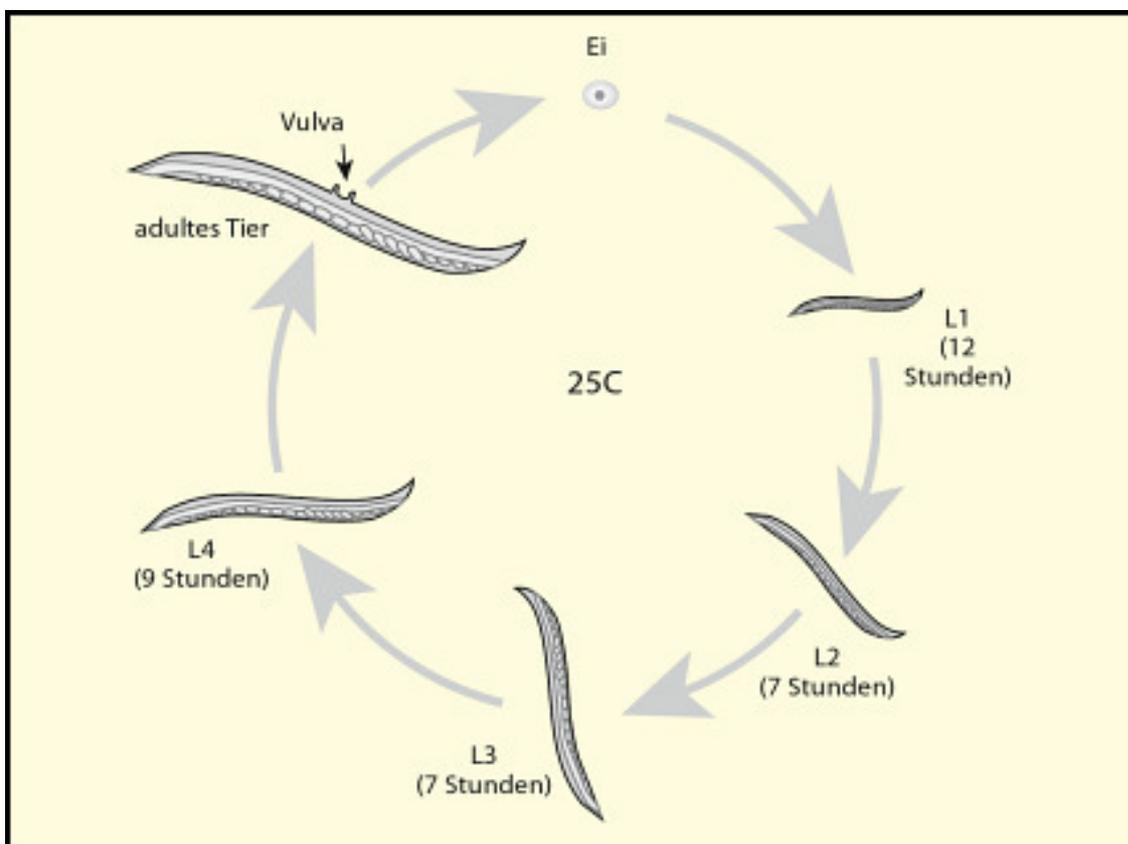


Abb. 2: Lebenszyklus von *C. elegans*. Nach Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium entwickelt sich bereits 12 Stunden später die L1 Larve (L1). Über drei weitere Stadien hin (L2-L4) entsteht schließlich ein adultes Tier, welches reproduktionsfähig ist (Quelle: Clark und Pazdernik 2009).

Bei ungünstigen Umweltbedingungen und Nahrungsmangel ist *C. elegans* in der Lage, vorausgesetzt, er hat das L2-Stadium erreicht, als sogenannte Dauerlarve bis zu drei Monate zu überleben; diese ist durch eine Stagnation der Entwicklung und Änderung

Einleitung

des Stoffwechsels gekennzeichnet. So kann die Lebensdauer bis auf das Zehnfache erweitert werden. Sind die Bedingungen wieder günstig, kann der Nematode das Dauerlarvenstadium beenden und den normalen Entwicklungszyklus fortsetzen. Ist das Stadium des adulten *C. elegans*-Hermaphroditen erreicht, kann die Produktion von Embryonen durch Selbstbefruchtung beginnen. Im L1-Stadium entwickelt sich durch Teilungsvorgänge des Primordiums der Geschlechtsapparat, wohingegen die Spermatogenese erst im L4-Stadium beginnt. Die Nachkommenschaft eines Hermaphroditen richtet sich nach der Anzahl der vorhandenen Spermien im Gonadengang. Erfolgt die Befruchtung eines Hermaphroditen durch einen männlichen *C. elegans*, kann die Nachkommenschaft bis auf das dreifache gesteigert werden (Altun und Hall 2009; Riddle 1997).

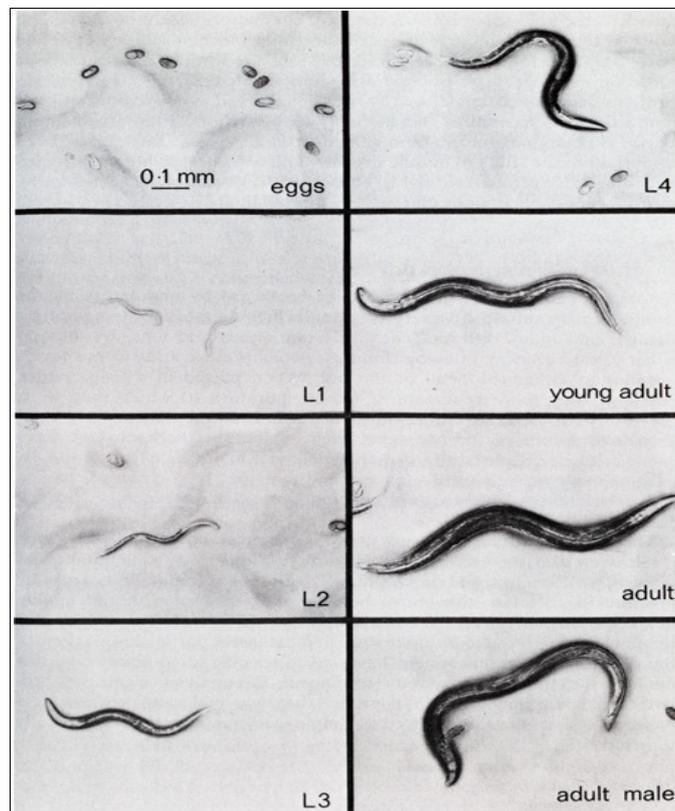


Abb. 3: *C. elegans* Entwicklungsstadien. Es sind die aus mikroskopischer Sicht betrachteten Entwicklungsstadien vom Eistadium bis zur adulten Form dargestellt (von links oben beginnend).

Eggs = Eistadium, L1= Larvenstadium 1, L2 = Larvenstadium 2, L3 = Larvenstadium 3, L4 = Larvenstadium 4, *young adult* = früh erwachsener Fadenwurm, *adult* = erwachsener Fadenwurm, *adult male* = erwachsener Fadenwurm männlichen Geschlechts (Quelle: Wood 1988).

1.1.2 Der Modellorganismus *C. elegans*

Der Fadenwurm *C. elegans* wurde von einer Vielzahl von Wissenschaftlern für die Forschungen zur Untersuchung von genetischen Regulationen verwendet. Ein Forscher trug wesentlich dazu bei: Sydney Brenner, ein britischer Biologe, der *C. elegans* 1965 als Modellorganismus etablierte, indem er dessen Organentwicklung und die Entwicklung des Nervensystems in Zusammenhang mit programmiertem Zelltod untersuchte (Brenner 1976; Riddle 1997). Sydney Brenner, Howard R. Horvitz und John E. Sulston erhielten gemeinsam für ihre Entdeckungen betreffend der genetischen Regulierung der Organentwicklung und des programmierten Zellsterbens den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Schüler 2016).

In den folgenden Jahren wurde *C. elegans* immer öfter für wissenschaftliche Forschungen genutzt. Doch warum wurde gerade dieser Nematode für Untersuchungszwecke verwendet?

Durch den schnellen Lebenszyklus, der geringen Größe – ein adulter Wurm misst bis zu 1,5 mm – und vor allem durch die einfache Handhabung bezüglich der Aufzucht und Kultivierung, weist *C. elegans* einen Modellcharakter auf (Müller und Hassel 2012). Für Analysen und Untersuchungen von genetischer Regulation war der Nematode somit sehr geeignet. Im Jahr 1998 wurde die Genomsequenz von *C. elegans* fertiggestellt und in die Genom-Sequenz-Datenbanken aufgenommen. Dies war ein bedeutender Schritt, da sich die hier gewonnen Erkenntnisse der Zell- und Entwicklungsbiologie auch auf biologische Prozesse anderer Organismen übertragen ließen. Vorangetrieben wurde die Untersuchung von *C. elegans* durch J.N. Thomson, der nach der Untersuchung des Pharynx von *C. elegans* vor allem die Entwicklung des Nervensystems studierte (White *et al.* 1986). Dies war möglich, weil der Organismus elektronenmikroskopisch äußerst günstig zu untersuchen ist, ein weiterer Aspekt, warum sich der Fadenwurm als Modellorganismus etablierte (Riddle 1997).

1.2 Proteinanalytik

1.2.1 Die Geschichte der Proteinforschung

Die Herausforderung, die Gesamtheit der Gene und deren Funktion in ihrer Bandbreite kennen und verstehen zu können, hält schon lange Einzug in die Wissenschaft.

Die Proteinanalytik hat ihren Ursprung in den frühen 1950er Jahren. Die Identifikation der Aminosäuresequenz des Hormons Insulin durch F. Sanger, die er in den Jahren 1945-1950 erforschte, wurde begleitet von einer Methode, die sich später als die effektivere herausstellen sollte: Der Proteinsequenzierungsmethode, die durch P. Edman entwickelt wurde. Diese Methode ist heute bekannt als Edman-Abbau, bei der die Reihenfolge der Aminosäuresequenz bestimmt wird. Auch heute wird sie noch in Form des Gasphasen-Sequenzers angewendet (Edman 1949). 1962 wurde durch R.B. Merrifield die Festphasensynthese entwickelt (Merrifield 1963).

Die erste Proteinauftrennung mittels einer zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgte aus Extrakten von *E. coli* durch O'Farrell und unabhängig davon durch J. Klose im Jahr 1975. Die Methode ist sehr sensitiv und auch zur Analyse von Modifikationen oder Veränderungen durch Mutationen geeignet. Daher wurde schon damals im Sinne der „Proteomics“ die Identifikation von nahezu der Gesamtheit aller Proteine eines biologischen Organismus angestrebt (O'Farrell 1975).

1.2.2 Proteomik

Der Begriff Proteom taucht erstmals in Analogie zur Genomik im Jahr 1995 auf (Wasinger *et al.* 1995). Das Proteom beschreibt die „Gesamtheit der Proteine einer Zelle“ (Knippers 2012:346). Im Gegensatz zum statischen Genom beschreibt das Proteom auch immer Proteine, die individuellen zeitlichen und biologischen Einflussfaktoren unterlegen sind. Es ist als die Proteinzusammensetzung eines Organismus oder eines Teils davon in einer definierten biologischen Situation (Jungblut *et al.* 2008) definiert. Dabei ist die biologische Situation durch die Zeit sowie die chemische und physikalische Umgebung definiert (Jungblut und Schlüter 2008). Die Interaktionen und Wechselwirkungen zwischen den Proteinen konnten erstmals durch

das *Two-hybrid*-System von S. Fields und O. Song aufgezeigt werden (Fields und Song 1989). Ein wichtiger Fortschritt in der Proteomik war die Entdeckung des GFP, des *green fluorescent proteins*, 1961 von O. Shimomura in der Leuchtqualle *Aequorea victoria*, welches seither als Biolumineszenzmarker für die unterschiedlichsten Bereiche der Proteinbiochemie verwendet wird (Shimomura *et al.* 1962; Shimomura 2005).

Vier Wissenschaftler, die weit über 20 Jahre wichtige Beiträge zur Proteinanalytik geleistet haben, waren Keith I. Williams, Dennis F. Hochstrasser, Ron D. Appel und Marc R. Wilkins. Sie entwickelten Techniken für die Analyse von Proteinen und deren Expression sowie technische Hilfsmittel und Softwareprogramme. Der Begriff Proteom wird jedoch hauptsächlich mit Mark R. Wilkins in Verbindung gebracht, der auf dem Kongress „2D electrophoresis: from protein maps to genomes“ in Siena 1994 erstmals die Definition eines Proteoms vortrug (Wilkins *et al.* 2007).

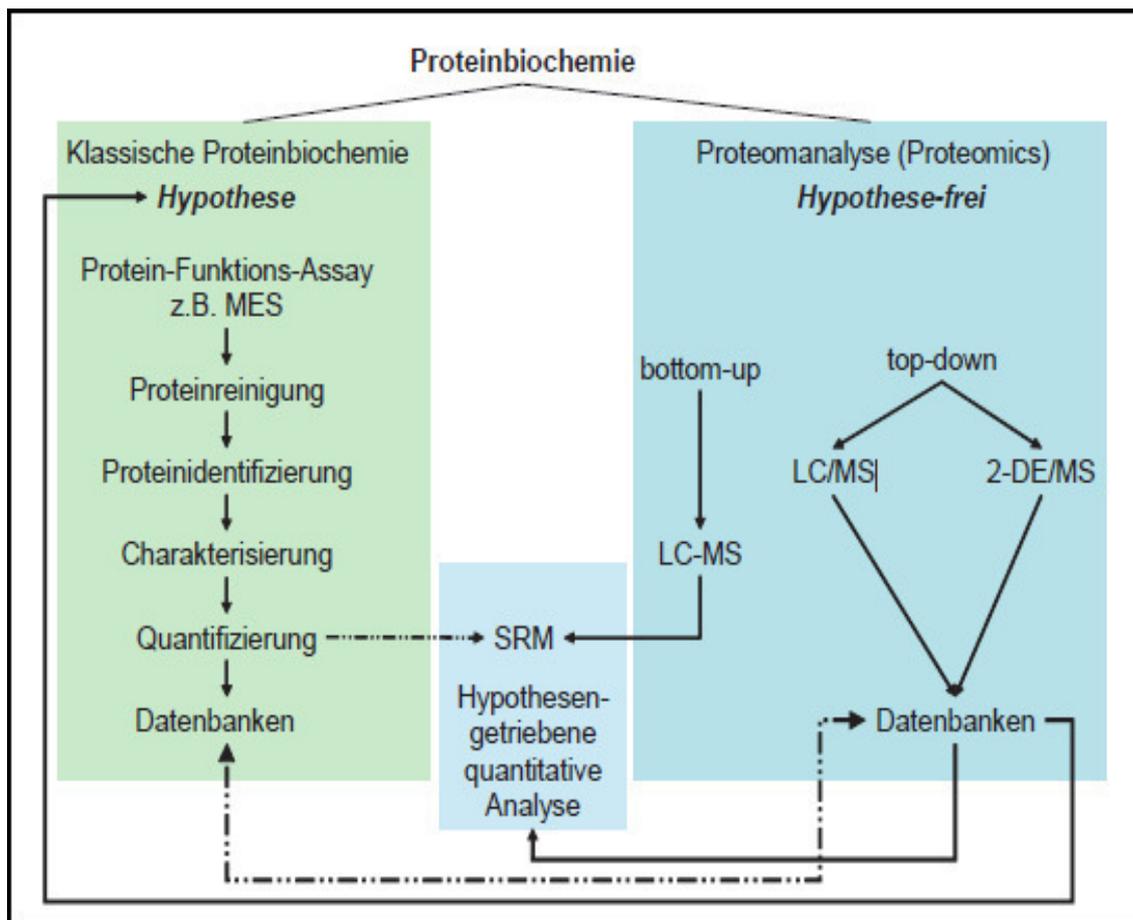


Abb. 4: Schematische Übersicht über die Bereiche der Proteinbiochemie. Dargestellt ist die klassische Proteinbiochemie mit ihren einzelnen Arbeitsbereichen sowie die quantitative Proteomanalyse (Proteomics) (Quelle: Jungblut und Schlüter 2008).

Die oben aufgeführte Abbildung stellt die Bereiche der Proteinbiochemie dar. Als deren Teilbereich umfasst die Proteomanalyse (Proteomis) viele Methoden, darunter die Massenspektrometrie, die zur Analyse einzelner Proteine oder aber auch kompletter Proteome dient. Die Massenspektrometrie lässt sich in vielen Bereichen einsetzen, zum Beispiel in der Proteinidentifizierung, der Proteincharakterisierung sowie der Analyse posttranslatinaler Modifikationen (Rehm 2006).

Über die zweidimensionale Gelelektrophorese können komplexe Proteingemische aufgetrennt werden: Zum einen über den isoelektrischen Punkt und zum anderen über das Molekulargewicht. Durch Färbemethoden (u.a. mit fluoreszierenden Farbstoffen) können auch geringe Proteinmengen auf den Gelen sichtbar gemacht werden und stehen somit den möglichen Identifikationsmethoden zur Verfügung (Rehm 2006).

Es gibt stets neue Entwicklungen, um Proteine und Peptide besser zu analysieren und deren Modifikationen zu lokalisieren. So konnten sich die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) und die *Matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) in der Proteinanalytik durchsetzen (Rabilloud 2000). Als spezielle massenspektrometrische Geräte, die vor allem für die Detektion posttranslatinaler Modifikationen entwickelt wurden, sind die Orbitrap und die *electron-transfer-dissociation* (ETD)-MS zu nennen. Die Orbitrap ist ein neuer Massenanalysator, bei dem das Signal nicht durch einen Magneten, sondern durch oszillierende Ionen um die Elektrode entsteht (Hübschmann 2009). Die ETD-MS ist ein neues Verfahren zur verbesserten Identifikation und Lokalisation posttranslatinaler Modifikationen (Tang *et al.* 2006).

1.3 Die Entwicklung in der RNA-Forschung

Die Natur des genetischen Materials wurde erstmals 1944 durch die Entdeckung der DNA (Avery *et al.* 1944) und deren Doppelstrang-Charakters 1953 enthüllt (Crick *et al.* 1961).

Das mangelnde Wissen über den genauen Ablauf der Proteinsynthese, insbesondere über die regulatorischen Funktionen über den Zellkern hinaus, kristallisierte sich als Hauptproblematik in der RNA-Forschung heraus. Es entstand langsam die Idee, dass

durch die RNA als Mediator und interagierende Nukleinsäure die genetische Information durch Transkription und Translation zum Protein führte. Dieses zentrale Dogma in der Biologie bestand sehr lange (Knippers 2012).

Bis in die 1980er Jahre waren zunächst nur drei Klassen der RNA erforscht, die mRNA, die tRNA und die rRNA. Mit Entdeckung der ncRNA, welche nicht-kodierende Eigenschaften besitzt, wurde durch Thomas Cech der Mechanismus des *Splicing* beschrieben (Kruger *et al.* 1982). Für die Entdeckung, dass RNA auch als Enzym (Ribozym) fungieren kann, erhielten Cech und Altman im Jahr 1989 den Nobelpreis für Chemie (Cech 2000).

Durch viele Studien konnte 1961 von Francois Jacob und Jaques Monod gezeigt werden, wie die Regulation von Genen funktioniert. Ein Modell aus mehreren Komponenten – darunter Repressoren, Operatoren, RNA-Polymerasen und Promotoren – wurde zu einem „Meilenstein in der Geschichte der Biologie“ (Knippers 2012:120), für welches sie zusammen mit André Lwoff den Nobel Preis in Physiologie oder Medizin 1965 erhielten (Knippers 2012).

Die Entdeckung des ersten Codons des genetischen Codes durch Marshall Nirenberg und J. Heinrich Matthaei sowie andere Entdeckungen, waren ein weiterer Fortschritt für das Verständnis der Proteinbiosynthese. Im Jahr 1964 wurde die Transfer-RNA (tRNA) als vermutliches Bindeglied zwischen RNA und Protein identifiziert (Holley *et al.* 1965).

Chemische und enzymatische Charakterisierungen, die Entdeckung des alternativen Spleißens (*splicing*) durch Richard Roberts, die Entdeckung unterschiedlicher mRNA's durch Phillip Sharp 1977 (Berget *et al.* 2000), die erste Polymerase-Kettenreaktion als Grundlage für die Entstehung gezielt veränderter Proteine durch Kary B. Mullis 1984 (Mullis *et al.* 1994) und die Durchführung der ersten Röntgen-Strukturanalysen kristallisierter Ribosomen in den Jahren 1999 und 2000 zur Aufklärung der molekularen Architektur waren weitere Meilensteine in der RNA-Forschung (Knippers 2006).

1.4 Die RNA-Interferenz (RNAi)

1.4.1 Die Entdeckung der RNAi

Mittels des Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) ist eine Beeinflussung der Genexpression – posttranskriptionell als auch translational – von eukaryontischen Zellen auf natürliche Weise möglich (Siomi und Siomi 2009).

Die Genexpression ist von großer Bedeutung für alle lebenden Organismen. Die meisten Gene der Chromosomen sind im Zellkern lokalisiert und werden durch Proteinsynthese in das Zytoplasma exprimiert.

In den frühen 1980er Jahren konnte gezeigt werden, dass kleine RNA-Moleküle in *E. coli* an komplementäre mRNA-Sequenzen binden und die Translation und somit Genexpression inhibieren können (Mizuno *et al.* 1984; Nordström und Wagner 1994; Gottesman 2004).

Die Entdeckung der RNA-Interferenz etablierte sich basierend auf Forschungen und Publikationen, die sich vor allem mit der Gen-Inhibierung (*gene silencing*) zunächst im Rahmen der genetischen Forschung von Pflanzen befassten (Al-Kaff *et al.* 1998; Park *et al.* 1996). Es wurde eine Vielzahl an sich gleichenden Phänomenen in Pflanzen, Pilzen und Tieren entdeckt, die das Konzept der posttranskriptionalen Gen-Stillegung (PTGS, *posttranscriptional gene silencing*) oder auch *RNA-silencing* thematisierten (Anandalakshmi *et al.* 1998; Baulcombe 2000; Matzke *et al.* 2001). Eine weitere bahnbrechende wissenschaftliche Errungenschaft war die Gen-Inhibierung in humanen Zellen durch Thomas Tuschl im Jahr 2001 durch siRNA. Der Vorgang der RNAi konnte schon 1993 während der Entwicklungsforschung und Untersuchung posttranskriptioneller Regulationen von *C. elegans* demonstriert werden (Ruvkun 2001). So konnte sich die schon 1993 beschriebene microRNAi letztlich 2001 als fester Terminus etablieren (Lee *et al.* 1993, 2004; Lee und Ambros 2001).

Andrew Fire und Craig Mello gelang letztlich der Erfolg mit einer Studie, in der sie die Auswirkungen auf den Phänotyp von *C. elegans* nach Injektion von RNA testeten. Sie konnten feststellen, dass nur die Injektion von doppelsträngiger dsRNA zu einem inhibierendem Effekt führte. Zudem waren nur wenige dsRNA Moleküle einer Zelle für

den Effekt ausreichend. Auch die Weitergabe der Interferenz zwischen den Zellen wurde beobachtet (Fire *et al.* 1998). Fire und Mello äußerten, dass RNAi eine Erklärung für das *posttranscriptional gene silencing* (PTGS) darstellen könnte (Fire *et al.* 1991). Für die Entdeckung der RNA-Interferenz erhielten Sie 2006 den Nobelpreis (Zamore 2006).

1.4.2 Die Funktionsweise der RNA-Interferenz

Die RNAi basiert auf mehreren intrazellulären Schritten und lässt sich in zwei Phasen einteilen. Die Interferenz mittels doppelsträngiger RNA führt zur Unterdrückung der Biosynthese des Proteins, welches durch die entsprechende komplementäre mRNA codiert wird. In der Zelle erfolgt dann ein spezifischer Abbau der komplementären mRNA und somit eine Unterdrückung der Produktion des entsprechenden Proteins. Die RNAi ist damit sequenzspezifisch und stellt eine Methode zur posttranskriptionellen Genunterdrückung dar. Die Verwendung doppelsträngiger RNA erhöht die Effektivität dabei um ein Vielfaches (Fuchs *et al.* 2006).

Zwei Beispiele der Antisense-RNA (aRNA) in *C. elegans* sind die Proteine LIN-4 und LET-7, die über eine zeitliche Regulation verfügen und den Ablauf verschiedener Entwicklungsschritte in *C. elegans* steuern (Lau *et al.* 2001; Lee und Ambros 2001; Reinhart *et al.* 2000; Wightman *et al.* 1993).

1.4.3 Der Mechanismus der RNA-Interferenz bei *C. elegans*

Es gibt verschiedene Arten von interferierender RNA, teils werden sogar ähnliche Mechanismen genutzt, hinsichtlich ihrer Funktion können sie dennoch erhebliche Unterschiede aufweisen.

Der Mechanismus der RNA-Interferenz läuft molekulargenetisch in mehreren Schritten ab. Zunächst wird die doppelsträngige RNA (dsRNA) durch die Zelle aufgenommen und danach von Dicer, einem Enzymkomplex, gespalten. Die dsRNA weist meist eine Länge von 20-30 Basenpaaren (bp) auf und kann in die siRNA und die miRNA unterschieden werden. Die siRNA weist meist eine geringere Anzahl an Basenpaaren auf. Sie spielt vor allem bei viralen Abwehrmechanismen eine bedeutende Rolle. Die miRNA ist eine micro-RNA, die durch eine RNA-Polymerase II nach Transkription aus

einer *primary* RNA (priRNA) entsteht. Die daraus entstehenden siRNA-Fragmente sind 22 bp groß. Durch ihre Größe können sie sich in dem Nematoden ausbreiten. Sie werden anschließend intrazellulär entwunden und in den *RNA-induced silencing complex* (RISC-Komplex) integriert. Dadurch entsteht eine Aktivierung des Enzymkomplexes. Der RISC-Komplex vermag es, mRNA in Abhängigkeit von der Sequenz zu binden (siehe Abb. 5). Dies führt zu einer Zerstörung des mRNA-Stranges. Durch eine spezifische Polymerase, die RNA-Polymerase, kann es aber auch zu einer Vervielfältigung der siRNA kommen (Hannon 2003).

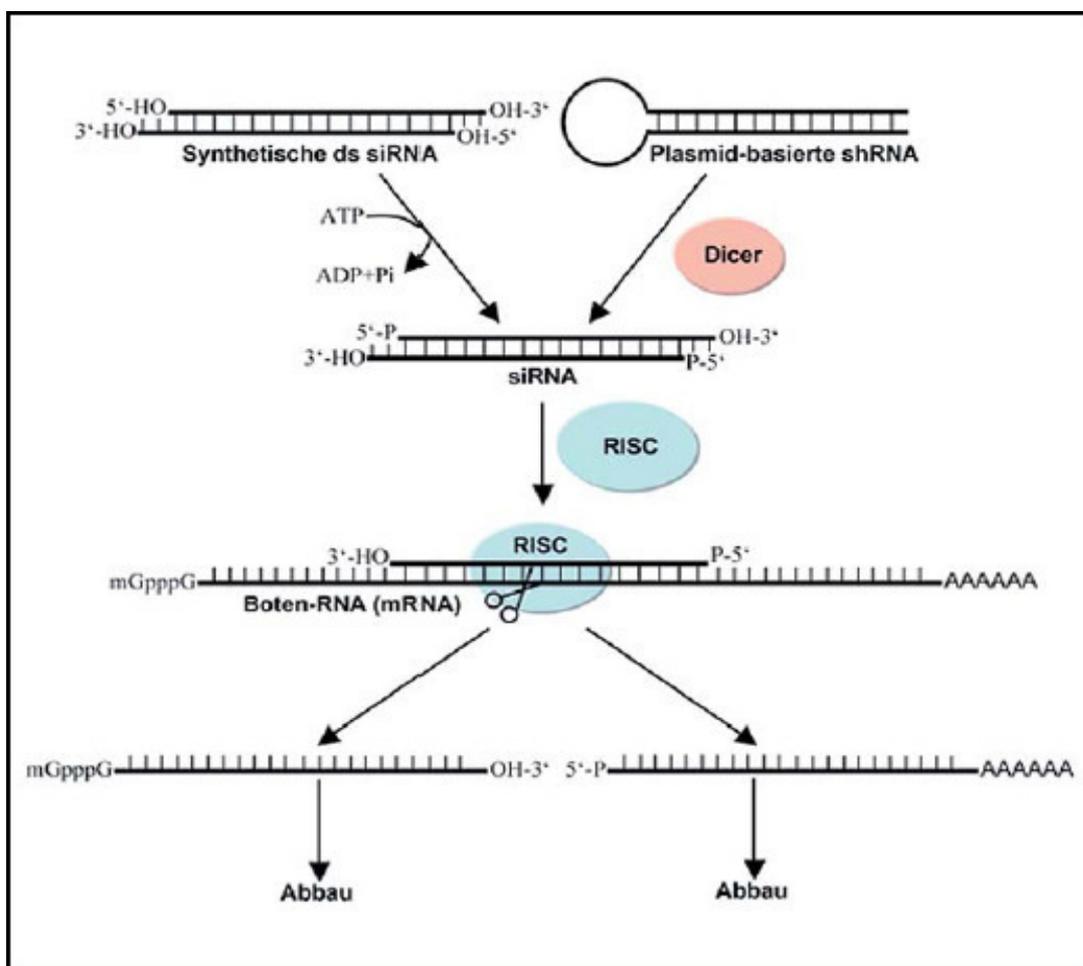


Abb. 5: Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus. Doppelsträngige RNA in Form von *small hairpin RNAs* (shRNA) oder synthetischen dsRNA wird über Dicer in *small interfering RNAs* (siRNAs) gespalten. Die Fragmente bestehen aus bis zu 21 Nukleotiden. Dies führt zu einer systemischen Interferenz. Die Fragmente bilden gemeinsam mit Enzymen den *RNA-induced silencing complex* (RISC), der zu einer Spaltung in siRNA komplementäre mRNA führt. Die mRNA kann dann durch Nukleasen weiter abgebaut werden (Quelle: Fuchs *et al.* 2006).

Im Laufe der Zeit etablierten sich ganze Datenbanken und RNAi-Bibliotheken, in denen neu entdeckte, korrigierte und/oder überarbeitete Gensequenzen und Informationen zum Proteom von *C. elegans* hinterlegt sind. Durch den Einsatz des Hochdurchsatz-Screenings mittels RNAi kann gewährleistet werden, dass mithilfe jeder Analyse ein weiterer Fortschritt in Bezug auf die Komplettierung des menschlichen Genoms geschaffen wird. Durch die Komplexität ist es erforderlich die Analysen weiterzuführen, um bessere Vergleiche zwischen den einzelnen Datensätzen ermitteln zu können (Fuchs *et al.* 2006).

1.5 *RNA Interference Assay*

Die RNA-Interferenztechnik ist entwickelt worden, um den *knock-out* der RNAi Zielsequenzen effizient und einfach aufzuzeigen. Es wird dazu genutzt, um zelluläre Prozesse zu untersuchen und gezielt Gene zu inaktivieren.

Die bedeutendsten Merkmale sind die doppelsträngige RNA (dsRNA), welche eine Geninhibierung induziert, indem sie die komplementäre mRNA für die Herabregulierung ansteuert. Somit können gezielt einzelne Gene in ihrer Expression gehemmt werden. Durch Expression von doppelsträngiger RNA (dsRNA) wird der RNAi-Signalweg induziert. Der zytoplasmatische Dicer spaltet zunächst die lange dsRNA in 21-23 bp große *small interfering RNAs* (siRNAs) (Appasani 2005).

Über den RNAi Mechanismus kann sowohl die posttranskriptionelle als auch die transkriptionelle Genstilllegung induziert werden. In *C. elegans* sind verschiedene Signalwege vorhanden, bei denen diese RNAi-Mechanismen beteiligt sind.

1.6 **Phosphorylcholin als posttranslationale Modifikation von Proteinen**

Die posttranslationale Modifikation Phosphorylcholin (PC) ist ein kleines Hapten, das bei Bakterien ubiquitär (z.B. in der Zellmembran) aber auch bei parasitären Nematoden sowie bei Säugern in Form von Phosphatidylcholin und dem Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) vorkommt (Snodgrass *et al.* 2015).

PC-modifizierte Proteine von Pathogenen werden in Zusammenhang mit Wirt-Pathogen-Interaktion gebracht. Parasitäre Nematoden synthetisieren PC-modifizierte

Biomoleküle, die die Antikörper- und Zytokinproduktion zu Gunsten des Überlebens der Nematoden modifizieren können. Erst zwei Proteine wurden als PC-modifizierte Proteine (PC-Proteine) eindeutig identifiziert: Die Aspartylprotease 6 (ASP-6) aus *C. elegans* und ES-62 aus *A. viteae*. Dennoch werden die Zielproteine der PC-Modifikation vorrangig untersucht, um die Bedeutung der Epitope im Zusammenhang mit der Biologie der Nematoden zu erforschen. Der nicht-parasitäre Nematode *C. elegans* exprimiert PC-modifizierte N-Glykane und stellt somit einen biologisch attraktiven Modellorganismus zur Erforschung der Biologie der PC-Modifikationen dar (Snodgrass *et al.* 2015).

C. elegans als nicht-parasitäre Nematode ist ein Modellsystem mit großer biologischer Bedeutung auch im Bereich der Immunmodulation (Snodgrass *et al.* 2015). Es exprimiert Glykosphingolipide und Glykoproteine, die teilweise Phosphorylcholin-substituiert sind. Diese PC-Substitution hat für *C. elegans* eine wichtige Bedeutung bei der Entwicklung und Fertilität (Lochnit *et al.* 2005).

C. elegans hat viele PC-modifizierte Proteine, die während der Entwicklung produziert werden (Grabitzki *et al.* 2008; Grabitzki 2009), allerdings nur ein PC-modifiziertes Protein, das sekretiert wird: Die Aspartylprotease 6 (ASP-6) war im Modellorganismus *C. elegans* das erste Protein, bei dem der Nachweis einer Modifikation mit PC erbracht werden konnte (Grabitzki *et al.* 2006).

Die Detektion erfolgte über Western-Blot mittels des monoklonalen Antikörpers TEPC- 15, der speziell nur PC erkennt. Nach Behandlung adulter Würmer mit einer Natriumhypochlorit-Lösung wurden Eier gewonnen. Gemessen von diesem Zeitpunkt war das 40 kDa schwere Protein ab 24 Stunden im Kulturmedium von *C. elegans* nachweisbar und seine Menge stieg im weiteren Zeitverlauf an. Beobachtungen zeigten, dass das Protein ASP-6 hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird, während Muskel- und Epithelzellen dieses in einem geringeren Maße produzierten.

Sämtliche bisher erforschten PC-Modifikationen sind an Glykanstrukturen gebunden, jedoch gibt es Hinweise, dass PC auch anders an Proteine gebunden sein kann (Lochnit *et al.* 1998; Friedl *et al.* 2003). In multizellulären Parasiten konnte festgestellt werden, dass Proteine und Glykolipide mit PC bestückt sind (Timm *et al.* 2015). PC kann verschiedene Effekte an Immunzellen provozieren, die zu einer Immunmodulation in dem Immunsystem des Wirts führt. Diese Immunmodulation beeinflusst auch die Dauer

der parasitären Besiedelung, u.a. durch Regulierung der zellulären Immunantwort. PC- haltige Antigene werden als beeinflussender Faktor bei der Signalwegübermittlung in B- und T-Zellen, bei der Entwicklung dendritischer Zellen und Makrophagen sowie im Prozess der Mastzelldegranulation beobachtet. Diese Effekte wirken auf Zytokinebene. Ebenso wird wohl die Lymphozytenproliferation beeinträchtigt (Timm *et al.* 2015). Auf anderer Ebene vermutet man, dass Monozyten als angeborene Effektorzellen und als entscheidende Akteure in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen das primäre Ziel von Helminthen und deren immunmodulatorischen Effekten sind. Jedoch gibt es noch wenige Kenntnisse über PC-Epitope eines Proteins, ebenso ist erst eine geringe Anzahl dieser identifiziert worden (Kooij *et al.* 2015).

So wie auf der einen Seite in vielen Parasiten PC an Glykanstrukturen und Glykosphingolipiden nachzuweisen war, wurde in Bakterien wie z.B. *Haemophilus influenzae* PC auch an Lipopolysacchariden gefunden (Baumeister *et al.* 1994; Wuhrer *et al.* 2000).

Exkretorisch-sekretorische (ES-) Proteine sind Schlüsselmediatoren von Wirts-Parasiten-Interaktionen. Das Protein ES-62, ein exkretorisch-sekretorisches Produkt von *Acanthocheilonema viteae* (*A. viteae*), ist das am intensivsten erforschte PC tragende Protein. Es wird von den Zellen entlang des Ösophagus von *A. viteae* sekretiert (Harnett *et al.* 2003). Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass auch bei dem Protein ES- 62 PC an N-Glykane gebunden ist (Harnett *et al.* 1994; Griffiths *et al.* 2005).

Bezüglich *C. elegans* konnten bislang zwei – sich in ihrer Struktur unterscheidende – Typen von N-gebundenen PC-Epitopen voneinander differenziert werden (Haslam *et al.* 2002). Es wurde ebenso über Kombinationen von strukturellen Motiven der beiden Formen berichtet (Cipollo *et al.* 2005).

Antigene mit PC-Eigenschaften wurden als Struktureinheit in prokaryontischen und eukaryontischen Pathogenen erkannt, welche in der Lage sind, durch Immunmodulation in der Wirtszelle persistierende Infektionen herbeizuführen, die über Jahre lang bestehen bleiben (Harnett und Harnett 2001). In Wirtsorganismen konnte gezeigt werden, dass PC- haltige Moleküle die Signalwege in B- und T-Zellen beeinflussen können. Des Weiteren konnten niedrigere Antikörper- und Zytokinkonzentrationen sowie eine verminderte Lymphozytenproliferation beobachtet werden. Dies könnte einen

Ansatzpunkt in der Erforschung von PC-Antigenen in der Behandlung von Allergien und Autoimmunerkrankungen darstellen (Goodridge *et al.* 2001; Harnett und Harnett 2001).

1.7 Sekretorische Proteine von Pathogenen

Parasitäre Nematoden exkretieren oder sekretieren eine Reihe an Molekülen, Enzymen und metabolischen Produkten in die Umgebung des Wirtssystems, die – zusammen mit kutikularem Material – unter dem Begriff der exkretorisch-sekretorischen (ES)-Antigene zusammengefasst werden. Teils werden die ES-Produkte durch spezielle exkretorische oder sekretorische Organe der Nematoden in die Umgebung der Wirtszelle freigesetzt oder sie stammen von der Körperoberfläche der Nematoden (Harnett 2014). Hier spielt die Verteilung spezifischer Oberflächenantigene und -liganden eine bedeutende Rolle (Lightowers und Rickard 1988). Über die Jahrzehnte wurden zahlreiche Studien an unterschiedlichen parasitären Erregern zur weiteren Erforschung der exkretorisch-sekretorischen Proteine und deren Wirkungsweise durchgeführt. Vor allem ihre selektiven Effekte auf die Zellen des Immunsystems als auch ihre Rezeptoreigenschaften wurden untersucht (Favoretto *et al.* 2013; Ibrahim *et al.* 2009).

Parasitäre Helminthen überleben oft Jahrzehnte lang im Wirtsorganismus. Die Vermutung, dass die Verweildauer mit der Interaktion der Helminthen mit den Zellen des Immunsystems zusammenhängt, wurde unter anderem an *Brugia malayi* oder *Schistosoma japonicum* untersucht (Hewitson *et al.* 2009). In zahlreichen Untersuchungen an Nematoden, Trematoden und anderen Spezies wurden die Effekte der ES-Produkte auf das Immunsystem des Wirts beschrieben und festgestellt, dass diese vor allem zu einer Modulation der Immunantwort im Wirt führen (Hewitson *et al.* 2008; Jenkins *et al.* 2005; Lightowers und Rickard 1988). Die ES-Produkte haben teilweise verschiedene Enzymaktivitäten wie z.B. Protease-, Acetylcholinesterase-, Trypsin- oder Chymotrypsin-Aktivität (Wang *et al.* 2013) sowie immunmodulatorische Aktivitäten wie die Chemotaxis oder Immunantwort durch Lymphozyten (Harnett *et al.* 1995). Diesen Enzymen werden wiederum zahlreiche Funktionen zugeschrieben. Beispiele sind die Antikoagulation, das Durchdringen von Barrieremembranen der

Wirtszelle, die proteolytische Spaltung von Immunglobulinen oder auch die Inaktivierung von Komplementfaktoren und zytotoxischen Mediatoren, die von der Wirtszelle exprimiert werden (Knox und Kennedy 1988; Knox und Jones 1990; Becker *et al.* 1995; Brown *et al.* 1999; Tort *et al.* 1999; Geldhof *et al.* 2000). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Proteasen die Th2-Immunantwort beeinflussen können (Urban *et al.* 1992; Toscano *et al.* 2007; Kato *et al.* 2007).

C. elegans-Extrakte weisen starke proteolytische Aktivität im sauren pH-Bereich auf, die fast vollständig durch Pepstatin inhibiert werden kann (Sarkis *et al.* 1988). Unter Ausnutzung der Affinität zu Pepstatin konnten fünf Aspartylproteasen (ASP) isoliert werden (Geier *et al.* 1999), wohingegen auf Ebene der cDNA mehr als zwölf hypothetische Aspartylproteasen identifiziert werden konnten, die eine große Ähnlichkeit zu einer Anzahl verschiedener Enzyme anderer Parasiten aufzeigen (Tcherepanova *et al.* 2000).

Von diesen Aspartylproteasen weisen lediglich die Aspartylproteasen ASP-1, ASP-2, ASP-5 und ASP-6 Glykosylierungsstellen auf. ASP-3 und ASP-6 sind an der neuronalen Degeneration in *C. elegans* beteiligt (Syntichaki *et al.* 2002). ASP-2 und ASP-5 sind homolog zu einem Enzym SjASP von *Schistosoma japonicum* (Becker *et al.* 1995), ASP-3 und ASP-6 sind mit einer Aspartylprotease von *Aedes aegypti* verwandt, ASP-4 gleicht einem Enzym von *Ancylostoma caninum* (Harrop *et al.* 1996).

1.8 Problem- und Fragestellung

Viele parasitäre Erkrankungen sind hinsichtlich ihrer Therapieoptionen eingeschränkt. Daher ist die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien dringend notwendig. Infektionen mit Nematoden zeichnen sich durch eine lang anhaltende Persistenz aus, welche durch eine Immunmodulation des Wirtssystems vor allem durch PC-modifizierte sekretorische Antigene ermöglicht wird. Da der freilebende Nematode *C. elegans* ebenfalls über diese Epitope verfügt, eignet er sich als Modellsystem für parasitäre Nematodeninfektionen.

In dieser Arbeit sollte daher zunächst im Rahmen einer Proteomanalyse das Sekretom von *C. elegans* – also die Gesamtheit aller freigesetzten Proteine – analysiert werden.

Einleitung

Im Weiteren sollte dann durch RNAi *knock-downs* die Expression der Genprodukte ASP-6, ASP-2 und GalNAcT in *C. elegans* herunterreguliert und die Auswirkungen dieser *knock-downs* auf das Sekretom untersucht werden.

ASP-6 wurde ausgewählt, da es das einzige und erste ES-Produkt von *C. elegans* ist, welches als PC-modifiziert beschrieben wurde (Grabitzki *et al.* 2008). Vergleichend dazu wurde ASP-2 ausgewählt, da es als ES-Produkt identifiziert wurde und da homologe Proteine bei *Brugia malayi* (Moreno und Geary 2008; Hewitson *et al.* 2008; O'Regan *et al.* 2014) und *Schistosoma japonicum* (Liu *et al.* 2009; Cao *et al.* 2016) beschrieben wurden. Schließlich wurde die GalNAcT GLY-10 ausgewählt, da dieses Protein häufig bei Sekretomanalysen identifiziert wurde und an der O-Glykosylierung sekretorischer Proteine beteiligt ist (Layden *et al.* 2001).

Durch die zweidimensionale Gelelektrophorese sollten dann die Veränderungen in den Proteomen untersucht werden.

Die Sekretomanalyse soll die Grundlage für das funktionelle Verständnis der sekretierten Proteine erweitern und eine Basis für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien der Nematoden-Infektionen bilden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Modulares System-Stereomikroskop Leica MS 5, Leica, Wetzlar

Universalzentrifuge 32 R-Zentrifuge, Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen

Ultraschallbad Badelin Sonorex TK 52, Roth, Karlsruhe

Digitale Waage Mettler AJ150, Mettler PB3000, Mettler-Toledo, GmbH, Gießen

Speed Vac, RC 10.22. Jouan, Thermo, Fernwald

Spektrometer DU 540, Beckmann, Krefeld

Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz

Für die eindimensionale Gelelektrophorese:

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, GE Healthcare, Freiburg

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese:

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, GE Healthcare, Freiburg

Elektrophoresekammer: Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg

Elektrophoresekammer Multiphor II Hoefer 600, GE Healthcare, Freiburg

Spotcutter ExQuest, Bio Rad, München

Pipettenroboter MicroStarlet Hamilton, Martinsried

Ultraflex I TOF/TOF Massenspektrometer mit Lifteinheit, Bruker Daltonik, Bremen

Edelstahl-Target, Bruker Daltonik, Bremen

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg). Wasser wurde mit dem „Milli-Q Ultra-pure water system“ (Millipore, Eschborn) deionisiert und gereinigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung von *C. elegans* auf Agarplatten

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden Petrischalen von 145 mm Durchmesser verwendet, in die eine Agarlösung gegossen wurde.

Die Agarlösung setzt sich zusammen aus:

- 5 g Caseinhydrolysat (Pepton 140) (Merck)
- 5 g Hefeextrakt (Life Technologie, Eggstein)
- 3 g NaCl
- 20 g Agar, high gel-strenght (Serva)
- auf 1 l mit H₂O auffüllen

Anschließend wurde die Agarlösung autoklaviert (20 Minuten, 120°C) und es wurden folgende sterile Lösungen dazugegeben:

- 1,0 ml Cholesterinlösung (5,0 g Cholesterin/1 l Ethanol)
- 0,5 ml CaCl₂-Lösung (110,8 g CaCl₂/1 l H₂O)
- 1,0 ml MgSO₄-Lösung (246,5 g MgSO₄/1 l H₂O)
- 25 ml Kaliumphosphat-Lösung (108,3 g KH₂PO₄ und 36 g K₂HPO₄/1 l H₂O)
- 2,0 ml Thiabendazol (10mg/ml Thiabendazol in Dimethylsulfoxid)
- 2,0 ml 0,1%ig Methyleneblau in H₂O

Nach guter Durchmischung wurde der Agar in einer 0,5 cm dicken Schicht in die Petrischale gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

2.3.1.1 Kultivierung mit *E. coli* als Nährboden

Für den Bakterienrasen auf den Agarplatten wurden *E. coli*-Bakterien (OP 50) verwendet.

Bakterienmedium:

- 0,5 g Caseinhydrolysat
- 0,5 g Hefeextrakt
- 0,3 g NaCl
- auf 100 ml H₂O auffüllen

Das Bakterienmedium wurde verrührt und bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Nach dem Autoklavieren kühlte die Lösung ab und wurde mit 50 µl *E. coli*-Bakterien versetzt. Die Suspension wuchs über Nacht bei 37°C. Der abgekühlte Agar wurde schließlich mit 800 µl der Bakteriensuspension angeimpft. Der Bakterienrasen wuchs anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Auf die bewachsenen Agarplatten wurden 500 µl *C. elegans*-Suspension (ca. 2000 Würmer) aufgegeben. Die Agarplatten wurden bei 18°C inkubiert.

2.3.2 Aufreinigung der *C. elegans*

Die Agarplatten werden mit 15 ml M9 Puffer abgespült und die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen (Vol.= 50 ml) überführt.

Zusammensetzung des M9-Puffers:

- 250 ml Phosphatpuffer (60 KH₂PO₄, 120 g Na₂HPO₄), pH= 6,0
- 25 g NaCl
- 5 ml 1 mol/l MgSO₄
- auf 5 l mit H₂O auffüllen

Die *C. elegans* wurden im M9-Puffer auf Eis gestellt, dadurch setzten sich die Würmer als Sediment ab. Der Überstand wurde abgezogen. Da das Sediment noch Kontaminationen aus Zelltrümmern, Bakterienresten und Häutungsaggregaten enthielt, wurden die Nematoden durch eine Dichtezentrifugation (Gbewonyo *et al.* 1994) gereinigt.

Zur Reinigung der Würmer wurden diese mit M9-Puffer auf 15 ml aufgefüllt und mit 10 ml Saccharoselösung (30%ig) überschichtet. Anschließend wurden sie bei 1500 xg

sieben Minuten zentrifugiert. Die Saccharoseschicht mit den *C. elegans* wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen (Vol.= 50 ml) überführt und die Würmer dreimal mit M9-Puffer gewaschen.

2.3.2.1 M9-Waschung von *C. elegans*

Die Würmer wurden nach oben genannter Vorschrift geerntet, der Überstand abgenommen sowie das Falcon-Röhrchen auf 15 ml mit M9-Puffer aufgefüllt.

Anschließend wurde mit 10 ml Saccharoselösung (30%ig) unterschichtet und bei 1500 xg für sieben Minuten zentrifugiert. Die sich in der Mitte absetzende Saccharoseschicht, welche die *C. elegans* beinhaltet, wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal mit je 50 ml M9-Puffer bei 900 xg gewaschen.

2.3.2.2 Gewinnung von exkretorisch-sekretorischen Proteinen

Nach der Waschung wurden die Würmer auf eine leere Agarplatte gegeben und mit einer gerade abdeckenden Schicht von M9-Puffer überzogen. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden wurde der Überstand abgenommen, filtriert und die Proteine mit Aceton gefällt. Nach erfolgter Proteinbestimmung wurde eine 2D- Gelelektrophorese gestartet.

2.3.2.3 Flüssigkultur zur Gewinnung von ES-Material

10 ml Medium wurden mit 100 µl Penicillin/Streptomycin (PAA, Cölbe) (100x), 100 µl Amphotericin B (Sigma) (0,5 mg/ml in 1 M KH₂PO₄, pH 7,4), 50 µl Trobramycin (cell-Pharm, Hannover) (10 mg/ml) und 250 µl Ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen) (2,5 mg Ciprofloxacinacetat/ml) versetzt.

Die Lösung wurde sterilfiltriert. Anschließend wurden 250 µl Hämin (Sigma) (10 mg/ml 0,1 N KOH) hinzugegeben. Das fertige Kulturmedium wurde mit einer definierten Zahl an gereinigten *C. elegans*-Eiern angeimpft und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 7 bis 14 Tagen bei 18°C wurden die Kulturen dann zehn Minuten bei

1500 xg abzentrifugiert und der Kulturüberstand weiter untersucht. Die sedimentierten Würmer wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.4 RNA-Interferenz (RNAi)

2.4.1 *C. elegans* RNAi-Fütterungs-Assay

Zur Durchführung der RNAi-Versuche mussten zunächst die RNAi *E.coli*-Stämme, welche in einem LB-Medium kultiviert wurden, auf den Agarplatten aufgetragen und über Nacht kultiviert werden. Die von *C. elegans* gewonnen Eier wurden anschließend im M9-Puffer synchronisiert. Die synchronisierten L1-Larven wurden auf Agarplatten gegeben, die jeweils 25 µg/ml Carbencillin sowie 1 mM IPTG (dioxanfrei, Roth) enthielten. Die Agarplatten beinhalteten entsprechende RNAi-*E. coli*-Stämme (kultiviert in LB-Medium), die über Nacht hochgewachsen sind. Die Würmer wurden für drei bis vier Tage bei 17°C kultiviert und anschließend geerntet.

Für die RNAi-Experimente wurden transformierte *E. coli* aus der *RNA feeding library* verwendet, die bereits erfolgreich für genomweite *RNAi-Screens* verwendet wurden (Bargmann 2001; Boutros und Ahringer 2008). Es wurde ein leerer RNAi-Vektor als Kontrolle verwendet.

2.5 Optimierung der Proteinaufreinigung aus den Überständen der *C. elegans*-Flüssigkultur

2.5.1 Methoden der Hämin-Entfernung

Das nicht-kovalent gebundene Hämin wurde durch Zusatz von 90 µg nativem ES-Protein mit Quecksilber (II) Chlorid in 6M Harnstoff mit 0,1 M HCl (nach Ambler und Wynn 1973 beschrieben) entfernt.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde das Reaktionsgemisch mittels eines Centricon-3-Protein-Konzentrators mit 100 mM Ammoniumbicarbonat (pH = 8,0) durch Zentrifugation entsalzt.

2.5.2 Gewinnung von Eiern aus *C. elegans*

Zur Gewinnung der Eier wurden die Würmer mit 15 ml M9-Puffer und 15 ml Natriumhypochlorit (12% Chlor, Roth) Lösung versetzt, fünf Minuten kräftig geschüttelt und bei 900 xg 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 15 ml abgesaugt. Anschließend wurden erneut 15 ml Natriumhypochlorit-Lösung zugegeben, zwei Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis im Mikroskop keine Würmer, sondern nur noch die Eier sichtbar waren, welche im Anschluss drei- bis vier Mal mit je 50 ml M9-Puffer gewaschen wurden.

2.5.3 Synchronisierung der einzelnen Stadien von *C. elegans*

Zur Gewinnung definierter Larvenstadien musste die Wurmpopulation zunächst synchronisiert werden. Das Prinzip beruht auf der Eliminierung aller lebenden Larvenstadien und adulten Tiere durch eine stark alkalische Hypochloritlösung, wobei nur die Embryonen, geschützt durch eine Vitellinschicht ihrer Eihülle, diese Prozedur überlebten.

Die gewaschenen Eier von *C. elegans* blieben bei Nahrungsmangel im M9-Puffer bei 18°C über Nacht. Nach dem Schlüpfen stagnierten die Larven so in ihrer Entwicklung am Ende der L1-Phase und begannen ihr weiteres Wachstum (über das L2-Stadium) erst nach Umsetzung auf *E. coli*-Platten. Nach der Fütterung wurde der Entwicklungsgrad der Würmer regelmäßig mikroskopisch überprüft. Wenn das gewünschte Larvenstadium erreicht war, wurden die Würmer geerntet und gereinigt. Die aufgereinigten Larvenstadien wurden sofort lyophilisiert.

2.6. Proteinfällung

2.6.1 Acetonfällung

Um Ionen oder Agenzien, die die Proteinbestimmung oder Gelelektrophorese stören könnten, zu beseitigen und um Proteine zu konzentrieren, wurden die Proteinproben mit der vierfachen Menge Aceton versetzt und über Nacht bei -20°C stehen gelassen. Danach wurden die ausgefällten Proteine der Proben 20 Minuten bei 16.000 xg und 4°C abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.6.2 Chloroform/Methanol-Fällung

Um störende Agenzien oder Ionen zu entfernen, welche die Gelelektrophorese stören können sowie um die *C. elegans*-Proteine aufzukonzentrieren, wurde eine Chloroform/Methanol-Fällung durchgeführt (Wessel und Flügge 1984).

15 mg lyophilisiertes Material aus synchronisierten *C. elegans* wurde in 500 µl des unten angegebenen Puffers gelöst und für eine Stunde bei 20000 xg zentrifugiert. Anschließend wurden 90 µl des Überstandes in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µl H₂O hinzugefügt und erneut gemischt. Nach weiteren fünf Minuten Inkubation wurde die Probe für fünf Minuten bei 13000 xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet für fünf Minuten in ein 40°C warmes Wasserbad gestellt, um das restliche Methanol abdampfen zu lassen. Zur Lösung der Probe wurde diese mit 50 µl Lysispuffer versetzt und dem Ultraschallbad ausgesetzt. Im Anschluss wurden diese Proben auf 3 x 5 mm große Probenplättchen pipettiert. Diese standen nun für die isoelektrische Fokussierung zur Verfügung (siehe 2.8.1).

Lysispuffer:

- 8 mol/l Harnstoff
- 2 mol/l Thioharnstoff
- 4% CHAPS
- 30 mM DTT
- 2% IPG-Puffer, pH 3-10, GE Healthcare

2.6.3 Entsalzung durch Gelfiltration

Es wurden 100 µl der jeweiligen Probe in 500 µl H₂O aufgenommen und für fünf Minuten gevortext. Anschließend wurde die Probe auf die Nap-5-Säule aufgetragen. Nach dem Durchlauf der Probe wurde zur Elution 1 ml H₂O hinzugegeben. Das Eluat wurde über Nacht bei -20°C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Daraufhin konnte die entsalzte Probe weiterverarbeitet werden.

2.6.4 Probenvorbereitung

Die in IEF-Puffer aufgenommenen Proben wurden bei Raumtemperatur zweimal fünf Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend im Thermomixer für 20 Minuten geschüttelt. Bei 10°C und 16.000 xg erfolgte eine Zentrifugation. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen.

2.6.5 Proteinbestimmung

Mithilfe des 2-D Quant Kits (GE Healthcare) wurde an dem im Lysispuffer gelösten Material (siehe 2.6.2) die Proteinbestimmung durchgeführt. Durch frühere Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Lysispuffer die Proteinbestimmung im 2D-Quant Kit nicht beeinträchtigt. Es wurde zunächst das *Working Color reagent* durch die Mischung von 100 Teilen des *Color reagent A* mit 1 Teil des *Color reagent B* hergestellt. Es wurde die Eichreihe mithilfe des 2 mg/ml *BSA Standard Solution* nach folgendem Schema hergestellt:

Volumen von 2 mg/ml	0 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl	25 µl
<i>BSA Standard Solution</i>						
Proteinmenge	0 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50 µg

Von der zu bestimmenden Probe wurde ebenfalls 2x 15 µl in je ein Eppendorfgefäß gegeben und im Folgenden genauso behandelt wie die Eichreihe. In jedes Eppendorfgefäß wurde 500 µl *Precipitant* gegeben, ausreichend gevortext und

anschließend bei Raumtemperatur für zwei bis drei Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl *Co-Precipitant* in jedes Eppendorfgefäß gegeben und ebenfalls ausgiebig gevortext. Die Eppendorfgefäße wurden bei mindestens 10000 xg für fünf Minuten zentrifugiert, so dass das Protein sedimentierte. Die Flüssigkeit über dem Pellet wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abdekantiert. Es wurden 100 µl *Copper-Solution* und 400 µl destilliertes Wasser in jedes Eppendorfgefäß gegeben und gevortext, um das Protein wieder in Lösung zu bringen. Im nächsten Schritt erfolgten die schnelle Zugabe von 1 ml *Working-color reagent* und eine kurze Durchmischung jedes Eppendorfgefäßes. Danach erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15-20 Minuten. Im Folgenden konnte die Absorption jeder Probe und des Standards bei 480 nm mit Wasser als Referenz im Spektrophotometer (Beckmann DU 640) ermittelt werden.

Es wurde mithilfe der gemessenen Werte eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probe bestimmt wurde. Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben erneut lyophilisiert, um dadurch eine höhere Konzentration an Proteinen und zugleich eine geringere Menge an störenden Agenzien zu erreichen. Anschließend wurden die Proben im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Probenvorbereitung wurden die Proben aus dem Gefrierschrank genommen, in Küvetten mit 200 µl deionisiertem Wasser gegeben und letztlich das *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio Rad) zu vier Teilen mit H₂O verdünnt.

Daraufhin wurden 800 µl des Reagenzes in die Küvette pipettiert und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 1000 µl H₂O galt es, die Absorption der Lösung bei 578 nm zu messen.

Als Kalibrierungsgrade diente eine Verdünnungsreihe mit einem Albumin-Standard (Pierce, Bonn, D) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg/µl, um eine höhere Sensitivität zu erreichen.

2.7 Proteinanalytik

2.7.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

2.7.1.1 1D-SDS-Gelelektrophorese

Acrylamidstammlösung:	100 ml Acrylamidstammlösung (Roth)
Trenngelpuffer:	36,3 g Tris/HCl (Merck), pH=8,8 100 ml H ₂ O hinzugeben
Sammelgelpuffer:	6,0 g Tris/HCl, pH=6,8 in H ₂ O 100 ml H ₂ O hinzugeben
SDS-Lösung:	10 g SDS 100 ml H ₂ O hinzugeben
Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung:	0,1 g Ammoniumperoxidsulfat /ml H ₂ O
Elektrodenstammpuffer, zehnfach:	15 g Tris-HCl, 72 g Glycin 500 ml H ₂ O hinzugeben
Elektrodenlaufpuffer:	100 ml Elektrodenstammpuffer, zehnfach 10 ml SDS-Lösung auf 1 l mit H ₂ O auffüllen

Die Acrylamidkonzentrationen betragen 12% im Trenngel und 4% im Sammelgel.

Für zwei Gele mit 0,75 mm Dicke wurden 3,35 ml H₂O, 4,0 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Trenngelpuffer gemischt, fünf Minuten im Ultraschallbad entgast und fünf Minuten auf 50°C erhitzt. Unter gründlichem Mischen wurden 100 µl SDS-Lösung, 50 µl AMPS (Serva) und 5 µl TEMED (Merck) hinzugefügt. 3,4 ml der Lösung wurde zwischen zwei auf dem Gelplatten-Halter eingespannte Glasplatten gegeben. Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit Amylalkohol überschichtet und eine Stunde ruhen gelassen. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit Wasser gespült.

Für das Sammelgel wurden 6,1 ml H₂O, 1,3 ml Acrylamidstammlösung und 2,5 ml Sammelgelpuffer gemischt und fünf Minuten im Ultraschallbad entgast. Anschließend

wurden 100 µl SDS-Lösung, 5 µl AMPS und 10 µl TEMED hinzugegeben. Die Sammelgelmischung wurde auf das Trenngel pipettiert und der Kamm für die Probenaschen aufgesetzt. Der verwendete Kamm formte zehn Auftragesaschen für ein Probenvolumen von je maximal 40 µl. Nach einer Polymerisationszeit von 45 Minuten wurden die Kämmen entfernt, die Taschen mit H₂O gespült und die Elektrophoresekammer zusammengesetzt. In die innere Kammer wurden 125 ml und in die äußere Kammer 200 ml Elektrodenlaufpuffer eingefüllt. Vor dem Auftrag auf das Sammelgel wurden die Proteinproben zehn Minuten bei 100°C in 20 µl Probenpuffer gekocht.

SDS-Probenpuffer:

- 62,5 µl 1 M Tris/HCl, pH=6,8
- 10 µl 100 mM Na₂EDTA (Roth)
- 100 µl Glycerin (87%)
- 200 µl SDS (10%)
- 25 µl Bromphenolblau (0,25%)
- 552,5 µl H₂O
- 50 µl 2-Mercaptoethanol (Merck)

Mit einer Hamilton-Spritze wurden Aliquots der Proben (20 µl) und des Standards (5 µl) auf das Gel aufgetragen. Als Standard für das SDS-Gel wurde *BenchMark™ Protein Ladder* (Invitrogen, Karlsruhe) genommen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 100 V und anschließend für 65 Minuten bei 150 V. Danach wurden die Gele entnommen, mit Coomassie (siehe 2.9.3) oder Silber gefärbt (siehe 2.9.1).

2.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese trennt Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht auf.

2.8.1 Isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension)

Je 300 µl der Lösung des Probenpuffers wurden in insgesamt zwölf Spuren des *Reswelling Trays* (GE Healthcare) mit einer Pipette perlenförmig eingefüllt, so dass möglichst keine Luftblasen entstanden. Auf dieses Lösungsbett wurde jeweils ein Gelstrip von 13 cm Länge mit der Acrylamidseite nach unten gelegt. Damit der Harnstoff nicht aus der Lösung auskristallisiert, wurde jede Spur mit 1,5 ml *DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare) bedeckt. Die Strips wurden über Nacht bei Raumtemperatur rehydratisiert.

Jeder gequollene Gelstreifen wurde aus dem *Reswelling Tray* herausgenommen, auf einem fusselreien Papier getrocknet und mittig mit der Gelseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt.

Die Elektrodenklammern wurden aufgesteckt, so dass der Elektrodendraht auf der Gelschicht der Strips auflag. Die Gelstreifen wurden mit ~80 ml Cover Fluid überdeckt. Der Deckel des Multiphor-Gerätes wurde aufgesetzt und die Kabel wurden mit dem Spannungsgerät verbunden.

Das Spannungsgerät wurde wie folgt programmiert:

0-100 V	1 mA	5 W	250 Vh
100-3500 V	1 mA	5 W	10.8 Vh
3500 V	1 mA	5 W	25.0 Vh

Anschließend wurden die Strips entweder bei -80°C eingefroren oder direkt für die zweite Dimension weiterverwendet .

2.8.2 Äquilibrierung

6,7 ml Trenngel-Puffer
6 M Harnstoff
69 ml Glycerol
4,0 g SDS
auf 200 ml mit H₂O auffüllen

Die Gelstrips wurden aufgetaut. Zunächst wurden die Strips 15 Minuten in 2 ml Äquilibriumspuffer ohne SDS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml DTT-Lösung (100 mg DTT in 10 ml Äquilibriumspuffer) auf die Gelstrips gegeben. Für weitere 15 Minuten wurden die Gelstrips anschließend in 5 ml Jodacetamid-Lösung (400 mg Jodacetamid in 10 ml Äquilibriumspuffer) äquilibriert. Die Strips wurden auf einem fusselreifen Tuch abgetrocknet und auf die Geloberkante gelegt. Der Gelstrip und der Marker wurden mit Agarose fixiert und in die Elektrophoreseapparatur (Hofer 600, GE Healthcare) gestellt. Diese Kammer benötigt fünf Liter Elektrophorese-Laufpuffer.

Elektrophorese-Laufpuffer:

- 192 mM Glycin
- 25 mM Tris-HCl
- 0,1% (w/v) SDS
- auf 5 l mit H₂O auffüllen.

Das Gel lief mit einer Spannung von 600 V, 50 mA und 50 W für vier Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel sofort fixiert und nach folgenden Färbungsmethoden gefärbt.

2.9 Proteinfärbungen

2.9.1 Proteinfärbung mit Massenspektrometrie (MS)- kompatibler Silberfärbung

Im Rahmen der Untersuchungsreihen wurde eine Silberfärbung verwendet, die aufgrund der niedrigen Formaldehydkonzentrationen MS-kompatibel ist.

Nach erfolgter 2D-SDS-Gelelektrophorese wurden die 2D-Gele zunächst über Nacht in einer Fixierlösung, bestehend aus 500 ml Ethanol, 400 ml H₂O, 100 ml Essigsäure und 0,5 ml Formaldehyd (37%ig), fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden sie drei hintereinander folgenden 20 minütigen Waschungen in 50%igem Ethanol unterzogen, um anschließend eine Sensitivierung mit einer frisch angesetzten Sensitivlösung (0,1 g Na₂S₂O₃ * 5 H₂O (Merck) in 500 ml H₂O) für 60 Sekunden durchzuführen. Darauf folgten wiederum drei Waschungen für je 20 Sekunden mit H₂O. Im Anschluss an die

Waschung wurde die 2D-SDS-PAGE für 20 Minuten in Färbelösung [(0,4 g AgNO₃ in 200 ml H₂O, 150 µl Formaldehyd (37%ig)] inkubiert. Fortführend wurde dreimal für 20 Sekunden mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden die 2D-Gele mit Entwicklerlösung [(15 g Na₂CO₃, 1 mg Na₂S₂O₃ * 5 H₂O in 250 ml H₂O, 125 µl Formaldehyd (37%ig)] behandelt, bis die Spots sichtbar wurden. Die Färbeschalen wurden alle drei bis fünf Minuten gewechselt. Zum Abstoppen der Färbungsreaktion wurden die Gele für 20 Sekunden gewässert und anschließend zehn Minuten in einer Stopplösung (220 ml Ethanol, 220 ml H₂O, 1% Glycin 60 ml Essigsäure) inkubiert. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in 1% HAC bei 4°C.

2.9.2 Proteinfärbung mit Flamingo

Das Gel wurde mit 40% Ethanol, 10% Essigsäure und 50% H₂O für zwei Stunden fixiert. Anschließend wurde das Flamingo-Färbereagenz (BioRad) 1:9 mit H₂O verdünnt und pro Gel 250 ml Färbelösung über Nacht auf das Gel gegeben. Danach wurde das Gel in H₂O gelegt und bei 100 Mikrons mit einer Anregung von 532 nm mittels des Typhoon 9200 (GE Healthcare) gescannt.

Das Gel wurde in einer 500 ml Lösung bestehend aus:

- 40% Ethanol
- 10% Essigsäure und
- 50% destilliertem Wasser

mindestens zwei und maximal 24 Stunden fixiert.

Daraufhin erfolgte die Färbung unter Lichtabdeckung mittels einer 250 ml Färbelösung, die sich aus einem Teil Flamingo-Färbelösung und neun Teilen deionisiertem Wasser zusammensetzte.

2.9.3 Coomassiefärbung für den in-gel Verdau

Es wurden eine Färbelösung bestehend aus:

- 0,2% Coomassie
- 50% Methanol und
- 50% destilliertem Wasser

als auch eine Entfärbelösung bestehend aus:

- 50% Methanol
- 6% Essigsäure und
- 44% destilliertem Wasser

frisch angesetzt.

Das Gel wurde 60 Minuten gefärbt, um anschließend über Nacht entfärbt zu werden. Danach erfolgte eine Umäquilibrierung in H₂O für mindestens eine Stunde.

2.9.4 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

2.9.4.1 Manueller Verdau

Durch das Verdauungsenzym Trypsin, welches zu den sogenannten Endopeptidasen gehört, werden selektiv Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin und Arginin gespalten. Mit einem pH-Optimum von 7,8 arbeitet es bei basischen Bedingungen am effektivsten. In der Proteomanalyse dient Trypsin als Protease, um für die massenspektrometrische Analyse Peptide zu erzeugen.

Der *in situ*-Verdau erfolgte in Eppendorf LoBind Gefäßen (Eppendorf, Hamburg). Die Spots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in die Eppendorf LoBind Gefäße gegeben, mit 100 µl H₂O versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurde der Schritt noch einmal wiederholt. Zunächst erfolgte für 15 Minuten eine Waschung des Gels mit 100 µl 50 mmol/l NH₄HCO₃/ACN und danach die Abnahme des Überstandes. Das Gelstück wurde mit 30 µl ACN vollständig bedeckt. Nach genau 60 Sekunden wurde das ACN abgenommen und

anschließend das Gelstück mit 50 µl 50 mmol/L NH₄HCO₃ Puffer rehydratisiert. Nach fünf Minuten wurde es wiederum mit 50 µl ACN versetzt und weitere 15 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen sowie das Gel durch Zugabe von 50 µl ACN in der Speed Vac getrocknet.

Für den Trypsinverdau wurden 0,5 µg Trypsin (MS-gold grade, Roche) in 250 µl 25 mmol/l NH₄HCO₃ gelöst. Das Gel wurde mit 50µl der angesetzten Trypsinlösung versetzt und zunächst zehn Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben mit 10 µl 1%iger Trifluoressigsäure (TFA) versetzt. TFA wird als stark organische Säure als Lösungsmittel für die entstandenen Peptide genutzt. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die resultierenden Peptide standen nun für massenspektrometrische Analyse zur Verfügung.

2.9.4.2 Automatischer in-gel Verdau mittels Verdauroboter

Im Vorfeld wurden die Gelspots durch den automatischen Spotcutter von Biorad ausgeschnitten und in eine 96-well-Platte (Nunc) gegeben. Der *in situ*-Verdau erfolgte anschließend automatisch mit dem Pipettierroboter MicroStarlet. Die Probenpuffer entsprachen hierbei denen im manuellen Verdau verwendeten Puffern (siehe 2.9.4.1) in entsprechender Konzentration und angepasstem Volumen. Die entsprechenden Arbeitsschritte sind der folgenden Aufzählung zu entnehmen:

- 1 Entfernung des Überstandes
- 2 Reinigung störender Agenzien
- 3 Waschung mit MilliQ
- 4 Waschung mit 50% ACN
- 5 Dehydrierung mit 100% ACN
- 6 Trocknen der Gelspots
- 7 Reduktion mit DTT
- 8 Dehydrierung mit 100% ACN
- 9 Alkylierung mit IAA
- 10 Waschung mit NH₄HCO₃

- 11 Dehydrierung mit 100% ACN
- 12 Auffüllen mit NH_4HCO_3
- 13 Dehydrierung mit 100% ACN
- 14 Hinzufügen von Verdauungs-Puffer
- 15 Verdauung
- 16 Extraktion der Gelspots

Die resultierenden Peptide standen für massenspektrometrische Analysen zur Verfügung und wurden anschließend auf ein MALDI-Target pipettiert. Hierbei musste zuvor eine spezielle Matrix-Lösung angesetzt werden, mit welcher die Proben im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Matrix wurde in gleichen Teilen aus DHB (Dihydroxybenzoesäure) und MDPA (Methyldiphosphonsäure) hergestellt.

Matrix-Lösung:

- 10 mg HCCA
- 90 μl THF
- 5 μl 0,1% TFA
- 5 μl 1 M Zitronensäure

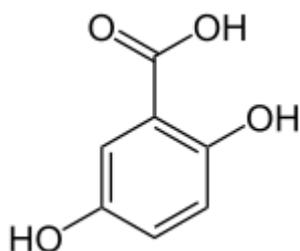


Abb. 6: Strukturformel der 2,5-Dehydroxybenzoesäure (Eagleson 1994, Concise Encyclopedia Chemistry).

2.10 Die Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, welches zur Bestimmung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z) von Ionen dient. Es beruht auf der Erzeugung von Ionen, welche im Analysator in der Gasphase nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung getrennt und im Detektor entsprechend ihrer Flugzeit detektiert werden (siehe Abb. 7).

Dabei können anhand der Molekulargewichte der Peptide durch den Vergleich mit theoretischen Massen aus Datenbanken die Proteine identifiziert werden. Diese Technik ermöglicht die Identifizierung von Proteinen im femtomolaren Bereich.

Nach tryptischem Verdau eines Proteins erhält man eine Reihe von Peptidfragmenten unterschiedlicher Masse, deren Gesamtheit spezifisch für jedes Protein ist und ebenso als „peptide mass fingerprint“ bezeichnet wird (Pappin *et al.* 1993).

Zu den neuen „sanften“ Ionisierungsverfahren der Proteinanalytik werden zwei massenspektrometrische Techniken gezählt: MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry*) und ESI-MS (*Elektro-Spray-Ionisation-Mass-Spectrometry*). Beide Verfahren sind sehr schonend für das zu analysierende Molekül und führen kaum zu Fragmentationen (Hübschmann 2009).

2.10.1 Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisations Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Bei der MALDI-TOF wird die Peptidlösung mit einer UV-absorbierenden Matrix gemischt und zusammen mit dieser auskristallisiert. Bei der MALDI werden die Peptidfragmente mittels kurzer Laserimpulse ionisiert und in die Gasphase überführt und daraufhin in einem elektrischen Feld beschleunigt. Als Detektor ist ein TOF („Time of Flight“)-Massenanalysator angeschlossen, der aus der Flugzeit der Ionen das Verhältnis aus Masse zu Ladung (m/z) berechnet (Hübschmann 2009).

MALDI-TOF-MS-Analysen wurden mit dem Ultraflex I TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen), das mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit ausgestattet ist, durchgeführt. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Sigma) in 50% ACN in 1% MDPA wurde als Matrix verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Peptid-

Standard von Bruker Daltonik. Es wurden jeweils 200-400 Einzelspektren addiert. Als Auswertungsprogramm wurden Compass 1.1 Software (bestehend aus FlexControl 2.4, FlexAnalysis 2.4) und BioTools 3.0 (Bruker) verwendet.

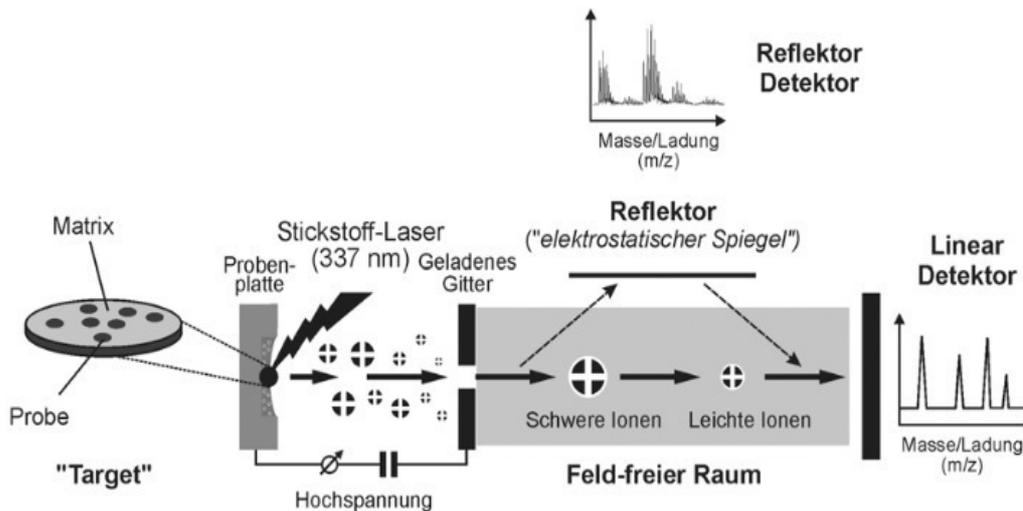


Abb. 7: Schematische Darstellung der MALDI-TOF MS. Die Probe wird mit einer Matrix auf ein Target zur Identifikation aufgetragen. Danach wird sie mit einem Laser (Stickstoff-Laser mit 337 nm) beschossen, wodurch es zur Ausbildung von positiv geladenen Ionen kommt. Durch Beschleunigung im elektrischen Feld werden die Ionen aufgrund unterschiedlicher Flugzeiten getrennt und im Detektor registriert (Quelle: Schiller 2004).

2.11 Datenbanksuche

In dieser Arbeit wurden die Proteine mithilfe der Mascot-Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) identifiziert. Als Grundlage der Datenbanksuche dienten die nach der Messung erhaltenen Massenspektren. Für die Proteinidentifizierung wurde die MSDB-Datenbank verwendet. Die Suche wurde auf *C. elegans* mit einer Massentoleranz von 75 ppm und Carbamidomethylierung von Cystein als globale Modifikation und einer Oxidation von Methionin als variable Modifikation beschränkt. Proteine wurden ab einem 58 Mowse Score als identifiziert betrachtet.

Die zelluläre Lokalisation wurde mit PENCE-Proteome-Analyst-Software (<http://pa.cs.ualberta.ca:8080/pa/>) ermittelt. Homologien und Funktionen der identifizierten Proteine wurden mittels Wormbase (WS153; <http://www.wormbase.org>) bestimmt.

3 Ergebnisse

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit stand im Fokus der Proteinaufreinigung von Überständen schon vorhandener Flüssigkulturen. Das Hauptaugenmerk richtete sich auf die Optimierung der Proteinaufreinigung unter anderem durch Häminaufreinigung, Aceton- und Chloroform-Methanol-Fällung des vorhandenen Probenmaterials. Nach der Probenvorbereitung wurde das entsprechende Probenmaterial durch Durchführen einer eindimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteine visualisiert und massenspektrometrisch bestimmt.

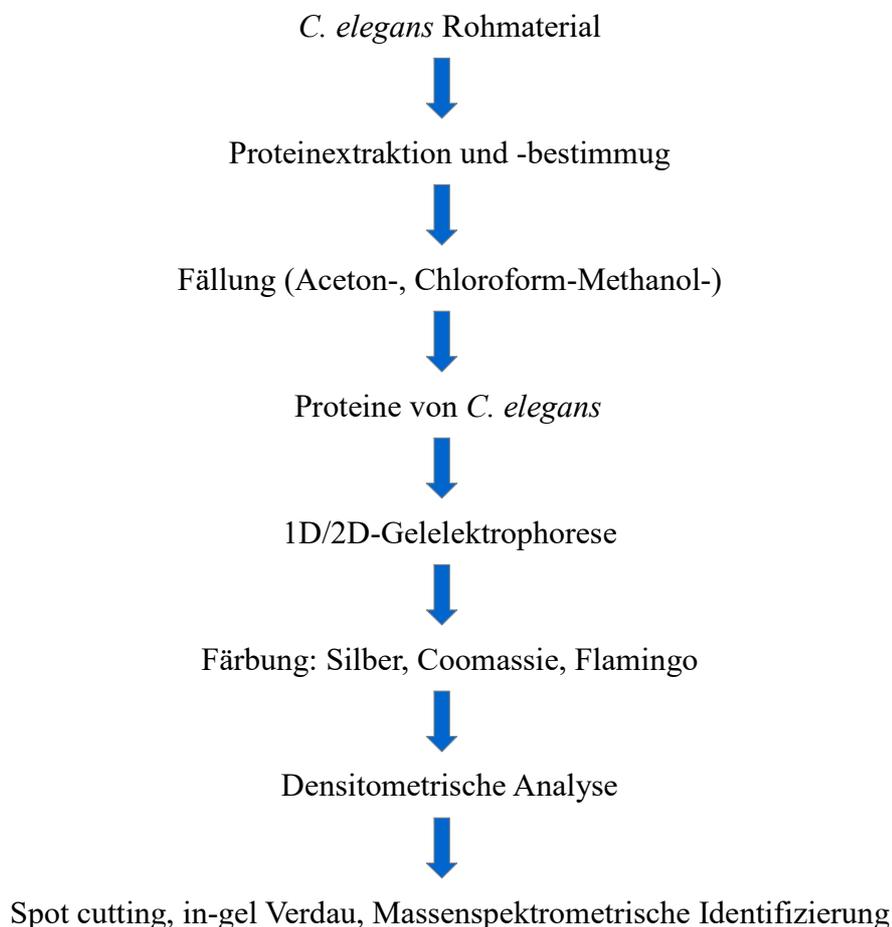


Abb. 8: Arbeitsschritte von der Materialgewinnung bis zur Identifizierung der Proteine (Quelle: Eigene Darstellung).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden exkretorisch-sekretorische Proteine adulter Würmer von initial mit synchronisierten L1-Larven beimpften *E. coli* Platten gewonnen

und aufgereinigt. Anschließend wurden diese aufgereinigten Proteinproben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine massenspektrometrisch identifiziert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde durch RNAi *knock-downs* der Proteine ASP-6, ASP-2 und GalNAcT die Expression der Genprodukte in *C. elegans* herunterreguliert und die Veränderungen in den Proteomen durch zweidimensionale Gelelektrophorese untersucht. Diese Daten wurden abschließend mit anderen parasitären Sekretomen verglichen (siehe 3.5).

3.1 Kultivierung und Aufreinigung der *C. elegans* Würmer sowie Gewinnung der exkretorisch-sekretorischen (ES) Proteine

Zur Gewinnung definierter Larvenstadien musste die Wurmpopulation zunächst synchronisiert werden. Das Prinzip beruht auf der Eliminierung aller lebenden Larvenstadien und adulten Tiere durch eine stark alkalische Hypochloritlösung, wobei nur die Embryonen, geschützt durch eine Vitellinschicht ihrer Eihülle, diese Prozedur überleben. Aufgrund des hohen Bedarfs an Probenmaterial war es notwendig, eine möglichst zeit- und materialeffektive Methode zu etablieren, um die benötigten Mengen an synchronisierten L1-Larven zu erhalten. Zudem musste bei der Aufarbeitung darauf geachtet werden, möglichst alle Zelltrümmer, *E. coli*- und Agar-Reste zu entfernen.

C. elegans wurde zunächst auf mit *E. coli* beimpften Agarplatten kultiviert. Über eine Saccharose-Dichtezentrifugation wurden die *C. elegans* gereinigt und daraus anschließend die Eier gewonnen (siehe 2.3.2). Die Würmer wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag geerntet.

Im Laufe der Arbeit wurden zwei Methoden zur Aufreinigung der Würmer von *C. elegans* verwendet (Entsalzung und Chloroform-Methanol-Fällung). Der Unterschied bestand zum einen im Dichtegradienten und der Konzentration der verwendeten Saccharoselösungen (30% bzw. 60%), zum anderen wurde die Methode der Unterschichtung mit der der Überschichtung verglichen. Es zeigte sich dabei, dass die Überschichtungsmethode zu einer besseren Aufreinigung der Würmer führte, weniger Wurmreste bei den Eiern vorhanden waren und zudem auch zeitsparender war.

Um exkretorisch-sekretorische Proteine von *C. elegans* gewinnen zu können, wurden die adulten Würmer in eine leere Agarplatte gegeben und mit einer sie gerade abdeckenden Schicht von M9-Puffer inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24-48

Stunden, wurde der Überstand abgenommen, filtriert und die sezernierten Proteine mit Aceton gefällt. Nach der Reinigung der Proteine und der Proteinbestimmung wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt.

3.2 Optimierung der Methoden der Probengewinnung

Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass die Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit der Methodik stark von den Bedingungen der Proteinaufreinigung abhängig waren. Hierbei erwies sich die Acetonfällung (siehe 2.6.1) mit nachfolgender Entsalzung vor allem für die 1D-Gelelektrophorese als am besten geeignet für die spätere Proteinidentifikation. Ohne Entsalzung konnten deutlich weniger – in manchen Versuchen sogar keine – Proteine identifiziert werden. Für die 2D-Gelelektrophorese war keine Entsalzung nötig. Ohne Proteinaufreinigung zeigte sich, dass die 2D-Gele von vielen störenden Agenzien beeinflusst wurden, sodass die Gele nicht auswertbar waren. Hierbei waren die Proteinspots stark verschmiert und wiesen kein reproduzierbares Laufmuster auf (siehe Abb. 9).

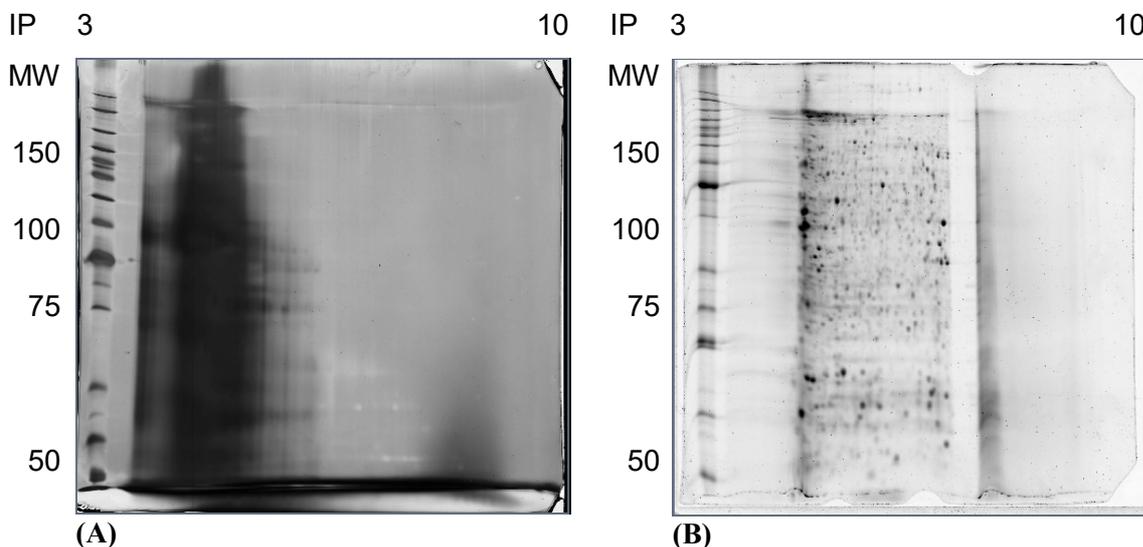


Abb. 9: Auftrennung von ES-Proteinen von Überständen aus der Flüssigkultur von *C. elegans*. Die Abbildung (A) zeigt verwischte Spots mit nicht reproduzierbarem Laufverhalten aufgrund störender Substanzen wie z.B. Hämin. Hier war hinsichtlich der Aufarbeitung keine Entsalzung erfolgt. Zu sehen ist auf Abbildung (B) ein 2D-Gel in Flamingofärbung. Der Unterschied hinsichtlich der Aufarbeitung war eine Acetonfällung mit nachfolgender Entsalzung bei dem Gel, welches auf (B) zu sehen ist. Die Auftrennung erfolgte in einer Spannung von 525 V.

Ergebnisse

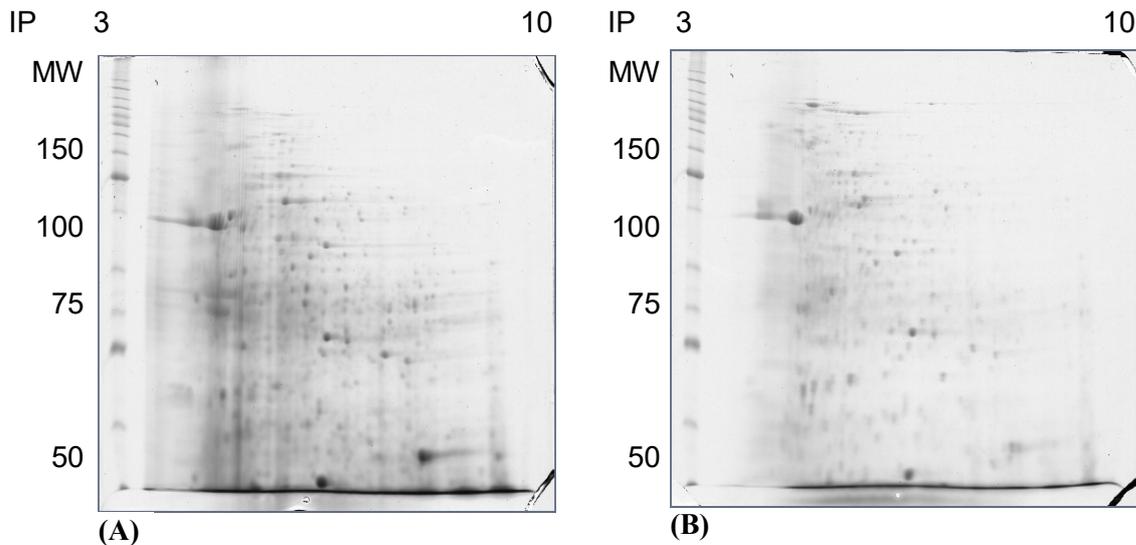


Abb. 10: Auftrennung von *C. elegans* Proteinen aus aufgereinigten ES-Proteinen derselben Proben durch zweidimensionale Gelelektrophorese. Die Abbildung (A) zeigt ein 2D-Gel nach Coomassie-Färbung, die Abbildung (B) ein 2D-Gel aus einer Versuchsreihe nach Fällung mit Aceton.

Für die Gewinnung der ES-Proteine von adulten Würmern von *C. elegans* wurde für die Kultivierung Hämin benutzt. Dieses schien ohne entsprechende Entfernung und Probenvorbereitung die Ergebnisse in der Gelelektrophorese erheblich zu stören, sodass die hier angewandten Methoden etabliert und optimiert werden mussten, um das störende Hämin so vollständig wie möglich aus dem Probenmaterial zu entfernen, ohne dabei einen zu großen Verlust oder eine Schädigung des Probenmaterials zu bewirken. Nach einer Publikation von Ambler und Wynn 1973 konnte dies durch eine Behandlung mit Quecksilberchlorid erreicht werden (siehe 2.5.1).

Nicht nur Hämin stellte sich als erheblicher Störfaktor im Probenmaterial heraus, sondern ebenso in der Probe enthaltene Salze und niedermolekulare Verbindungen, welche sich störend in der Gelelektrophorese auswirkten. Nach Entsalzung stellten sich die einzelnen Proteinspots in den Gelen deutlich erkennbarer dar und zeigten eine bessere Auflösung. Gele, bei denen die Proben keiner Entsalzung unterzogen wurden, zeigten viele horizontale Salzspuren auf, welche die Visualisierung und die Qualität der Spots beeinträchtigten. Vor allem im basischen Bereich wurden die Proteine unzureichend fokussiert und einige Bereiche des Gels wiesen keinerlei Proteinspots auf. In den Versuchen war meist eine direkte Verwendung der Extrakte bzw. der Eluate zur Durchführung der IEF wegen zu geringer Proteinkonzentrationen nicht möglich, sodass

eine Konzentrierung der Proben notwendig war. Hierzu mussten die Fällungsmethoden optimiert werden. Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese (siehe 2.8) und anschließender Silberfärbung (siehe 2.9.1) wurden die resultierenden Gele hinsichtlich des Spotmusters verglichen. Dabei stellten sich die einzelnen Proteinspots in den 2D- Gelen nach Chloroform-Methanol-Fällung deutlicher erkennbar sowie besser aufgelöst dar. Zudem zeigten die Spotmuster eine höhere optische Dichte. Nach Acetonfällung konnte man auf den Gelen dagegen noch viele horizontale Salzspuren erkennen, welche die Visualisierung und somit die Qualität der Auswertung beeinflussten (siehe Abb. 11). Im basischen Bereich konnten die Proteine nach der Acetonfällung nur unzureichend fokussiert werden, einige Bereiche der Gele zeigten keine Proteinspots trotz korrekt aufgetragener Probe.

Nachdem die ES-Proteine durch 1D- bzw. 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt waren, wurden die Gele gefärbt, um die Proteinspots zu detektieren. Auch hier wurde die Methodik zunächst optimiert. Es wurde dazu ein Vergleich der Coomassie-Färbung mit der Silber- und Flamingo-Färbung durchgeführt. Die Gele, die mit Coomassie gefärbt wurden, waren im Vergleich zur Silberfärbung insgesamt nicht so verwaschen, die Proteinspots jedoch optisch schwächer (siehe Abb. 10). Hieraus lässt sich vermuten, dass die Proben mit den Proteinen noch nicht optimal aufgereinigt wurden. Zwar ist die Silberfärbung sensitiver, jedoch auch sensitiver bei der Visualisierung der störenden Agenzien. Zudem konnte beobachtet werden, dass, abhängig von der gewählten Färbemethode, das Spotmuster unterschiedlich war. Dies kann auf die unterschiedliche Affinität des Proteins zum verwendeten Farbstoff zurückzuführen sein (Westermeier 1990). Aus diesem Grund waren die unterschiedlich gefärbten Gele nicht miteinander vergleichbar. Daher wurden die mit Coomassie gefärbten Gele anschließend mit Silber nachgefärbt. Die Entwicklungszeit bei der Silberfärbung (siehe 2.9.1) variierte bei den einzelnen Gelen zwischen 5-15 Minuten, so dass die Stopplösung individuell, vom Gel abhängig, hinzugeben wurde.

3.3 Identifizierungen der ES-Proteine

Die aufgereinigten und mittels Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden zunächst tryptisch verdaut (siehe 2.9.4). Die resultierenden Peptide wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS *peptide mass fingerprint* und MASCOT-Datenbank-Suche (siehe

Ergebnisse

2.11) identifiziert. Insgesamt wurden 38 ES-Proteine aus den Überständen von den L1-Larven von *C. elegans* identifiziert (siehe Anhang Tabelle 1).

Aus diesen identifizierten Proteinen wurden selektiv drei Proteine für die RNAi-Versuche ausgewählt, auf die zu späterem Zeitpunkt detaillierter eingegangen wird (siehe 3.4). Alle identifizierten Proteine wurden entsprechend ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt: Struktur, Metabolismus, Signaltransduktion, Energie-/Redoxstoffwechsel, Proteinstoffwechsel, Chaperone, Proteinsynthese (Transkription/Translation) und Proteine mit unbekanntem Funktionen.

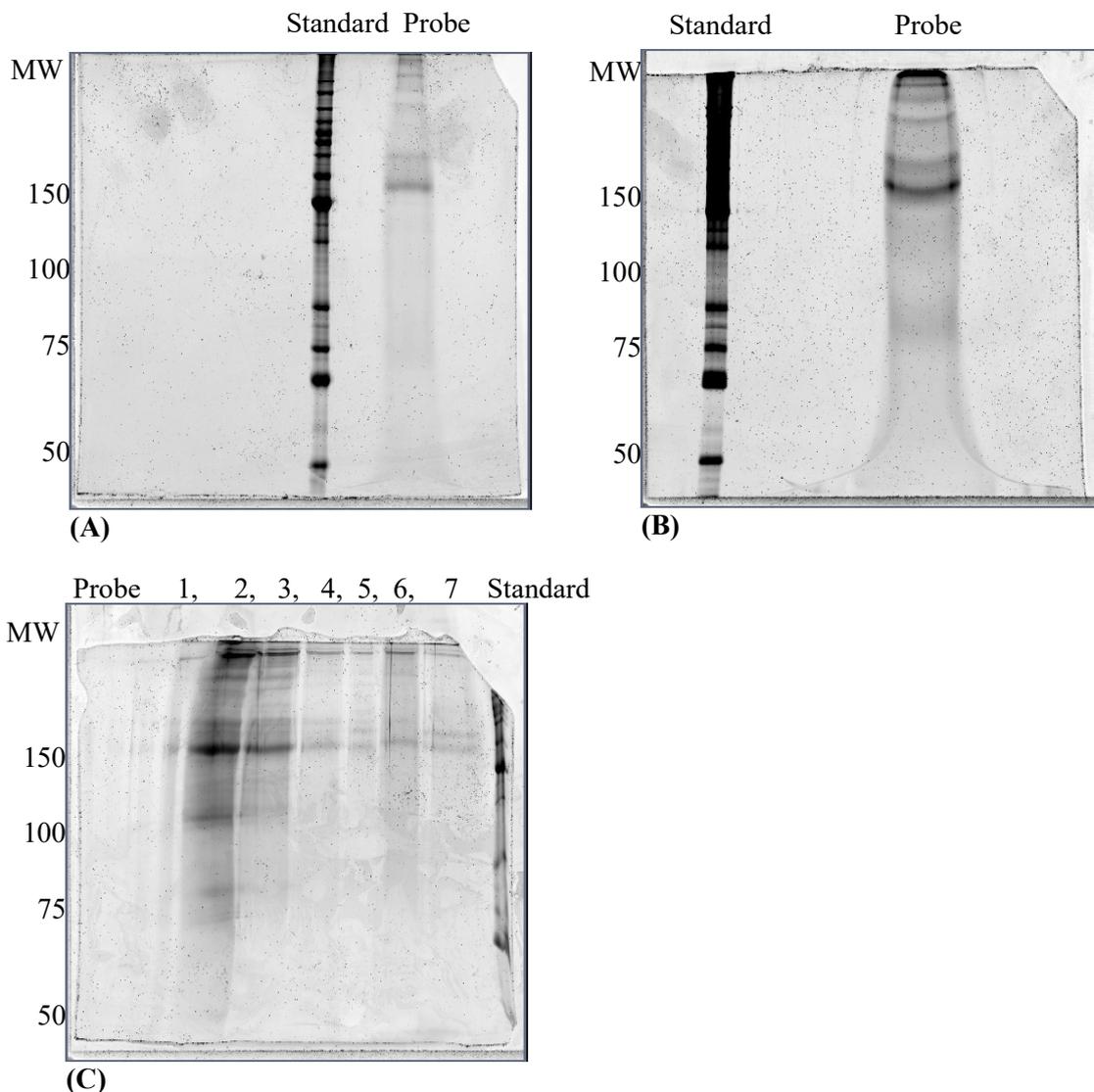


Abb. 11: Auftrennung der Proteine aus den Überständen von den L1-Larven von *C. elegans* durch eindimensionale Gelelektrophorese. Zu ist ein 1D-Gel in Flamingofärbung (A) aus dem Versuch 1D08/40, (B) 1D08/43, (C) 1D09/06. Abgebildet ist ein Vergleich der unterschiedlichen Darstellung der Proteinbanden nach Acetonfällung.

Ergebnisse

(A) Die Probe aus *C. elegans*-Extrakt war gelöst in 3 ml H₂O und 21 ml Aceton. Nach Acetonfällung und Zentrifugation wurden aus 808 µl Überstand 270 µl Probe in die Tasche 6 des Gels gegeben.

(B) Die Probe aus *C. elegans*-Extrakt war gelöst in 3 ml H₂O und 21 ml Aceton. Nach Acetonfällung und Zentrifugation wurden aus 900 µl Überstand 92 µl Probenmaterial in die Tasche 1 des Gels gegeben.

(C) Die Probe aus *C. elegans*-Extrakt entstammte aus dem Überstand einer axenischen Kultur mit dem Pilzmittel Ketoconazol zur Vermeidung von Pilzwachstum sowie 3H-Glucosamin. Sie musste aufgrund erheblicher Störfaktoren mehrfach einer Acetonfällung sowie einer Proteinbestimmung unterzogen werden. Selbiges Probenmaterial wurde in unterschiedlichen Aufreinigungsförm in die Taschen 1-6 aufgetragen.

In den Abbildungen (A) und (B) entspricht die linke Bandenspur dem Marker (Standard), die rechte Bandenspur der oben beschriebenen aufgetragenen Proteinprobe. In Abbildung (C) entspricht die rechte Bandenspur dem Marker (Standard) und die links davon stehenden Reihen 1-7 dem unterschiedlichen Probenmaterial, welches jeweils auf einer separaten Bahn aufgetragen wurden.

Die identifizierten ES-Proteine der L1-Larven aus *C. elegans* mit entsprechender Einteilung sind in Tabelle 1 im Anhang aufgelistet.

Zu der Gruppe der Stoffwechselproteine wurden allgemeine metabolische Funktionen, mit Ausnahme des Protein- und Energiestoffwechsels, gezählt. Die meisten der identifizierten Proteine (37,5%) sind strukturgebend. Daneben wurden Proteine identifiziert, die in der Stoffwechselregulation und im Metabolismus (27,5%) involviert sind, darunter 12,5 % am Proteinmetabolismus.

Weitaus weniger sekretorische Proteine konnten den Funktionen wie Transkription (5%) sowie Signalübertragung (2,5%) oder der Translation (2,5%) zugeordnet werden. Einigen identifizierten PC-substituierten Proteinen konnte bislang keine Funktion (12,5%) zugeordnet werden. Insgesamt konnten mehr Proteine nach Entsalzung und Aufreinigung des Probenmaterials identifiziert werden.

Die 38 identifizierten ES-Proteine, welche der Tabelle 1 im Anhang zu entnehmen sind, wurden anhand ihrer Funktion in separate Tabellen unterteilt. In der nachfolgenden Tabelle 2 sind zunächst alle Strukturproteine aufgeföhrt.

Tabelle 2: Identifizierte Strukturproteine von ES-Proteinen der L1-Larven von *C. elegans*.

Nr.	Protein	Name	GO	Mw [kDa]	pI	SC [%]
29	F25B5.7 NONO-1, PSF-1	<i>NONO (Conserved nuclear protein, aka PSF) homolog</i>	0002119	22,7	9,34	12,3
30	F33E2.6	UC	NI	94,6	6,54	19,0
31	C44B7.5	UC	0005576	26,3	8,44	23,4
32	T07H3.1 BATH-47	<i>BTB and MATH domain-containing protein 47</i>	NI	79,7	8,88	18,1
33	F09F7.2 MLC-3	<i>Myosin Light Chain</i>	0018991	17,1	4,61	20,4
34	Dy3.2 LMN-1 LAM-1	<i>Laminin-1</i>	0000003	64,1	5,43	14,7
35	R186.7 PNN-1	<i>PiNiN nuclear speckle-associated protein and splicing factor homologue</i>	NI	42,5	5,27	20,0
36	F40F4.6 IRG-7	<i>C-type lectin domain protein Infection response protein 7</i>	0040010	24,3	4,72	28,4
37	Y71G12B.16 DRAG-1	<i>RGM domain family member drag-1</i>	NI	47,0	8,91	32,1
38	ZK666.7 CLEC-61	<i>C-type lectin</i>	0005488	44,5	5,24	32,8

UC = Uncharakterisiert, GO = GO-Annotation, Mw = Molekulargewicht, NI = Nicht identifiziert, pI = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Die Gruppe der Strukturproteine umfasst F09F7.2 (MLC-3), ein Myosin-leichte-Kette-Protein, R186.7 (PNN-1), ein Desmosomen-assoziiertes Protein, BATH-47 (T07H3.1), welches eine BTB- und MATH-Domänen enthält, F33E2.6, das mit Kollagen IV und XII assoziiert ist, IRG-7 als *C-type lectin domain protein*, das eine Rolle in der angeborenen Immunität spielt sowie letztlich F25b5.7 (PSF-1, NONO-1), welches

möglicherweise ein strukturgebendes Protein im DNA-Replikations-Komplex ist und somit auch zu den Proteinen gezählt werden kann, die an der Replikation beteiligt sind. Pinin (PNN-1), ein 140 kDa schweres nukleäres und zelladhäsives Phosphoprotein, ist an der Regulation der Zelladhäsion und der Modulation der Aktivität multipler Tumorsuppressorgene beteiligt (Alpatov *et al.* 2004). Deshalb könnte Pinin eine signifikante Rolle in der Stützung des Intermediärfilament-Desmosomen-Komplexes spielen. Es wird spekuliert, ob das Protein durch Tumorzellen supprimiert wird, da in Studien die Zellen von Transitionalzellkarzinomen (*transitional cell carcinoma* =TCC) oder Nierenzellkarzinomen teilweise gar kein Pinin oder nur sehr stark reduziertes Pinin aufwiesen (Alpatov *et al.* 2004). Somit kann Pinin eine bedeutende Relevanz bezüglich kanzerogener Geschehen beigemessen werden. Der endemische Pemphigus foliaceus, eine autoimmun-bedingte dermatologische Erkrankung, bei der es zu Blasenbildungen der Haut kommt, wird durch IgG-Autoantikörper auf ein Desmosomen-assoziiertes Glykoprotein verursacht (Rock *et al.* 1989; Ouyang und Surgrue 1996). Aufgrund dieser Begebenheiten könnten auch andere zelladhäsive Proteine vor allem im Bereich autoimmun-assoziiierter dermatologischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielen. Das Protein T07H3.1 (BATH-47) enthält eine BTB- und MATH-Domäne. Eine BTB-Domäne (*Broad-Complex, Tramtrack, Bric à brac*) agiert meistens als Protein-Protein-Interaktionsdomäne und spielt unter anderem bei der Transkription als Transkriptionsregulator, in der Zytoskelett-Regulation und in der Regulation von Ionenkanälen eine Rolle (Stogios *et al.* 2005). Das größtenteils in die innere Membran des Nukleus eingebundene nukleäre Laminin LMN-1 aus der Familie der Intermediärfilamente konnte ebenfalls identifiziert werden (Liu *et al.* 2000; Tzur *et al.* 2002). LMN-1 ist eine Hauptkomponente der nukleären Lamina der inneren nukleären Membran und der nukleären Peripherie in *C. elegans* und stellt somit eine wichtige Komponente zur Aufrechterhaltung der Kernform dar (Tzur *et al.* 2002; Cohen *et al.* 2002). Eine Reduktion in der Menge des LMN-1 Proteins führt zu embryonaler Letalität in *C. elegans* (Liu *et al.* 2000). LMN-1 spielt nicht nur als zelluläre Komponente eine bedeutende Rolle, sondern wirkt an einer Reihe von biologischen Prozessen mit, wie zum Beispiel bei der Reproduktion, Zytokinese, Mitose, Zellproliferation, der rezeptorvermittelten Endozytose oder als positiver Regulator auf das multizelluläre organische Wachstum, die Embryonalentwicklung und die Lebensspanne von *C. elegans* (Chew *et al.* 2013). Da es kein Ziel für CED-3

während der Apoptose ist und bis zur späten Anaphase in der nukleären Umhüllung in frühen Embryonen verweilt, könnte man daraus den Rückschluss ziehen, dass die Spaltung von Laminin nicht essentiell für die Apoptose in *C. elegans* ist (Tzur *et al.* 2002). Es wird zudem während der gesamten Entwicklungsstadien als auch im adulten Wurm exprimiert (Liu *et al.* 2000) und ist als wichtiger Bestandteil der Filamentproteine von *C. elegans* essentiell für dessen Entwicklung (Karabinos *et al.* 2001).

Das mitochondriale Calcium-bindende Transmembranprotein LETM-1 (F58G11.1b) ist Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran. Es gewährleistet eine konstante Konzentration der Matrix-Kationen. Außerdem hat das Protein einen Einfluss auf die rezeptorvermittelte Endozytose und dient als positiver Regulator in multizellulärem organischem Wachstum (Nowikovsky *et al.* 2004).

Das Protein F09F7.2 (MLC-3) ist ein Myosin-Leichte-Kette-Protein; Myosin wiederum ein Hexamer aus zwei schweren und vier leichten Ketten (zwei regulatorische und zwei essentielle leichte Ketten) und weist EF-Hand Muster auf. Dieses strukturelle Muster besteht aus spezifischen AS-Sequenzen in Proteinen. Über eine Calcium-Bindungs-Domäne kann es Ca^{2+} -Ionen binden und dadurch seine Konformation und somit auch seine Funktion verändern (Cummins und Anderson 1988; Rushforth *et al.* 1998).

DRAG-1, das *Zebrafish* *homologue protein*, gehört zur Proteinfamilie der Membran-assoziierten Proteine, das eine Vielzahl an homöostatischen und entwicklungsbedingten Prozessen reguliert. Mutationen in diesem Protein können zu somatischen und hereditären Störungen im Menschen führen. Es wirkt als positiver Regulator des BMP- ähnlichen Sma/Mab-Signalwegs in *C. elegans*, welcher Größe und Geschlechtsentwicklung der männlichen Nematoden reguliert. DRAG-1 ist das einzige Mitglied der RGM (*repulsive guidance molecule*) Proteinfamilie von *C. elegans* und ist ausschlaggebend für die Regulation der Größe und der Mesodermentwicklung (Tian *et al.* 2010).

Außerdem wurde das Protein F25B5.7 (NONO-1 oder PSF-1) identifiziert, welches zur Gruppe der GIN/PNF-1 Familie gehört. PSF-1 ist im Nukleus lokalisiert und trägt zu einer Reihe von biologischen Prozessen bei, wie zum Beispiel der Larvenentwicklung von Nematoden, der induktiven Zellbewegung und der morphologischen Entwicklung. Es beinhaltet den GINS-Komplex, ein Heteromer aus den Komplexen PSF-1, PSF-2, PSF-3 und SLD-5, und spielt somit eine essentielle Rolle in der Initiierung und Regulation der DNA-Replikation (Ossareh-Nazari *et al.* 2016).

Tabelle 3: Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans*, die an der Signaltransduktion beteiligt sind.

Nr.	Protein	Name	GO	Mw [kDa]	pI	SC [%]
7	ZK1037.5 NHR-247	<i>Nuclear Hormone Receptor family</i>	0006355	38,8	9,81	30,0
8	D2045.6 LIN-19, CULLIN-1	<i>Abnormal cell lineage protein 19</i>	0005488	89,5	6,38	28,7

GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, pI = Isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Aus allen Versuchen konnten nur zwei ES-Proteine aus den L1-Larven von *C. elegans* identifiziert werden, die an der Signaltransduktion beteiligt und Tabelle 3 zu entnehmen sind. Beide Proteine wurden in Versuchen gefunden, welche mittels eindimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

Als Signaltransduktion werden Prozesse bezeichnet, mittels derer Zellen zum Beispiel auf äußere Reize reagieren, diese umwandeln und in das Zellinnere weiterleiten. An diesen Prozessen sind oft eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen (*second messenger*) in einer oder mehreren nachgeschalteten Ebenen beteiligt (Signalkaskade). Dabei wird das ursprüngliche Signal verstärkt (Signalamplifikation). Signale mehrerer Signalkaskaden werden oft durch „Crosstalk“ im Zytoplasma oder im Zellkern integriert. Die Gesamtheit der Signalkaskaden in einem Zelltyp wird auch als dessen Signalnetzwerk bezeichnet. Signalnetzwerke sind plastisch, d.h. sie variieren z.B. in verschiedenen Entwicklungsstufen eines Organismus (Silverthorn 2007).

Die Proteine von *C. elegans*, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, sind vorwiegend im Nukleus und im Cytosol lokalisiert. Diese Proteine kommen nahezu in allen Stadien vor, wobei das Protein LIN-19 vor allem in embryonalen Entwicklungsstufen die höchsten Konzentrationen aufweist und dagegen im Larvenstadium und in der adulten Form in nur geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Kipreos *et al.* 1996).

Neben dem Protein D2045.6 (LIN-19, CULLIN-1) ist auch das *Nuclear Hormone Receptor family* Protein NHR-247 (ZK1037.5) an der Signaltransduktion beteiligt.

Das Protein LIN-19/CULLIN-1 ist wahrscheinlich eine Kernkomponente mehrerer CULLIN-RING-haltiger Skp1-Cul1-F-Box(SCF)-E3-Ubiquitin-Proteinligase-Komplexe wie zum Beispiel dem RING-Cullin-BTB-Komplex. Die BTB-Domäne entspricht in diesem Fall dem Skp1. Sie bindet Cullin3 und bewirkt gleichzeitig die Substraterkennung durch weitere Domänen (Geyer *et al.* 2003; Furukawa *et al.* 2003; Pintard *et al.* 2003). Culline gehören zur Klasse der RING (*really interesting new gene*)-Finger-Ligasen (Freemont 1993). LIN-19 fungiert demnach möglicherweise als eine Cullin-abhängige Ubiquitin-Ligase, welche an der Ubiquitinierung und Markierung von Proteinen für den anschließenden Abbau durch das 26S-Proteasom beteiligt ist. Die Lokalisation von LIN-19 findet sich im Zytoplasma. Als ein Stützprotein leistet es möglicherweise einen Beitrag an der Katalyse durch Platzierung der Substrate und dient als Enzym zur Ubiquitin-Konjugation (Ghazi *et al.* 2007). Zum einen wird es für den Übergang der G1 Phase des Zellzyklus zur G0 Phase bzw. zur Apoptose benötigt (Ghazi *et al.* 2007) und zum anderen ist es an einer Vielzahl an biologischen Prozessen beteiligt, so zum Beispiel am Zellzyklus, an der Zellteilung und Embryonalentwicklung, an der negativen Regulierung von Apoptose, Zellproliferation, Zentrosomenduplikation, mitotischen Zellteilung, Larvenentwicklung, DNA-Reparaturmechanismen und der Signaltransduktion über p53-gesteuerte Mediatoren sowie an der positiven Regulation der Ubiquitinierung (Kipreos *et al.* 1996).

Das identifizierte Protein NHR-247, ein 38 kDa schweres Protein, gehört zur Gruppe der *nuclear hormone receptor protein family*. Nukleare Rezeptoren (NR's) sind Transkriptionsfaktoren und werden typischerweise durch lipophile Hormone, die den Metabolismus, die Entwicklung und die Homöostase koordinieren, reguliert. *C. elegans* besitzt 284 dieser Rezeptoren im Genom. Diese NR's beeinflussen verschiedenartige biologisch bedeutsame morphologische Merkmale wie die Geschlechtsentwicklung, Zellteilung, Entwicklungszeit, Ruhestadien und die Lebensspanne. Sie haben ebenso eine Auswirkung auf die neuronale Entwicklung, den Axon-Auswuchs und neuronale Identität. Letztlich beeinflussen sie die den Lipid- und xenobiotischen Metabolismus (Antebi 2006).

Tabelle 4: Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans*, die an der Entwicklung beteiligt sind.

Nr.	Protein	Name	GO	Mw [kDa]	pI	SC [%]
9	C45G3.3 GIP-2	<i>Gamma-tubulin interacting protein 2</i>	0000003	73,4	9,39	13,2
10	K08E7.3 LET-99	<i>Protein let-99, Lethal protein 99</i>	0009792	80,1	9,52	15,8
11	F58G11.1a LETM-1	<i>LETM1 (Leucine zipper, EF-hand, TransMembrane mitochondrial protein) homolog</i>	0040018	88,7	5,94	12,4
12	F11A10.2 REPO-1	<i>Reversed Polarity in early embryos</i>	0000003	25,5	9,27	32,0
13	K07H8.1 TBCE-1	<i>Tubulin folding Cofactor E homolog</i>	0008340	56,7	5,99	22,1
14	F15E6.1 SET-9	<i>Set (Trithorax/polycomb) domain containing protein 9</i>	0008340	182,6	8,65	29,0

UC = Uncharakterisiert, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, pI = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Tabelle 4 führt die ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans* aus der Funktionsgruppe der Entwicklung auf: REPO-1 (F11A10.2), GIP-2 (C45G3.3), TBCE-1 (K07H8.1), welches ein Kofaktor für die Tubulinfaltung ist, SET-9 (F15E6.1), LETM-1 (F58G11.1a) und LET-99 (K08E7.3).

GIP-2 wird vor allem mit der Larvenentwicklung, der Entwicklung der Genitalien des Hermaphroditen sowie dem Wachstum in Zusammenhang gebracht. GIP-1 ist in der Lage beide zentrosomalen und nicht zentrosomalen *microtubule organizing centers* (MTOCs) in den adulten Keimbahnen und im embryotischen Verdauungstrakt in *C. elegans* zu lokalisieren (Skokan 2016). In RNAi-Versuchen konnte gezeigt werden, dass GIP-1 für die Lokalisation des verbleibenden γ -TuSc Proteins in der frühen Embryonalentwicklung notwendig ist (Hannak *et al.* 2002; Srayko *et al.* 2005). Man geht davon aus, dass GIP-1 eine entscheidende Rolle in der MTOC-Funktion spielt. Darüber hinaus suggerieren cDNA-Nachweise die Anwesenheit von drei Isoformen von GIP-1 in *C. elegans*, alle unterschiedlich am C-Terminus angeordnet. Man geht davon aus, dass GIP-1 eine entscheidende Bedeutung für die Mitose im Intestinum hat, hier

aber multiple redundante Wege in die Mikrotubulus-assoziierten Keimbildungen an der Apikalmembran existieren (Skokan 2016).

Das Protein REPO-1 kodiert ein 200 Aminosäure-enthaltendes Protein, das Ortholog des menschlichen SF3a66, das eine Komponente der Untereinheit 2 der snRNPs ist und im pre-mRNA Splicing involviert ist. Es kann die Mikrotubuli unabhängig von seiner Funktion als Spleiß-Faktor bündeln. Eine Reduktion des REPO-1 in RNAi *knock-down* Versuchen führt möglicherweise durch ausbleibende frühe embryotische Zellteilung zu embryonaler Letalität (Keikahee *et al.* 2014).

Das Protein SET-9 spielt in *C. elegans* bei der Determination der Lebensdauer und der Antwort der mit einem DNA Schaden verbundenen Stimuli eine Rolle. Nach Inaktivierung durch RNAi vermag es, ebenso wie ein anderes SET-Domänen-Protein in *C. elegans* (SET-15), die Lebensspanne der Würmer zu erhöhen (González-Aguilera *et al.* 2013).

Für die Spindelorganisation und -ansiedlung nach der Polarität ist unter anderem das Protein LET-99 (*lethal protein 99*) verantwortlich. Vermutlich hat es einen Einfluss auf die Interaktion zwischen den astralen Mikrotubuli und dem Zytoskelett. Außerdem zeigt es antagonisierende Wirkung bzgl. des GPR-1/2 Signalübertragungsweges (Rose und Kemphues 1998; Tsou *et al.* 2002; Tsou *et al.* 2003).

Tabelle 5: Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans*, die am Stoffwechsel beteiligt sind.

Nr.	Protein	Name	GO	Mw [kDa]	pI	SC [%]
20	R05F9.12 AAGR-2	<i>Acid Alpha Glucosidase Relate</i>	0005975	106,8	5,51	10,0
21	Y45F10D.3 GLY-10	<i>Putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10</i>	0002119	10,2	9,89	15,3
22	F58B3.3 LYS-6	<i>Lysozyme-6</i>	0003796	23,1	6,03	17,2
23	T21H3.1 a	UC	0006629	33,5	5,92	34,1
24	F53F4.10	<i>Probable NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial</i>	0003954	26,2	6,54	24,1

Ergebnisse

25	Y41G9A.1 OSM-5	OSM-5	00035058	92,3	5,47	7,1
26	F35C5.6 CLEC-63	<i>C-type lectin</i>	0005488	44,5	5,47	46,2
27	C02A12.4 LYS-7	<i>Lysozyme-like protein 7</i>	0008340	30,9	6,71	32,1
28	F18C12.1 CHE-3	<i>Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1,</i> <i>Abnormal chemotaxis protein 3</i>	0006200	47,3	5,81	6,8

HP = Hypothetisches Protein, UC = Uncharakterisiert, GO = GO-Annotation, MW= Molekulargewicht, pI= isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

In Tabelle 5 sind die ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans* aufgeführt, welche der Funktionsgruppe des Stoffwechsels zugeordnet werden können.

Diese Proteine sind teilweise in verschiedenen Organellen wiederzufinden, wie zum Beispiel GLY-10, welches in der Golgi-Membran, integral oder im Nukleus lokalisiert ist oder OSM-5, welches seine subzelluläre Lokalisation im Zilienkomplex oder der perinukleären Region des Zytoplasmas haben kann.

Das Protein F53C5.6 (CLEC-63) ist ein *C-type lectin* oder auch eine *carbohydrate-recognition domain* (CRD). Das Protein Y41G9A.1 (OSM-5) hat Bindungsfähigkeiten für neuronale Zellen. Das bedeutet, es interagiert selektiv nicht-kovalent in stöchiometrischer Weise mit verschiedensten Molekülen. Durch seine Fähigkeit zur Neuronenprojektion, können Signale einer Nervenzelle über Axone oder Dendriten weitergeleitet werden. Es ist in axonalen Mikrotubuli auffindbar, welche als sensorische Organellen fungieren und sich auf die Organisation von sensorischen Signalmolekülen konzentrieren. Eine Mutation im OSM-5 resultiert in Defekten des Intraflagellartransports (IFT) und der Zilien (Blaque *et al.* 2004).

Am Energiestoffwechsel beteiligt ist das Protein CHE-3, von dem vermutet wird, dass es ATP-Bindungsfähigkeit besitzt und als ATPase aktiv ist. Diese Isoform von Dynein zeigt zeitweise eine begrenzte Expression in zilienbesetzten sensorischen Neuronen. Mutierte Formen des Proteins zeigen entwicklungsspezifische Defekte der chemosensorischen Zilien. Diese Ergebnisse sind mit der Annahme vereinbar, dass dieses Motorprotein eine Rolle im Prozess des Intraflagellartransportes spielt. Ebenso ist es an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, so zum Beispiel an der multizellulären Entwicklung, an der negativen Regulation von Wachstumsfaktoren über

Ergebnisse

den β -Rezeptor Signalweg sowie an der Proteinlokalisierung. Zudem weist es chemosensorische Eigenschaften auf, mithilfe derer die Mikrotubuli-basierende Beweglichkeit beeinflusst werden kann. Es ist Bestandteil des Zytoplasmas, der Mikrotubuli, der Zilienmembran sowie des Dynein-Komplexes (Wicks *et al.* 2000).

Das Protein Y45F10D.3, eine Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase 10 (GLY-10), besitzt UDP-N-Acetyl-D-Galactosaminyl-Transferase-Aktivität. Außerdem ist eine Bindungsstelle für Glukose und Metallionen vorhanden.

Das Lysozym 6 (LYS-6) besitzt Lysozym-Aktivität. Lysozyme sind kleine Enzyme, die Peptidoglykane – als eine essentielle Komponente bakterieller Zellwände – spalten können. Sie kommen in nahezu allen Organismen gefunden werden und spielen eine wichtige Rolle in Immunität und Verdauung (Boehnisch *et al.* 2011).

Das Protein T21H3.1a/b ist ein noch uncharakterisiertes Protein, das Hydrolase-Aktivität besitzt und am Lipidstoffwechsel beteiligt ist.

Tabelle 6: Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans*, die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind.

Nr.	Protein	Name	GO	Mw [kDa]	pI	SC [%]
15	T18H9.2b ASP-2	<i>Aspartyl Protease-2</i>	0006508	68,6	5	13,0
16	F21F8.7.1 ASP-6	<i>Aspartyl Protease-6</i>	0006508	41,5	5,63	23,2
17	F3511.11a DYF-14	<i>Abnormal dye filling protein 14</i>	NI	223,4	5,68	30,0
18	F11D5.3 a/b DDR-2	<i>Discoidin domain receptor protein 2</i>	0006468	86,9	6,05	6,2
19	D2045.5	<i>Ortholog of human tau tubulin kinase 2 (TTBK 2)</i>	0006468	40,2	9,29	24,8

UC = Uncharakterisiert, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, NI = Nicht identifiziert, pI = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Tabelle 6 führt alle ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans* auf, die der Funktionsgruppe des Proteinstoffwechsels zugeordnet werden konnten. Hierzu zählen Enzyme und Proteine, die am Protein- und Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind. Diese

Ergebnisse

Proteine sind hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. Identifiziert wurden das Protein DYF-14 (*abnormal dye filling protein 14*), DDR-2 (F11D5.3 a/b), D2045.5 mit Protein-Kinase-Aktivität, als auch ASP-2 und ASP-6, die hier nur kurz erwähnt sind, aber auf die im Rahmen der RNAi-Versuche näher eingegangen wird (siehe 3.4).

Die Aspartylprotease 2 (ASP-2) mit den Transkripten T18H9.2 a/b und die Aspartylprotease 6 (ASP-6) sind hydrolytische Enzyme, die den Abbau intra- und extrazellulärer Proteine durch Spaltung von Peptidbindungen im Rahmen der Proteolyse ermöglichen. Sie haben sowohl Endopeptidase-Aktivität als auch katalytische Funktion. Mindestens sechs Aspartylproteasen sind im *C. elegans* Genom verschlüsselt (ASP-1 bis ASP-6). Aspartylproteasen sind Transmembranproteine. Die ASP-2 hat ein Molekulargewicht von 68,5 kD und einen zu erwartenden IP von 4,80 und gehört der A1-Familie der Peptidasen an (Syntichaki *et al.* 2002).

Das Protein DDR-2 (*discoidin domain receptor protein 2*) ist an der Phosphorylierung von Tyrosin beteiligt. Die *discoidin domain receptor* Proteine DDR-1 und DDR-2 sind Kollagenrezeptoren, die der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen angehören. Beide DDR's binden an unterschiedlichen Kollagentypen und spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. Sie wirken an einer Vielzahl von Signalwegen und molekularen Mechanismen mit, die die Rezeptorfunktion regulieren. Sie interagieren mit der extrazellulären Matrix, ermöglichen zelluläre Funktionen wie die der Zellmigration, Zelladhäsion, Proliferation und Zelldifferenzierung und sind an der Remodellierung der extrazellulären Matrix beteiligt (Leitinger 2014).

Das Protein D2045.5 ist im Nukleus und Zytoplasma lokalisiert und zählt ebenso zu den Proteinen mit einer Kinase-Aktivität. Es ist für die Phosphorylierung von Serin und Threonin zuständig und weist eine ATP- und Nukleotid-Bindungsfähigkeit auf. Bezüglich der biologischen Prozesse ist es an der Proteinphosphorylierung sowie Endozytose beteiligt und reguliert die Zellform.

Letztlich ist das *abnormal dye filling protein 14* (DYD-14) zu nennen, das vorrangig an der Ziliogenese beteiligt ist (Ou *et al.* 2007). Unter Ziliogenese versteht man die Bildung der Zellantenne (Primärzilie) oder die Bildung eines extrazellulären flüssigkeitsvermittelten Mechanismus durch das bewegliche Zilium. Die Ziliogenese umfasst die Anordnung und den Abbau der Zilien während des Zellzyklus. Zilien sind wichtige Zellorganellen und in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert, so zum Beispiel in der Signaltransduktion von Zellen (Sorokin 1962). Fehlregulationen in

Ergebnisse

der Ziliogenese können zur Entstehung vieler Krankheiten führen, bei denen nicht-intakte Zilienfunktionen im Vordergrund stehen (Ishikawa und Marshall 2011). Die Ziliogenese läuft in einer bestimmten Reihenfolge ab. Zunächst müssen die Basalkörperchen der Zentriolen an die Oberfläche einer Zelle wandern, um sich am Kortex zu befestigen. Auf diesem Weg befestigen sie sich an Membranvesikeln, fusionieren mit der Plasmamembran einer Zelle und formen so die Zellmembran. Die Ausrichtung der Zilienformation hängt von der ursprünglichen Positionierung und der Orientierung der Basalkörperchen ab (Sorokin 1962). Damit sich ein Zilium verlängern kann, müssen die Proteine selektiv vom Zytoplasma importiert und bis an die Spitze des Ziliums transportiert werden. Dies geschieht mithilfe des Intraflagellartransportes (IFT). Wenn das Zilium komplett geformt ist, nimmt es neues Tubulin auf, gleichzeitig wird altes Tubulin abgebaut. Hierzu wird ein aktiver Mechanismus benötigt, der auch die Zilienlänge reguliert. Schädigungen in diesen Mechanismen können die Beweglichkeit dieser Zellen und die darauffolgenden Signaltransduktionen zwischen Zellen erheblich beeinträchtigen (Badano *et al.* 2006; Parker *et al.* 2010; Tammachote *et al.* 2009).

Tabelle 7: Identifizierte ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans*, die keiner Funktionsgruppe zugeordnet werden konnten.

Nr.	Protein	Name	GO	Mw [kDa]	pI	SC [%]
1	DH11.4	UC	NI	41,7	8,8	30,0
2	T07H3.7	UC	NI	79,7	8,88	18,0
3	D1044.6	UC	NI	118,1	6,73	32,8
4	F25A2.1	UC	0006629	16,6	5,74	34,1
5	C33H5.1	UC	NI	34,7	6,02	6,02
6	LLC1.2	UC	0019915	30,4	5,7	5,7

UC = Uncharakterisiert, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, NI = Nicht identifiziert, pI = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Es wurden auch ES-Proteine der L1-Larven von *C. elegans* identifiziert, die keiner der schon genannten Funktionsgruppen zugeordnet werden konnten. Diese sind der oben stehenden Tabelle 7 zu entnehmen.

3.4 RNAi-Experimente

Aus den 38 identifizierten Proteinen aus den Überständen der L1-Larven von *C. elegans* wurden drei Proteine ausgewählt, die bezüglich ihrer Eigenschaften interessant für weitere Charakterisierungen erschienen. Um die Funktionen dieser Proteine hinsichtlich der Zusammensetzung des Sekretoms aufzuklären, wurde hierzu die Methode der RNA-Interferenz ausgewählt. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, eine gezielte Ausschaltung von Genprodukten zu erreichen. Als interessante Proteine wurden die Aspartylproteasen ASP-2 und ASP-6 sowie die GalNAcT (GLY-10) ausgewählt. ASP-6 wurde ausgewählt, da es das einzige und erste ES-Produkt von *C. elegans* ist, welches als PC-modifiziert beschrieben wurde (Grabitzki *et al.* 2008). Vergleichend dazu wurde ASP-2 ausgewählt, da es als ES-Produkt identifiziert wurde und homologe Proteine bei *Brugia malayi* (Moreno und Geary 2008; Hewitson *et al.* 2008; O'Regan *et al.* 2014) und *Schistosoma japonicum* (Liu *et al.* 2009; Cao *et al.* 2016) beschrieben wurden. Schließlich wurde GLY-10 ausgewählt, da es häufig bei Sekretomanalysen identifiziert wurde und an der O-Glykosylierung sekretorischer Proteine beteiligt ist (Layden *et al.* 2001).

Für die RNAi-Experimente wurden transformierte *E. coli* aus der *RNA feeding library* verwendet, die bereits erfolgreich für genomweite RNAi-Screens verwendet wurden (Bargmann 2001).

Nach RNAi *knock-down* wurden die Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und die Sekretome auf Veränderungen untersucht. In allen Experimenten zeigten sich erhebliche Unterschiede im Vergleich zu dem Kontroll-Sekretom, einem leeren RNAi-Vektor. Nach ASP-2 *knock-down* wurden 30 Proteine, nach ASP-6 15, nach GalNAcT 34 und in der Kontrolle 61 Proteine identifiziert, welche in den nachfolgenden Tabellen 8 bis 11 aufgeführt werden.

Tabelle 8: Identifizierte Proteine nach ASP-6 *knock-down* aus *C. elegans*.

Nr.	Protein	Name	GO	Fkt	Mw [kDa]	pI	SC [%]
1	W03F11.4	<i>Protein-Tyrosin-Phosphatase</i>	0004725	M	157,6	7,71	7,1
2	T13H10.2	UC	NI	U	54,5	7,27	11,8
3	F37C12.13 EXOS-9	<i>EXOSome (Multiexonuclease complex) component</i>	0006396	E	48,0	5,01	14,7
4	F08D12.10 SDZ-9	<i>SKN-1 Dependent Zygotic transcript</i>	NI	TK	40,8	7,55	19,6
5	ZC412.3	UC	0005576	S	26,8	5,52	28,0
6	C09D1.1f UNC-89	<i>Muscle M-line assembly protein unc-89</i>	0030241	S	894,3	6,14	2,3
7	R13H4.4a HMP-1	<i>Alpha-catenin-like protein hmp-1</i>	0007155	S	104,0	5,67	8,6
8	M02F4.1	UC	NI	U	45,9	5,42	19,1
9	F13A2.3	UC	NI	U	36,7	8,7	19,1
10	F25C8.4 ACS-12	<i>Fatty Acid CoA Synthetase family</i>	0003824	M	62,3	5,87	11,3
11	M142.5	UC	NI	U	22,9	7,64	26,8
12	Y51H1A.6b MCD-1	<i>Modifier of cell death</i>	0040007	E	102,6	9,04	22,0
13	C40D2.3 MATH-21	<i>MATH (Meprin-associated Traf homology) domain containing</i>	0040011	S	51,7	8,29	15,6
14	Y71G12B.22	UC	NI	U	26,9	9,12	20,6
15	T04C9.1b	UC	0007165	Si	97,2	6,85	8,9

UC = Uncharakterisiert, U = Unbekannt, M = Metabolismus, NI = Nicht identifiziert, S = Struktur, Si = Signaltransduktion, E = Entwicklung, TK = Transkription, Fkt= Funktion, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, IP = isoelektrischer Punkt, SC= Sequence coverage

Nach ASP-6 *knock-down* wurden Proteine unterschiedlicher Funktionen identifiziert, die Tabelle 8 zu entnehmen sind. Den Strukturproteinen gehört unter anderem das Protein C09D1.1f (UNC-89) an. Es ist als strukturelle Komponente der M-Linien von Muskelzellen mittig der A-Bande lokalisiert und wird in der Zellwand, der Pharynxmuskulatur und in einigen Muskelzellen des Schwanzes von *C. elegans* exprimiert (Small *et al.* 2004). Das Faserwerk der Myofilamente beginnt mit einem

Aufrichtungssignal aus der Basalmembran und der Muskelzellmembran. UNC-89 antwortet auf diese Signale, lokalisiert sie und führt zu einer Anordnung der M-Linie (Benian *et al.* 1996; Small *et al.* 2004; Blomberg und Nilges 1997; Xiong *et al.* 2009). Es beinhaltet mehrere Domänen: Eine DBL-homologe, vier Fibronectin Typ III, fünfzig Ig-like C2-Typ, eine PH-Domäne, zwei Proteinkinase-Domänen, vier RCSD-Domänen und eine SH3-Domäne. Eine SH3-Domäne ist ein Protein aus ungefähr fünfzig Aminosäuren, welches zunächst als eine konservierte Sequenz in dem nicht-katalytischen Teil verschiedener zytoplasmatischer Protein-Tyrosin-Kinasen identifiziert wurde. Seitdem wurde es in einer Vielzahl anderer intrazellulär gelegener Proteine oder Membranproteinen gefunden. Möglicherweise vermittelt die SH3-Domäne die Anordnung eines spezifischen Proteinkomplexes über die Bindung Prolin-haltiger Peptide (Fraser *et al.* 2000). UNC-89 ist nicht nur ein Strukturprotein, sondern dient ebenso der Fortbewegung (Gottschalk *et al.* 2005; Fraser *et al.* 2000), der Regulation der Signaltransduktion des Rho-Proteins, der Aufrichtung des dicken Myosinfilamentes im Skelettmuskel und spielt eine Rolle als Wachstumsfaktor in endothelialen Gefäßen über die rezeptorvermittelte Signaltransduktion (Waterston *et al.* 1980). Auf molekularer Ebene besitzt es mehrere Arten der Bindungsfähigkeit: ATP-, Rho-GTPase-Bindungsfähigkeit (Qadota, Blangy *et al.* 2008), Phosphatase- sowie Rezeptoraktivität für den endothelialen Wachstumsfaktor und den Rho-Guanyl-Nukleotid-Austauschfaktor, welcher den Austausch von Guanyl-Nukleotiden der Rho-Familie, vermittelt über eine GTPase, stimuliert (Qadota, McGaha *et al.* 2008). In der Gruppe der Strukturproteine wurde außerdem das Protein R13H4.4a (HMP-1) identifiziert. Dieses wird für die Zellwanderung während der Entstehung der Anlage des Körpers sowie während der Änderung der Zellform benötigt (Costa *et al.* 1998; Natarajan *et al.* 2001).

Die Proteine ZC412.3, Y71G12B.22, F13A2.3, M02F4.1, T13H10.2 und M142.5 sind bisher funktionell nicht näher charakterisiert.

An der Signaltransduktion und der Proteinbindung ist das intrazellulär liegende Protein T04C9.1b beteiligt. Die Proteine Y51H1A.6b (MCD-1) sowie F37C12.13.a (EXOS-9) sind unter anderem an der Larvenentwicklung, am Wachstum, der Reproduktion und der Apoptose beteiligt und konnten somit den Proteinen aus der Gruppe der Entwicklung zugeordnet werden.

Ergebnisse

Nur ein einziges Protein wurde der Signaltransduktion zugeordnet: Das Protein W03F11.4, eine Protein-Tyrosin-Phosphatase.

Letztlich wurde das Protein F08D12.10 (SDZ-9) identifiziert. Es ist ein *SKN-1 Dependent Zygotic transcription family member*, das eine F-Box-Domäne beinhaltet und somit der Transkription zugeordnet werden kann.

Tabelle 9: Identifizierte Proteine nach ASP-2 knock-down aus *C. elegans*.

Nr.	Protein	Name	GO	Fkt	Mw [kDa]	pI	SC [%]
1	F09F7.2a.1 MLC-3	<i>Myosin, essential light chain</i>	0005509	S	10,3	4,61	47,1
2	C07A12.4c PDI-2	<i>Protein Disulfid Isomerase 2</i>	0005783	PM	55,2	4,66	22,4
3	Y105E8B.1a LEV-11	<i>Tropomyosin a/b/d/f</i>	0007015	S	33,0	4,66	37,7
4	Y38A10A.5.1 CRT-1	<i>Calreticulin</i>	0002119	E	45,6	4,59	13,7
5	Y106G6A.1	UC	0004674	PM	49,1	6,69	10,9
6	T01B11.4 ANT-1.4	<i>AdenineNucleotide Translocator</i>	0006810	M	34,3	9,79	14,1
7	C07A12.4b PDI-2	<i>Protein Disulfid Isomerase 2</i>	0010171	E	55,2	4,76	19,2
8	F42G8.10a	UC	0009792	E	21,3	9,2	18,7
9	Y32F6A.3 PAP-1	<i>Poly-A Polymerase</i>	0043631	TK	75,7	6,94	23,2
10	C34E10.6.2 ATP-2	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	0015991	M	57,5	5,52	39,9
11	F09C6.15	UC	NI	NI	12,5	4,78	40,1
12	F26D10.3.2 HSP-1	<i>Heat shock 70 kDa protein A</i>	0010171	E	69,7	5,44	11,1
13	C44C10.11.2	UC	NI	U	46,5	8,49	15,1
14	K02F2.2.2 AHCY-1	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	0004013	PM	47,50	5,85	18,1
15	M03F4.2c ACT-4	<i>Actin-4</i>	0000910	S	41,8	5,56	29,4
16	F58A4.4 PRI-1	<i>DNA primase small subunit</i>	0006269	TK	48,1	8,36	14,4
17	F20B6.2	<i>Probable V-type proton ATPase</i>	0015991	M	54,7	5,32	25,3

Ergebnisse

	VHA-12	<i>subunit B</i>					
18	F10C2.6	<i>Aspartyl(D) Amino-acyl tRNA</i>	0006418	TL	67,3	6,16	10,8
	DARS-2	<i>Synthetase</i>					
19	F58A6.2	UC	NI	U	22,7	8,22	21,6
20	H28O16	<i>ATP synthase subunit alpha,</i>	0015986	M	24,9	8,98	21,7
	ATP-3	<i>mitochondrial</i>					
21	R11A5.3	UC	NI	U	17,5	11,76	23,9
22	F25H5.4	<i>Elongation factor 2</i>	0005525	TL	94,8	6,1	6,8
	EEF-2						
23	ZK809.1	UC	0004725	PM	48,5	9,43	8,6
24	F15E11.1	UC	NI	U	17,4	6,04	40,1
25	F11G11.2	<i>Probable glutathione</i>	0005575	PM	23,1	6,3	18,9
	GST-7	<i>S- transferase 7</i>					
26	F59A2.6	<i>GOLGi associated coiled-coil</i>	0000042	NI	129,2	4,84	10,6
	GOLG-4	<i>protein homolog</i>	0005622				
27	Y59A8A.2	PHd Finger familiy	0008270	S	68,3	5,55	9,5
	PHF-14						
28	C16C10.3	UC	0002119	E	117,1	9,13	6,3
29	F21A10.1a	<i>Neuronal Calcium Sensor family</i>	0005509	S	25,9	7,13	14,3
	NCS-4						
30	F58D5.4b	<i>Kinase suppressor of RAS B</i>	0035556	Si	58,5	8,78	11,1
	KSR-2b						

U = Unbekannt, UC = Uncharakterisiert, M = Metabolismus, NI = Nicht identifiziert, S = Struktur, Si = Signaltransduktion, PM = Proteinmetabolismus, E = Entwicklung, TK = Transkription, TL = Translation, Fkt = Funktion, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, IP = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Nach ASP-2 *knock-down* konnten fünf strukturgebende Proteine identifiziert werden, die Tabelle 9 zu entnehmen sind. Das Protein Y59A8A.2 (PHF-14), welches vornehmlich ein Zink-Ionen-Bindungsprotein ist sowie zwei Proteine mit Calcium-Ionen-Bindungs-fähigkeit: F21A10.1a (NSC-4) und F09F7.2a.1 (MLC-3). Weiterhin wurde das Protein M03F4.2c (ACT-4) identifiziert, welches maßgeblich an der Aktinfilament-Bindung beteiligt ist sowie ein multifunktionales Protein Y105E8B.1a (LEV-11), welches unter anderem an der Organisation der Aktinfilamente, der Morphologie, Zytokinese, Larvenentwicklung, Bewegung und Regulation bezüglich der Proteinbindung beteiligt ist (Kagawa *et al.* 1995; Kagawa *et al.* 1997; Ono und Ono 2002; Dixon und Roy 2005; Gruninger *et al.* 2006).

Ergebnisse

Keiner Gruppe zugeordnet werden konnten die funktionell noch nicht charakterisierten Proteine C44C10.11.2, F15E11.1, F59A2.6, R11A5.3 und F58A6.2.

Am Proteinmetabolismus beteiligt sind: C07A12.4c (PDI-2), Y106G6A.1, mit ATP-Bindungsfähigkeit sowie Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität, ZK809.1, mit einer Tyrosin-Phosphatase-Aktivität sowie das Protein F11G11.2 (GST-7), welches wahrscheinlich eine Glutathion-Transferase-Aktivität besitzt.

Außerdem zu erwähnen ist das Protein PDI-2, welches sowohl eine biologische als auch eine molekulare Funktion aufweist. Es ist an der Zellhomöostase und metabolischen Prozessen des Glycerolethers beteiligt und besitzt Elektronentransportaktivität, Isomerase-Aktivität als auch eine Protein-Disulfid-Oxidoreduktase-Aktivität.

Auch das Protein K02F2.2.2 (AHCY-1), eine Adenosylhomozysteinase, hat eine besondere Funktion. Es ist ein kompetitiver Inhibitor von S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen Methyltransferase-Reaktionen. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass dieses Enzym eine Rolle in der Kontrolle von Methylierungen im Sinne einer Regulation der intrazellulären Konzentration von Adenosylhomozystein spielt (Prasad *et al.* 1993).

Proteine, die die Entwicklung von *C. elegans* beeinflussen, konnten ebenso identifiziert werden. F26D10.3.2 (HSP-1), ein Hitzeschockprotein der Familie 70, welches ATP-Bindung besitzt, F24G8.10a, C07A12.4b (PDI-2), dessen Funktion im Rahmen des Proteinmetabolismus Erwähnung findet und Y38A10A.5.1 (CRT-1), welches auf molekularer Ebene fungiert, indem es bei der Chaperon-Faltung über Calcium-Bindung agiert und im Calreticulin-/Calnexin-Zyklus eine Rolle spielt. Dieses Lektin, welches zur Gruppe der Careticulin Familie gehört, interagiert möglicherweise mit fast allen monoglukosylierten Glykoproteinen, welche im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden. Das Protein ist in verschiedene Domänen strukturiert: Eine Prolin-reiche P-Region, welche ein Calcium-Molekül mit hoher Affinität binden kann, eine säurereiche C-Region, welche wiederum verschiedenste Calcium-Ionen mit geringer Affinität bindet sowie eine Hauptregion (Park *et al.* 2001).

Letztlich bleibt das Protein C16C10.3 zu nennen, das wahrscheinlich am Wachstum und der Larvenentwicklung der Nematoden beteiligt sein könnte, jedoch nicht ausreichend charakterisiert ist. Das Protein F58D5.4b (KSR-2), spielt als einziges eine Rolle bei der Signaltransduktion. Das Protein KSR – auch bezeichnet als *Kinase Suppressor of Ras* – reguliert die Ras-Signaltransduktion. *C. elegans* exprimiert zwei Proteine, das KSR-1

und das KSR-2. Hierbei wird das KSR-1 lediglich für einen speziellen Ras-gesteuerten Prozess, dem der geschlechtlichen Myoblastenbewegung, benötigt. KSR-2 wird für die Ras-gesteuerte Signaltransduktion während der geschlechtlichen meiotischen Entwicklung benötigt und fungiert mit KSR-1 während der Entwicklung des exkretorischen Systems (Ohmachi *et al.* 2002). Bezüglich der biologischen Funktionen ist es am meiotischen Zellzyklus, an der Schwanzentwicklung und der Vulvaentwicklung beteiligt. Das Protein wirkt auch an verschiedenen molekularen Funktionen mit, unter anderem an der ATP- und Metall-Ionen-Bindung, es besitzt Protein- sowie Tyrosin-Kinase-Aktivität.

An der Translation beteiligt sind die Proteine F25H5.4.1(EEF-2) und F10C2.6 (DARS- 2). Ebenso konnten zwei Proteine dem Bereich der Transkription zugeordnet werden: Y32F6A.3 (PAP-1), F58A4.4 (PRI-1).

Ein sehr wichtiges Protein, welches an der Energiegewinnung beteiligt ist, ist das Protein H28O16.1d.4 (ATP-3). Es ist in der mitochondrialen Membran lokalisiert und produziert ATP aus ADP in der Gegenwart von einem Protonengradienten entlang der Membran, welcher durch den Elektronentransport-Komplex aus der Atmungskette entsteht. Die F-Typ ATPase beinhaltet zwei Strukturregionen, die F¹-Region enthält den extramembranösen katalytischen Kern und die F⁰-Region den Membran-Protonen-Kanal. Diese werden alle durch einen zentralen und peripheren Stiel zusammengehalten (Rassow *et al.* 2006).

Auch die Proteine F20B6.2.2 (VHA-12), C34E10.6.2 (ATP-2) und T01B11.4 (ANT-1.4) haben ähnliche Eigenschaften.

Tabelle 10: Identifizierte Proteine nach GalNAcT knock-down aus *C. elegans*.

Nr.	Protein	Name	GO	Fkt	Mw [kDa]	pI	SC [%]
1	M03F4.2c ACT-4	<i>Actin-4</i>	0000003	S	47,8	5,56	23,5
2	F54H12.6 EEF-1B.1	<i>Probable elongation factor I- beta/I-delta 1</i>	0003746	TL	22,7	4,38	17,8
3	Y41E3.10a.1 EEF-1B.1	<i>Probable elongation factor I- beta/I-delta 1</i>	0003746	TL	28,2	4,91	19,0
4	C07A12.4b PDI-2	<i>Protein disulfide isomerase-2</i>	0003756	PM	55,2	4,76	33,4
5	C29E4.14	UC	0005509	S	14,3	5,01	23,4
6	Y105E8B.1a LEV-11	<i>Tropomyosin isoforms a/b/d/f</i>	0007015	S	33,2	4,66	69,4
7	C36E6.5.2 MLC-2	<i>Myosin regulatory light chain 2</i>	0016459	S	18,6	5,06	34,7
8	B0454.9	UC	NI	U	40,4	5,57	14,9
9	F28E10.1a	UC	NI	U	126,5	8,83	15,1
10	C47E8.5.4 DAF-21	<i>Heat shock protein 90</i>	0040024	E CH	80,3	4,96	20,4
11	K03E5.2b	UC	NI	U	17,4	6,84	37,9
12	F13A2.3	UC	NI	U	36,7	8,7	12,1
13	C14F11.5 HSP-43	<i>Heat shock protein protein 43, isoform a</i>	0006950	CH	43,2	8,83	19,3
14	C06C6.7	UC	NI	U	104,6	9,37	8,7
15	K11C4.3a UNC-70	<i>Uncoordinated protein 70, isoform b</i>	0002119	E	267,3	5,29	9,1
16	Y51H1A.6 MCD-1	<i>Modifier of cell death</i>	0040007	E	102,6	9,04	28,9
17	B0454.9	UC	NI	U	40,4	5,57	18,1
18	F09E5.15 PDRX-2	<i>Peroxiredoxin protein 2, isoform a</i>	0016209	M	21,8	5,53	33,3
19	K02F2.2.2 ACHY-1	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	0004013	PM	47,5	5,85	13,0
20	F19B10.3	UC	NI	U	7,2	5,19	81,3
21	F09F7.2a.1 MLC-3	<i>Myosin light chain protein 3, isoform b</i>	0005550 9	S	10,2	4,61	76,5
22	Y57G11C.7	UC	NI	U	29,19	8,81	30,2
23	H28O16.1	<i>ATP synthase subunit protein 3,</i>	0015986	M	24,9	8,89	27,0

Ergebnisse

	ATP-3	<i>isoform b</i>					
24	C07H6.5.2 CGH-1	<i>ATP-dependent RNA helicase</i>	0006916	E	48,7	8,27	21,4
25	C27H6.8.2	UPF0160 Protein C27H6.8	NI	U	38,5	5,48	17,6
26	C09D1.1a UNC-89	<i>Muscle M-line assembly protein</i>	0030241	S	894,3	5,42	2,7
27	W02D3.5.2 LBP-2	<i>Fatty acid-binding protein homolog 2</i>	NI	M	18,8	6,76	68,9
28	ZC196.4	UC	NI	U	59,1	5,07	12,8
29	F48G7.5	UC	0000003	E	21,4	8,31	35,5
30	Y105E8A.17 EKL-4	UC	0045892	TK	55,8	9,41	10,1
31	ZK632.9	UC	NI	U	6,6	9,22	48,4
32	C06H2.1.1 ATP-5	<i>ATP synthase subunit</i>	0015986	M	21,8	6,66	42,9
33	R03G5.1d EFT-4	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	0003746	TL	50,7	9,12	20,7
34	B0432.4 MISC-1	<i>Mitochondrial solute carrier protein 1</i>	0006810	TR	33,3	9,78	20,6

UC = Uncharaterisiert, U = Unbekannt, M = Metabolismus, NI = Nicht identifiziert, S = Struktur, Si = Signaltransduktion, PM = Proteinmetabolismus, E = Entwicklung, TK = Transkription, TL = Translation, TR = Transport, CH = Chaperon, Fkt = Funktion, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, IP = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Tabelle 10 führt die identifizierten strukturgebenden Proteine auf. Dabei spielt das Protein M03F4.2c (ACT-4), welches der Aktin-Familie zugehörig ist, eine besondere Rolle, indem es durch seine hoch konservierte Proteinform in verschiedenen Typen von Zellbewegungen involviert ist und in allen eukaryontischen Zellen vorkommt (Krause *et al.* 1989; Files *et al.* 1983). Es ist im Zytoskelett lokalisiert (Krause *et al.* 1989).

In *C. elegans* kodieren vier Gene für Aktine. Die Sequenzen, die durch die Gene 1 und 3 kodiert werden, sind identisch. In den Genen 2 und 4 sind variable Sequenzen hinsichtlich der Kodierung des Aktins enthalten. Als Ligand ist es für die ATP- und die Nukleotid-Bindung verantwortlich. Außerdem ist es in eine Reihe von biologischen Prozessen involviert, wie z.B. an der Reproduktion, der Embryonal- und Nematodenentwicklung, der Zytokinese, der Zellwanderung oder als Bestandteil der gestreiften Muskulatur im Sinne eines Aktinfilamentes (Krause *et al.* 1989).

Ergebnisse

Aus der Familie der Myosin-Proteine wurden die Proteine C36E6.5.2 (MLC-2) und F09F7.2a.1 (MLC-3) identifiziert. Myosin ist ein Hexamer bestehend aus zwei schweren und vier leichten Ketten, davon wiederum zwei regulatorische leichte Ketten und zwei leichte Hauptketten. Die Funktion dieser Ketten ist die Bindung von Calcium-Ionen als Liganden. Somit dient es auf molekularer Ebene als Motorprotein (Cummins und Anderson 1988). Das Protein C29E4.14 besitzt ebenso Calcium-Ionen-Bindungsfähigkeit. Das *Levamisole resistant protein 11*, Y105E8B.1a (LEV-11), gehört ebenso der Gruppe der Strukturproteine an, indem es als Tropomyosin, in Verbindung mit dem Troponin-Komplex, eine zentrale Rolle in der Calcium-abhängigen Regulation der Muskelkontraktion spielt. Zudem ist es in der Organisation der Aktinfilamente in der Muskulatur als auch an der Morphologie sowie Muskelausdehnung beteiligt. Weiterhin spielt es eine Rolle im männlichen Paarungsverhalten indem es die Bindeglieder reguliert. Letztlich bindet es das Protein F-Aktin C09D1.1a (UNC-89). Es ist im Zytoplasma lokalisiert. Die Isoformen a und d kommen in der Vulva, der Muskulatur des Anus, in männlicher Muskulatur im Schwanzbereich als auch in der Muskulatur der Körperwand vor. Außerdem sind sie in Myofibrillen von dünnen Aktinfilamenten lokalisiert (Kagawa *et al.* 1995; Kagawa *et al.* 1997; Ono und Ono 2002; Gruninger *et al.* 2006; Friend *et al.* 2012).

Funktionell nicht zugeordnet werden konnten folgende Proteine: ZK632.9, ZC196.4, C27H6.8.2, Y57G11C.7, F19B10.3, B0454.9, C06C6.7, F13A2.3, K03E5.2b, F28E10.1a und B0454.9.

Als einziges Transportprotein wurde B0432.4 (MISC-1) identifiziert. Es wird zu der Familie der mitochondrialen Transporter gezählt. Als integrales Membranprotein dient es dem Transport von Proteinen durch die Mitochondrienmembran (Gallo *et al.* 2011).

An der Translation sind die Proteine R03G5.1d (EFT-4), Y41E3.10a.1 und F54H12.6 beteiligt. Das Gen EFT-4 ist Bestandteil des Proteins mit dem Namen Elongationsfaktor 1-alpha und ist im Zytoplasma lokalisiert. Es ist gleichzeitig an biologischen als auch an molekulargenetischen Prozessen beteiligt. Es begünstigt die GTP-abhängige Bindung von Aminoacyl-tRNA an die A-Seite von Ribosomen während der Proteinbiosynthese. Somit wird es auch der Familie der GTP-bindenden Elongationsfaktoren zugeordnet und gehört zu der Unterfamilie der EF-Tu/EF-1A. Demnach besitzt es GTP- und Nukleotid-Bindungsfähigkeit (Krab und Parmeggiani 2002). Ergänzend ist es auch an einer Reihe anderer Prozesse beteiligt. Es wirkt an Prozessen wie der Apoptose (Green

et al. 2011), an der Embryonalentwicklung (Gönczy *et al.* 2000; Sönnichsen *et al.* 2005), an der Gametengeneration (Maruyama *et al.* 2005) sowie Wachstum (Piano *et al.* 2000; Rual *et al.* 2004) und der Larvenentwicklung (Hansen *et al.* 2005) mit. Außerdem hat es eine positive Auswirkung auf die Regulation der Wachstumsrate (Kamath und Ahringer 2003).

Metabolische Funktionen konnten den Proteinen C06H2.1.1 (ATP-5), H28O16.1d.4 (ATP-3), F09E5.15a.1 (PDRX-2) und W02D3.5.2 (LBP-2) zugewiesen werden.

Das Protein ATP-5 ist am ATP-vermittelten Protonentransport beteiligt. Es determiniert hierbei die Lebensspanne der adulten Nematoden von *C. elegans* (Kamath, Fraser *et al.* 2003). Ebenso ist es an der Embryonalentwicklung, der Larvenentwicklung der Nematoden (Maeda *et al.* 2001; Simmer *et al.* 2003) und am Wachstum (Sönnichsen *et al.* 2005; Fraser *et al.* 2000) beteiligt.

Ebenso wurde eine mitochondriale Untereinheit der ATP-Synthase identifiziert. Das Protein H28O16.1d.4 (ATP-3) fungiert als ATP-Synthase, die als Enzymkomplex in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist. Sie katalysiert die Bildung von ATP in Anwesenheit eines Protonengradienten entlang der Mitochondrienmembran. Dieser Prozess wird durch einen Elektronentransportkomplex der Atmungskette gebildet. Die ATP-Synthase besteht aus vier Komponenten: Dem F^0 -Teil, dem Stiel, dem F^1 -Teil und dem Stator. Beim F^0 -Teil ist der Rotor die entscheidende Komponente; er besteht aus ca. zwölf kreisförmig angeordneten c-Untereinheiten und einer α -Untereinheit. Der F^1 -Teil besteht aus drei α - und drei β -Untereinheiten, die einen Ring um die γ -Untereinheit bilden. Je eine α - und β -Untereinheit bilden ein katalytisches Zentrum. Während der Katalyse ist die ATP-Synthase in der katalytischen Domäne von F^1 durch einen rotatorischen Mechanismus von Untereinheiten der zentralen Verbindungseinheit an die Protonentranslokation gekoppelt. Die Untereinheiten α und β stammen aus denen des Kerns in F^1 . Die Rotation der zentralen Verbindungseinheit gegen die umgebenden $\alpha\beta\beta_3$ -Untereinheiten führt zu einer Bildung von ATP in drei separate katalytische Seiten an der β -Untereinheit (Rassow *et al.* 2006). Die Inhibierung der ATP-3 Expression vermag in herangewachsenen Würmern die Lebensdauer zu verlängern. Man geht davon aus, dass dieses Protein auch noch in der späten Entwicklungsphase aktiv synthetisiert wird (Dillin *et al.* 2002).

Das Protein Y105E8A.17a (EKL-4) konnte als einziges der Transkription zugeordnet werden. Es ist im Kern lokalisiert und wirkt an einer Reihe von biologischen Prozessen

mit. Darunter fallen die Embryonalentwicklung (Ceron *et al.* 2007; Cui *et al.* 2006; Fraser *et al.* 2000), die Gastrulation (Simmer *et al.* 2003), die Genitalentwicklung der Hermaphroditen (Balklava *et al.* 2007) und die Bewegung (Navarro *et al.* 2001). Weiterhin hat das Protein eine negative DNA-abhängige Wirkung auf die Transkription und die Vulvaentwicklung (Boag *et al.* 2005) sowie einen positiven Effekt auf die Wachstumsrate (Birnby *et al.* 2000). Letztlich spielt es eine Rolle in der rezeptorvermittelten Endozytose (Inoue *et al.* 2003).

Bezüglich der Entwicklung von *C. elegans* wurden mehrere Proteine identifiziert. Darunter das Protein F48G7.5, welches an der Oogenese beteiligt ist (Maruyama *et al.* 2005), sowie C07H6.5.2 (CGH-1), eine ATP-abhängige RNA-Helikase. Vermutlich wird die RNA-Helikase für die Funktion der Oozyten und Spermien benötigt. Sie wird auch dafür benötigt, um die physiologische Apoptosemechanismen der Keimbahnen zu verhindern, indem alle sich in der Entwicklung befindlichen Oozyten, abgetötet werden. Dieses Protein ist ebenso gewebespezifisch. Seine Expression ist auf zwei Keimbahnen begrenzt, Vorstadium Z2 und Z3 im L1-Stadium der Hermaphroditen. Es ist zu geringen Anteilen speziell in den Gonaden im L3-Stadium auffindbar. Während des frühen L4- Stadiums ist die Expression signifikant höher. In adulten Würmern bleibt die Expression gonadenspezifisch (Inoue *et al.* 2006).

Weitere Proteine, die an der Entwicklung beteiligt sind, sind das Protein Y51H1A.6b (MCD-1), das ein intrazellulär gelegenes Protein mit Zink-Ionen-Bindungsfähigkeit ist, K11C4.3a (UNC-70), ein Aktin-Ligand und C47E8.5.4 (DAF-21), das zur Familie der Hitzeschockproteine gezählt wird. DAF-21 ist ein molekulares Chaperon, das die Reifung, die strukturellen Reparaturmechanismen und die angemessene Regulation von spezifischen Zielproteinen, die in der Zellzykluskontrolle und der Signaltransduktion beteiligt sind, begünstigt. Es unterliegt einem funktionellen Zyklus, der an ATPase-Aktivität gebunden ist. Dieser Zyklus erzeugt wahrscheinlich Konformationsänderungen in den Proteinen und löst daher ihre Aktivierung aus. Weiterhin interagiert es dynamisch mit verschiedensten Co-Chaperonen, welche die Substraterkennung, den ATPase-Zyklus und die Chaperon-Funktion modulieren (Inoue *et al.* 2006). Weiterhin wird es für die Stabilisierung des Proteins DAF-11, einer transmembranen Guanylylcyclase, oder anderer Komponenten der Signaltransduktion, die cGMP-Level regulieren, benötigt. DAF-21 reguliert indirekt die meiotische Transition von der Prophase zur Metaphase während der Oozytenentwicklung durch

Ergebnisse

Sicherstellung der regulären Funktion und Aktivität der WEE-1.3-Kinase – eine Membran-assoziierte Tyrosin- und Threonin-unspezifische *cdc2-inhibitory kinase* (Inoue *et al.* 2006). Diese hat durch ihre Phosphorylierung eine negative Wirkungsweise auf die CDK-1 (Birnby *et al.* 2000).

Das Protein DAF-21 ist in der perinukleären Region somatischer Zellen lokalisiert (Inoue *et al.* 2003; Inoue *et al.* 2006). Das Protein kodiert das Hitzeschockprotein HSP-90 – ein Chaperon mit einer Vielzahl an spezifischen Proteinzielen (Birnby *et al.* 2000). Während des Embryonalstadiums wird es gehäuft in Zellen der Kopfregeion aufgefunden. In frühen Larvenstadien wird es unter normalen Umständen in postembryonalen Keimzellen von Z2- und Z3-Zellen und in der Kopfregeion aufgefunden, sowohl in Hermaphroditen als auch in männlichen Larven. Unter Hitzeeinwirkung konnten die Proteine bezogen auf die Expression im Larvenstadium nicht nur in den Keimzellen, sondern auch in anderen Zellen nachgewiesen werden (Inoue *et al.* 2003). Auch dem Protein C14F11.5 (HSP-43) konnte die Funktion eines Chaperons zugeordnet werden.

Als Proteine, die eine Rolle im Proteinmetabolismus spielen, konnte das Protein K02F2.2.2 (AHCY-1), eine Adenosylhomocysteinase, identifiziert werden. Adenosylhomocystein ist ein kompetitiver Inhibitor der S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen Methyltransferase-Reaktion. Demnach könnte die Adenosylhomocysteinase eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Methylierung durch Regulation der intrazellulären Konzentration von Adenosylhomocystein innehaben.

Letztlich wurde das Protein C07A12.4b (PDI-2) identifiziert, das einer Proteindisulfidisomerase entspricht. PDI-2 vermag ebenso wie PDI-1 und PDI-3 ähnliche Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen in einem Substrat zu katalysieren und kann die Faltung einer Polypeptidkette auf verschiedene Faltungsarten steuern und daher verschiedene Funktionen in einem Organismus erfüllen (Karala *et al.* 2007).

Tabelle 11: Identifizierte Proteine aus der RNAi-Kontrolle von *C. elegans*.

Nr.	Protein	Name	GO	Fkt	Mw [kDa]	pI	SC [%]
1	R10E11.1 CBP-1	Protein CBP-1	0006355	TR	227,2	8,63	4,9
2	F56C9.6a	UC	NI	U	37,1	6,85	16,1
3	F02A9.6 GLP-1	Protein GLP-1	0016020	S	144,1	5,45	7,7
4	C25A8.4 CHT-3	<i>Chitinase-like protein C25A8.4</i>	0006032	M	120,2	7,96	9,1
5	Y105E8B.1a LEV-11 TMY-1	<i>Levamisole resistant protein 11</i> <i>Tropomyosin isoform 1</i>	0005515	S	33,0	4,66	48,3
6	Y57G11C.9	UC	NI	U	9,2	9,3	48,6
7	C16C8.13	UC	NI	U	28,7	6,19	55,8
8	Y59A8A.2 PHF-14	<i>Phd Finger family</i>	0008270	S	68,0	5,55	29,9
9	F18C5.3 UTP-20	<i>UTP small subunit (SSU)</i> <i>processome component</i> <i>homolog</i>	0005488	S	186,5	8,3	10,5
10	Y49A3A.2.2 VHA-13	<i>V-type proton ATPase catalytic</i> <i>subunit A</i>	0015991	PM	66,5	5,08	13,2
11	Y105C5A.26	UC	0015986	U	5,9	6,02	88,9
12	F59F3.5 VER-4	<i>Tyrosine-protein kinase</i> <i>receptor ver-4</i>	0004713	PM	140,8	8,3	5,4
13	M01A8.2a CLIP-1	<i>CAP-Gly domain-containing</i> <i>linker protein 1 homolog</i>	NI	U	104,7	7,08	11,1
14	F46C3.3b HUM-4	<i>Heavy chain, Unconventional</i> <i>Myosin</i>	00016495	S	296,5	6,95	5,4
15	F38B7.5 DUO-1	<i>Deubiquitylating with</i> <i>USP/UBP and OTU domains</i>	0004221	PM	93,9	6,47	18,1
16	C06A12.4a GCY-27	<i>Receptor-type guanylate</i> <i>cyclase gcy-27</i>	0009190	Si	84,9	6,18	15,2
17	M01D1.2 MATH-34	<i>MATH (Meprin-associated Traf</i> <i>homology) domain containing</i>	NI	TR	87,1	5,32	34,2
18	M01E11.4b PQN-52	<i>Prion-like-(Q/N-rich)-domain-</i> <i>bearing protein</i>	NI	TK	28,7	8,52	28,6
19	D2030.3	UC	0002119	E	56,6	7,15	14,0
20	F52H3.1.1	<i>Procollagen-lysine, 2-oxogluta-</i>	0002009	E	84,4	5,14	18,1

Ergebnisse

	LET-268	<i>rate 5-dioxygenase</i>					
21	R07C3.7 FBXC-29	<i>F-box C protein</i>	NI	U	46,9	7,75	22,6
22	Y105C5A DAF-38	<i>G-protein coupled receptor daf-38</i>	NI	U	8,2	8,31	96,3
23	F58A4.4 PRI-1	<i>DNA primase small subunit</i>	0006269	TK	48,9	8,36	20,9
24	W10G11.20 DNC-3	<i>DyNactin Complex component</i>	NI	U	20,1	4,83	33,9
25	M03F4.2c ACT-4	<i>Actin-4</i>	0000003	S	41,8	5,56	37,6
26	Y116F11b.11	UC	NI	U	58,2	6,54	18,0
27	F20G4.1 SMGL-1	UC	NI	Si	184,8	5,13	7,8
28	T26C5.5.2	UC	0009792	E	12,4	8,44	39,6
29	ZK381.4b PGL-1	<i>P granule abnormality protein I</i>	00030154	E	78,5	5	12,6
30	R06C7.1 WAGO-1	<i>Argonaute protein wago-1</i>	0007275	E	105,3	8,69	17,2
31	C09D1.1b UNC-89	<i>Muscle M-line assembly protein UNC-89</i>	0030241	S	894,4	5,42	3,2
32	F48B9.1 CRB-GAP-1	UC	NI	U	60,9	4,88	19,9
33	C02F12.7 TAG-278	<i>Putative protein TAG-278</i>	NI	U	131,5	5,46	18,8
34	Y42A5A.4 CDKL-1	<i>Cyclin-Dependent Kinase-Like</i>	0004674	PM	40,7	8,83	18,9
35	F41G3.3	UC	NI	U	65,7	7,03	13,9
36	Y17G7B.10	<i>NAD kinase 2, mitochondrial</i>	NI	U	55,38	8,3	21,7
37	R07E4.1b	UC	0007165	Si	113,5	7,13	9,6
38	Y37D8A.4	UC	0005515	U	26,3	9,81	17,6
39	Y73B6B1.38 PUF-11	<i>PUF (Pumilio/FBF) domain-containing</i>	0009792	E	57,1	6,09	23,6
40	F39G3.1 UGT-61	<i>UDP-glucuronosyltransferase</i>	0008152	M	59,5	8,96	16,9
41	T07D3.7b.1 ALG-2	<i>Argonaute (Plant)-like gene protein 2, isoform a</i>	0008340	E	101,7	9,17	12,0
42	Y71H2AM.1.1	<i>Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase</i>	0008340	E	36,7	8,42	25,2
43	ZK563.7	UC	0008340	E	40,3	7	22,1

Ergebnisse

44	ZK1320.1 GSTK-1	<i>Glutathione S-Transferase kappa 1</i>	004364	M	26,5	8,9	37,6
45	Y45F10D.4	UC	009792	E	16,9	8,83	45,1
46	K09F5.2 VIT-1	Vitellogenin-1	0005319	M	188,1	6,46	9,4
47	Y41C4A.9.1	UC	0040010	U	66,7	6,72	15,1
48	Y48E1A.1a RPOA-1	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit</i>	0006351	TK	195,1	8,23	6,6
49	C10E2.2.1	UC	0004842	PM	58,01	7,04	12,1 7
50	F34H10.1	<i>Probable ribosomal protein F34H10.1</i>	00007411 00040010	S E	15,9	9,67	25,4
51	K08C9.7	UC	00007411 00040010	S E	17,7	10,26	28,6
52	E01A2.2a.1	<i>Serrate RNA effector molecule homolog</i>	0031053	TL	80,8	5,43	13,9
53	T25C8.2.1 ACT-5	<i>Actin-5</i>	0009792 0035148 0040007	E S W	41,8	5,44	19,4
54	F55C7.7b UNC-73	<i>Guanine nucleotide exchange factor UNC-73B</i>	0008782	Si	282,9	6,18	39,7
55	F53F1.3	UC	0055114	M	32,5	7,11	10,6
56	F58G4.1 MYO-5	<i>MYOsin heavy chain structural genes</i>	0005524	S	227,0	5,9	11,3
57	F46C3.3b HUM-4	<i>Heavy chain, Unconventional Myosin</i>	0005524	S	296,4	6,95	13,9
58	T12C9.5a NHR-109	<i>Nuclear Hormone Receptor family</i>	0003677	Si	64,7	5,86	20,4
59	C06H2.1.1 ATP-5	<i>ATP-Synthase subunit</i>	0000276 0040010	M E	21,9	6,66	33,0
60	W06H3.2b PUS-1	<i>PseudoUridine Synthase family</i>	0009541	TL	47,2	4,58	21,9
61	F31E3.3 RFC-4	<i>Replication factor C subunit 4</i>	0006260	TK	37,7	6,47	21,3

UC = Uncharakterisiert, U = Unbekannt, M = Metabolismus, NI = Nicht identifiziert, S = Struktur, Si = Signaltransduktion, PM = Proteinmetabolismus, E = Entwicklung, TK = Transkription, TL = Translation, TR = Transport, W = Wachstum, Fkt = Funktion, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, IP = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Ergebnisse

Folgende Proteine aus Tabelle 11, die in dem Versuch identifiziert wurden, konnten ihrer Funktion nach der Transkription zugewiesen werden: F31E3.3 (RFC-4), Y48E1A.1a (RPOA-1), F58A4.4 (PRI-1), M01E11.4b (PQN-52) und R10E11.1 (CPB-1).

RFC-4, ein Replikationsfaktor der Untereinheit C-4, könnte bei der Elongation von geprimten DNA-Stücken involviert sein. Die Elongation von geprimten DNA-Stücken durch die DNA-Polymerase delta und epsilon benötigt die Aktivität von zusätzlichen Proteinen PCNA und Aktivator 1. Ebenso spielt der Replikationsfaktor eine Rolle in der Zytokinese, der Reproduktion und hat eine positive Auswirkung auf die S-Phase mitotischer Zellen und die Wachstumsrate (Boulton *et al.* 2001). Das Protein Y48E1A.1a (RPOA-1), lokalisiert im Kern, ist eine DNA-gesteuerte RNA-Polymerase, welche biologisch gesehen an der DNA-abhängigen Transkription beteiligt ist und molekulare Funktionen im Sinne von DNA-, Zink- und DNA-gesteuerter RNA-Bindung erfüllt. Das PRI-1 ist eine kleine Untereinheit der DNA-Primase, welche eine Polymerase ist, die kleine RNA-Primer für die Okazaki-Fragmente während der diskontinuierlichen DNA-Replikation synthetisiert. Sie gehört der Familie der eukaryontischen Primasen der kleinen Untereinheit an. Das Protein CBP-1 spielt eine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen wie zum Beispiel der Embryonalentwicklung von *C. elegans*, der positiven Regulation der Transkription des RNA-Polymerase II Promoters und der Spermatogenese. Es ist im Zytoplasma sowie im Kern lokalisiert und besitzt Histon- als auch Lysin-N-Acetyltransferase-Aktivität. CBP-1 könnte dem Ras-Signalweg nachgeschaltet sein und im Zusammenspiel mit LIN-1 agieren (Eastburn und Han 2005).

An der Translation waren lediglich zwei Proteine beteiligt: W06H3.2b (PUS-1), welches an der Pseudouridin-Synthese beteiligt ist, sowie das Protein E01A2.2a.1, welches RNA-Effektormoleküle miteinander verzahnt und als Bindeglied zwischen dem CBC-Komplexes (*cap-binding-complex*) und der micro-RNA (miRNA) dient. Es leistet einen Beitrag zur Stabilität und der Anlieferung mit primärer miRNA. Das Protein ist im Kern lokalisiert und gehört der ARS2-Familie an.

Am Metabolismus beteiligt sind die Proteine: C06H2.1.1 (ATP-5), das am ATP-gebundenen Protonentransport beteiligt ist, in dem es hydrogene Ionen-Transportaktivität besitzt und Protein F53F1.3, das Oxidoreduktase-Aktivität besitzt. Weiterhin das Protein K09F5.2 (VIT-1), welches sezerniert wird. Vitogellin-1 ist ein

Speicherprotein und Vorstufe der Eigelb-Proteine, welche wichtige Nährstoffe, die während der Embryonalentwicklung notwendig sind, enthalten. Somit besitzt es Transportaktivität für Lipide und nahrhafte Reservoirs. Die Glutathion-S-Transferase Kappa 1 (GSTK-1) oder ZK1320.1, ist in den Peroxisomen lokalisiert und besitzt Glutathion- als auch Disulfid-Oxidoreduktase-Aktivität. Letztlich sind noch das Proteine F39G3.1 (UGT-61) als Glykosyltransferase und die Chitinase C25A8.4 zu nennen.

Folgenden Proteinen konnten entwicklungsspezifische Funktionen zugewiesen werden: K08C9.7, C06H2.1.1 (ATP-5), eine ATPase, T25C8.2.1 (ACT-5), ein im Zytoskelett und apikalen Kortex lokalisiertes Protein, welches an der Larvenentwicklung und der Tubenformation beteiligt ist. Weiterhin besitzt es molekulare Funktionen wie die ATP-Bindung. Das Protein F34H10.1, ein ribosomales Protein, Y41C4A.9.1, das im Kern lokalisiert ist, Y45F10D.4, das Eisen-Ionen binden kann, ZK563.7 (APY-1), welches wiederum Calcium-Ionen bindet, und viele weitere wie Y71H2AM.1.1, T07D3.7b.1 (ALG-2), mit miRNA-Bindungsfunktion, Y73B6Bl.38 (PUF-11), mit RNA-Bindungsfunktion, R06C7.1 (WAGO-1), ZK381.4b (PGL-1), welches für die P-Granulat-Organisation zuständig ist, T26C5.5.2, D2030.3 und letztlich die Prokollagen-Lysin 2-Oxoglutarat 5-Dioxygenase F52H3.1.1 (LET-268). Letzteres wird auch als Letales Protein 268 oder Lysyl-Hydroxylase bezeichnet. Die Lysyl-Hydroxylase wandelt Hydroxylysin-Reste zu Kollagen Typ IV um (Norman und Moemann 2000; Kaji *et al.* 2003, 2007).

An der Signaltransduktion beteiligt sind folgende identifizierte Proteine: T12C9.5a (NHR-109), F55C7.7b (UNC-73), R07E4.1b, F20G4.1 (SMGL-1), C06A12.4a (GCY-27). Das Protein NHR-109 ist ein *nuclear hormone receptor family* Protein und ist im Kern lokalisiert. Es besitzt Steroidhormon-Rezeptor-Aktivität sowie sequenzspezifische DNA-bindende Transkriptionsfaktor-Aktivität. Ein sehr bedeutendes Protein ist das UNC-73, welches an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie zum Beispiel in der Embryonalentwicklung, der männlichen Geschlechtsentwicklung, der mesodermalen Zellentwicklung, der Larvenentwicklung der Nematoden, der Neuronenwanderung und der Vulvaentwicklung beteiligt ist. Es ist sowohl im Axon, Zytoplasma als auch in Muskelzellen lokalisiert und besitzt Phospholipid-Bindungsfähigkeit (Steven *et al.* 1998). UNC-73 wird für die Zellmigration und die axonale Lenkung in *C. elegans* benötigt. UNC-73A beinhaltet acht Spektrin-ähnliche

repeats, ein *Dbl/Pleckstrin homology* (DH/PH)- Element, eine SH3-ähnliche Region, eine zweites DH/PH-Element, eine Immunglobulin-Region und eine Fibronectin Typ III-Region. UNC-73B unterbricht die Abwärtsbewegung der SH3-ähnlichen Region. Das erste DH/PH-Element aktiviert spezifisch die Rac-GTPase *in vitro* und stimuliert die Aktinpolymerisation, wenn es in RAT-2 Zellen exprimiert wird. UNC-73 verhält sich zellunabhängig in einem Proteinkomplex, um die Aktindynamik während der Zell- und Wachstumskegelmigration zu regulieren (Steven *et al.* 1998). Abschließend zu nennen ist das Protein C06A12.4a (GCY-27) mit Kinase-Aktivität.

Es konnten zwölf Strukturproteine identifiziert werden: F46C3.3b (HUM-4), welches ein Strukturbaustein des Zytoskeletts ist, F58G4.1 (MYO-5), T25C8.2.1 (ACT-5), K08C9.7, F34H10.1, ein ribosomales Protein der Familie S27Ae, C09D1.1b (UNC-9), M03F4.2c (ACT-4), F46C3.3b (HUM-4), das Bestandteil des Zytoskeletts ist, F18C5.3 (UTP-20), Y59A8A.2 (PHF-14), ein Zink-Finger-Protein, Y105E8B.1a (LEV-11) und F02A9.6 (GLP-1, EMB-33).

Das Protein Myoglobin-5 (MYO-5) hat mehrere Bindungsstellen: Eine ATP- und eine Aktin-Bindungsstelle. Es ist zellulärer Bestandteil im apikalen Kortex sowie im Zytoskelett (Macqueen *et al.* 2005). Bezüglich seiner molekularen Eigenschaften besitzt Myoglobin die Eigenschaft eines Motorproteins und ist als zelluläre Komponente im Myosin-Komplex beteiligt. Ebenfalls eine ATP- sowie Nukleotid-Bindungsstelle weist das Protein ACT-5 auf. Es erfüllt darüber hinaus auch biologische Funktionen wie Beteiligung an der Larvenentwicklung von *C. elegans* als auch die Tubenbildung (Willis *et al.* 2006).

Das Protein C09D1.1b (UNC-89) ist ein Protein, welches gewebespezifisch ist. Es ist eine strukturelle Komponente der M-Linie der Muskelzelle. Die Vernetzung der Myofilamente beginnt mit einer Positionierung zur Basalmembran und Muskelzellmembran. Das Protein UNC-89 antwortet auf diese Signale, lokalisiert diese und trägt schließlich zur Bildung der M-Linie bei. Es ist in der Mitte einer A-Bande lokalisiert und die Expression des Proteins wurde in der Körperwand, im Pharynxmuskel und in einigen Muskelzellen des Schwanzes von *C. elegans* nachgewiesen (Benian *et al.* 1996; Blomberg, Baraldi *et al.* 2000). Es fungiert als Proteinkinase, Muskelprotein, Transferase und zeigt Aktivität gegenüber spezifischen kleinen GTPasen der Rho-Familie. Die *Dbl/Pleckstrin homology* (DH-PH) Region von UNC-89 hat Austausch-Aktivität für RHO-1 (*C. elegans* RhoA). Die DH-Domäne hat

ähnliche Aktivität für RHO-1. In einem *in vitro binding assay* konnte die Interaktion zwischen der DH-PH Region von UNC-89 und jeder einzelnen der *C. elegans* Rho-GTPasen gezeigt werden. Der partielle *knock-down* von RHO-1 in adulten Würmern von *C. elegans* zeigte eine Form der Desorganisation der dicken Myosinfilamente. Möglicherweise aktiviert die DH-PH Region von UNC-89 die RHO-1 GTPase sowie die Organisation der Myosinfilamente in *C. elegans* Muskelzellen (Qadota, Blangy *et al.* 2008).

Als ähnliches Protein gehört das ACT-4 der Familie der Aktine an. Es ist zelluläre Komponente des Zytoplasmas sowie des Zytoskeletts und weist sowohl ATP- als auch Nukleotid-Bindungen auf. Biologisch gesehen wirkt es an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts mit sowie an dem dünnen Filament der gestreiften Skelettmuskulatur (Krause *et al.* 1989; Sarov *et al.* 2012).

Das Protein LEV-11, oder auch das "Levamisole resistant protein 11", gehört der Familie der Tropomyosine an und wird in die Unterformen a, b, d, und f unterteilt. Tropomyosin spielt eine zentrale Rolle in der Calcium-abhängigen Steuerung der Muskelkontraktion. Dabei steht es in engem Zusammenhang mit dem Troponin-Komplex. Durch Bindung an das F-Aktin ist es an der Organisation der Aktin-Muskelfilamente sowie an der Muskelarmverlängerung und Morphologie beteiligt. Weiterhin spielt es eine Rolle im männlichen Paarungsverhalten durch Regulation der geschlechtlichen Fortpflanzungsorgane (Kagawa *et al.* 1997; Ono und Ono 2002; Dixon und Roy 2005; Gruninger *et al.* 2006). Es ist im Zytoplasma lokalisiert, wobei die Untereinheiten a und d in den Körperwand-Muskelzellen, der Vulva, den Analmuskeln und den Muskeln des männlichen Schwanzes exprimiert werden (Ono und Ono 2002). Die Würmer mit dem Gen für das Protein LEV-11 besitzen eine ca. 50-75%ige embryonale Letalität. Diejenigen, die überleben, tragen eine unnatürliche Körperform und eingeschränkte Beweglichkeit davon, andere einen deformierten Pharynx oder Magenregion (Gruninger *et al.* 2006). Erwähnenswert ist der negative Einfluss auf die Aktin-Depolymerisation (Yamashiro *et al.* 2008).

Letztlich ist das Protein GLP-1 zu erwähnen, welches einen besonderen Stellenwert in der Differenzierung von Zellen besitzt. Es ist an der Präzisierung der Zellentwicklung von Blastomeren beteiligt. Das Protein GLP-1 leistet weiter einen Beitrag zur Anlage des dorso-ventralen Achsenskeletts in frühen Embryonalstadien (Roehl und Kimbel 1993; Mello *et al.* 1994). Es ist zellulärer Bestandteil der lateralen Plasmamembran

sowie des endomembranösen Systems (Lin *et al.* 1995), der Integralmembran und des Zytoplasmas (Crittenden *et al.* 1997).

Letztlich sind die Proteine, welche am Proteinmetabolismus beteiligt sind, aufzuführen: C10E2.2.1, ein Zink-Ionen bindendes Protein, Y42A5A.4 (CDKL-1), welches Serin-Threonin-Kinase-Aktivität besitzt, F38B7.5 (DUO-1), mit Ubiquitin-Thioesterase-Aktivität, F59F3.5 (VER-4) und Y49A3A.2.2 (VHA-13).

Das Protein VER-4 ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die möglicherweise in die Herabregulierung von PVF-1 involviert ist. Alternativ wird das Protein auch als *Vascular endothelial growth factor receptor related 4* bezeichnet und ist integral zur Plasmamembran lokalisiert. Das Protein VHA-13 ist die katalytische Untereinheit des peripheren V1 Komplexes der vakuolaren ATPase. Durch die Protonentransport-Aktivität und einen Rotationsmechanismus reguliert die ATPase die Ansäuerung einer Vielzahl interzellulärer Kompartimente in eukaryontischen Zellen.

Folgende Proteine konnten keiner Funktion zugeordnet werden: Y37D8A.4, Y17G7B.10a/b, F41G3.3, C02F12.7 (TAG-278), F48B9.1 (CRB-GAB-1), C16C8.13, Y116F11b.11, W10G11.20.2 (DNC-3), Y105C5A (DAF-38), R07C3.7 (FBXC-29), M01A8.2a (CLIP-1), Y105C5A.26, Y57G11C.9c.2 und das Protein F56C9.6a.

3.5 Vergleich der Sekretome

Insgesamt wurden 38 ES-Proteine von *C. elegans* identifiziert, welche der Tabelle 1 im Anhang zu entnehmen sind. Aus diesen identifizierten Proteinen wurden selektiv drei Proteine für die RNAi-Versuche ausgewählt, die ASP-2, ASP-6 und die GalNAcT (GLY-10).

Alle identifizierten Proteine wurden entsprechend ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt: Struktur, Metabolismus, Signaltransduktion, Energie- und Redoxstoffwechsel, Proteinstoffwechsel, Chaperone, Proteinsynthese (Transkription/Translation) und Proteine mit unbekanntem oder noch nicht klassifizierten Funktionen. Diese funktionelle Einteilung der Proteine ermöglichte es, eine Aussage über die Veränderung in der Sekretion der Proteine zu treffen. Nach der Identifizierung der Proteine zeigte sich, dass bei allen Versuchsreihen – zumindest vergleichbar – die meisten Proteine der Gruppe der Strukturproteine und der des Stoffwechsels zugeordnet werden konnten. Die 38 identifizierten Proteine waren zu 25% Strukturproteine, 22,5% konnten dem

Ergebnisse

Stoffwechsel zu geordnet werden, 15% der Entwicklung, jeweils 12,5% dem Proteinstoffwechsel und der Kategorie der Proteine ohne Funktion oder noch unbekannter Funktion sowie 5% den Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind.

Nach den RNAi-Experimenten zeigten sich Veränderungen vor allem in der deutlichen Unter- oder Überrepräsentation einzelner funktioneller Klassen. Es ließ sich feststellen, dass zunächst im Vergleich der RNAi-Experimente untereinander nach dem ASP-6 *knock-down* mit 15 Proteinen an der Zahl nur ungefähr halb so viele Proteine identifiziert werden konnten wie nach dem ASP-2 *knock-down* mit 30 Proteinen und nach dem GalNAcT *knock-down* mit 34 Proteinen. Hier war also eine deutliche Veränderung des Sekretoms zu erkennen. Betrachtet man die Repräsentanz der einzelnen funktionellen Klassen in den einzelnen RNAi-Experimenten, zeigt sich, dass insgesamt wieder die Klasse der Struktur- und Stoffwechselproteine dominierte, aber auch vor allem nach dem ASP-6- und GalNAcT *knock-down* die Zahl der Proteine ohne/mit unbekannter Funktion.

Nach ASP-2 *knock-down* konnten die identifizierten Proteine zu jeweils 16,66% folgenden Kategorien zugeordnet werden: Struktur, Entwicklung, Proteinstoffwechsel, ohne Funktion; 13,33% der Proteine den Kategorien des Stoffwechsels und der Proteinsynthese. Ein einziges Protein konnte der Signaltransduktion zugeordnet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich nach dem ASP-6 *knock-down*, dass keine Proteine des Proteinstoffwechsels identifiziert werden konnten, vielmehr erneut solche, die an der Strukturgebung beteiligt sind (26,66%) und jene ohne Funktion mit 33,33%. Mit je 13,33% waren die Klassen der Entwicklung und des Stoffwechsels vertreten, 6,66% die der Proteinsynthese.

Als auffälligstes Merkmal nach dem GalNAcT *knock-down* zeigten sich nach diesem Versuch identifizierte Chaperone, welche in keinem anderen Experiment identifiziert werden konnten. Dafür konnten keine Proteine der Klasse der Signaltransduktion identifiziert werden. Die Klasse der unbekannt Proteine dominierte hingegen mit 32,35%. Proteine mit funktionellen Eigenschaften im Rahmen von Entwicklung und Stoffwechsel verteilten sich auf jeweils 11,76%, die Klasse der Proteine mit Funktionen der Proteinsynthese war mit 14,72% repräsentiert.

Ergebnisse

In der folgenden Abbildung (Abb. 12) werden die oben beschriebenen Verteilungen im Einzelnen nacheinander dargestellt.

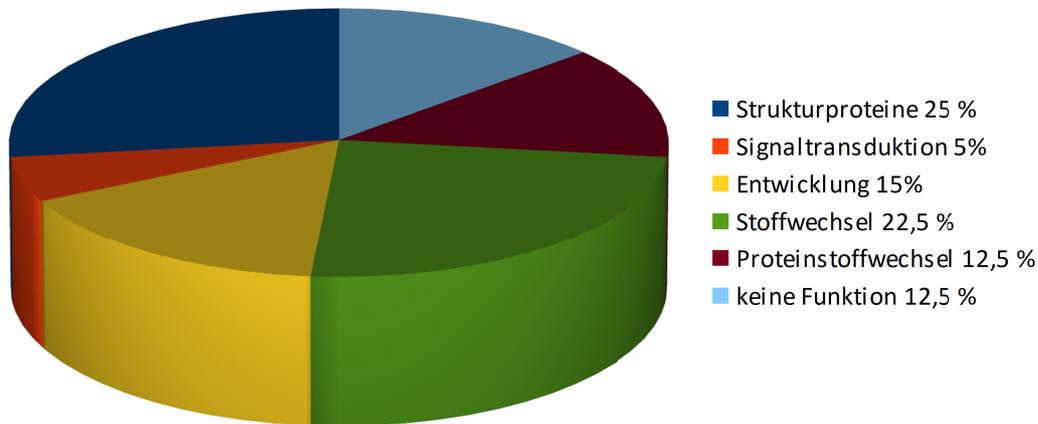


Abb. 12 (A): Funktionelle Klassifikation von sekretorischen Proteinen von *C. elegans* aus den unterschiedlichen RNAi knock-down-Versuchen. Insgesamt wurden 40 Proteine identifiziert, wobei die Mehrzahl den Bereich der Strukturproteine ausmacht, gefolgt von den Proteinen, die am Stoffwechsel beteiligt sind. Die Proteine, die der Signaltransduktion zugeordnet werden konnten, waren in der Unterzahl.

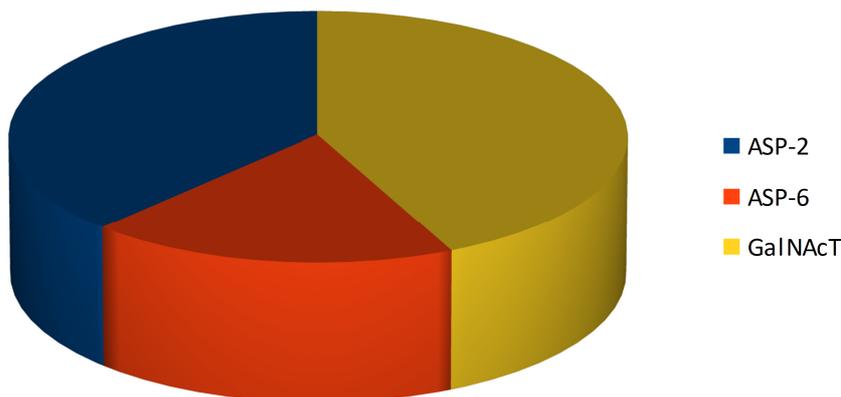


Abb. 12 (B): Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine von *C. elegans* nach den RNAi knock-down-Versuchen der drei Proteine ASP-2, ASP-6 und GalNAcT. Nach GalNAcT knock-down wurden mit 34 Proteinen, ebenso vergleichbar mit den 30 identifizierten Proteinen aus dem ASP-2 knock-down, zahlenmäßig die meisten Proteine identifiziert. Im ASP-2 knock-down konnten hingegen nur 15 Proteine identifiziert werden.

Ergebnisse

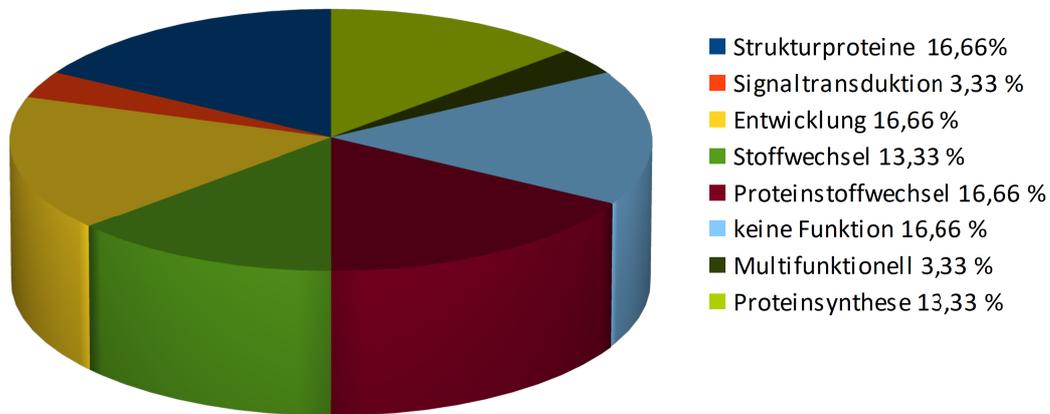


Abb. 12 (C): Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine nach ASP-2 *knock-down* aus *C. elegans*. Zu vergleichbaren Anteilen wurden fast alle funktionellen Klassen aufgefunden, lediglich die Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, waren in nur einem Fall vorhanden.

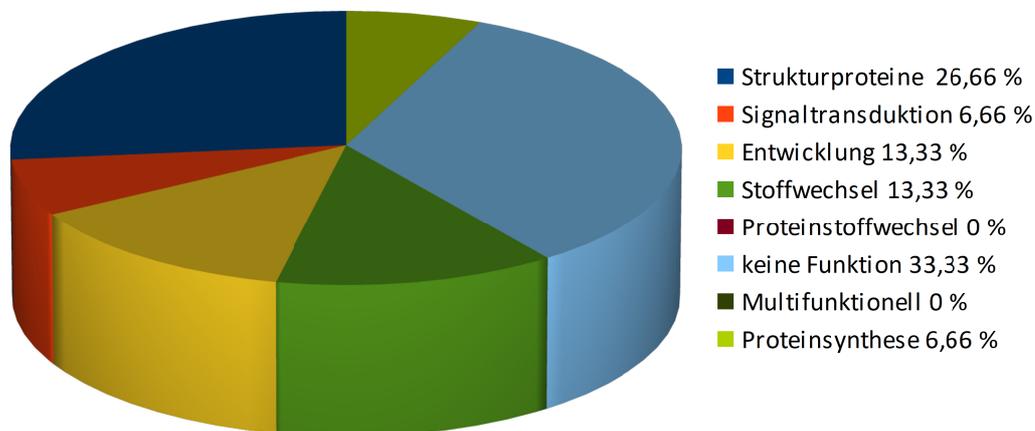


Abb. 12 (D): Prozentuale Verteilung der identifizierten Proteine nach ASP-6 *knock-down* aus *C. elegans*. Auch hier machte die Mehrzahl der 15 identifizierten Proteine die Klasse der Strukturproteine aus. Es wurden ähnlich viele identifiziert, die keiner Funktion zugeordnet werden konnten. Proteine des Proteinstoffwechsels konnten gar nicht identifiziert werden.

Ergebnisse

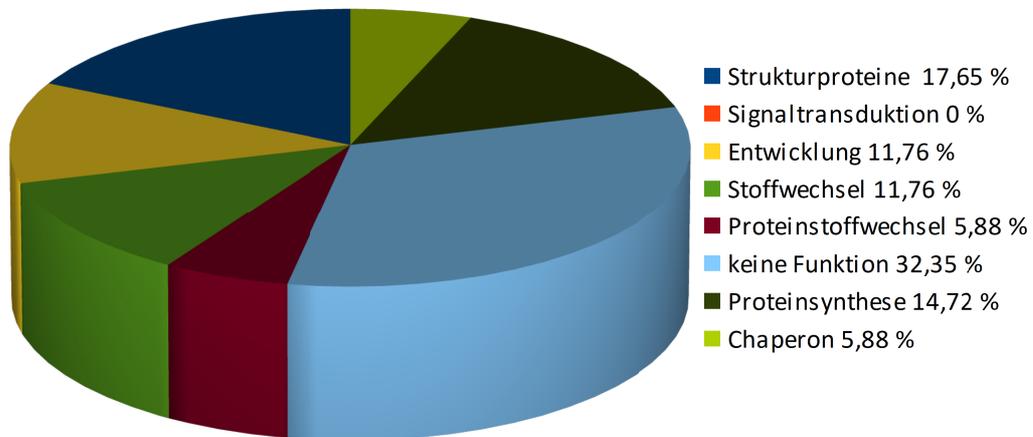


Abb. 12 (E): Prozentuale Verteilung der Proteine nach GalNAcT *knock-down* aus *C. elegans*. Nur bei dem GalNAcT *knock-down* konnten Chaperone identifiziert werden. Die meisten Proteine wurden als Struktur- und Stoffwechselproteine detektiert. Im Vergleich zu den anderen *knock-down* Versuchen wurde hier die größte Zahl an Proteinen identifiziert, die an der Proteinsynthese beteiligt waren.

Ergebnisse

Vergleicht man nun die Sekretome der RNAi *knock-downs* mit den identifizierten Proteinen aus dem *knock-down* mit leerem Kontrollvektor, so zeigen sich deutliche Übereinstimmungen. Diese sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Identifizierte Proteine nach GalNAcT, ASP-2 und ASP-6 *knock-down* und deren Auftreten in den verschiedenen Sekretomen aus *C. elegans*.

Nr.	Protein	Identifiziert nach <i>knock-down</i> von				Gefunden im Sekretom
		GalNAcT	ASP-2	ASP-6	Kontrolle	Nach 1D-Gelelektrophorese
1	M03F4.2c ACT-4	+	-	-	+	-
2	F54H12.6 EEF-1B.1	+	-	-	-	-
3	Y41E3.10a.1 EEF-1B.1	+	-	-	-	-
4	C07A12.4b PDI-2	+	-	-	-	-
5	C29E4.14	+	-	-	-	-
6	Y105E8B.1a LEV-11, TMY-1	+	+	-	+	-
7	C36E6.5.2 MLC-2	+	-	-	-	+
8	B0454.9	+	-	-	-	-
9	F28E10.1a	+	-	-	-	-
10	C47E8.5.4 DAF-21	+	-	-	-	-
11	K03E5.2b	+	-	-	-	-
12	F13A2.3	+	-	-	-	-
13	C14F11.a HSP-43	+	-	-	-	-
14	C06C6.7	+	-	-	-	-
15	K11C4.3a UNC-70	+	-	-	-	-
16	Y51H1A.6b	+	-	-	-	-

Ergebnisse

	MCD-1					
17	B0454.9	+	-	-	-	-
18	F09E5.15a.1 PDRX-2	+	-	-	-	-
19	K02F2.2.2 AHCY-1, DPY-14	+	-	-	-	-
20	F19B10.3	+	-	-	-	-
21	F09F7.2a.1 MLC-3	+	+	-	-	+
22	Y57G11C.7	+	-	-	-	-
23	H28O16.1 ATP-3	+	-	-	-	-
24	C07H6.5.2 CGH-1	+	-	-	-	-
25	C27H6.8.2	+	-	-	-	-
26	C09D1.1a UNC-89	+	-	-	+	-
27	W02D3.5.2 LBP-2	+	-	-	-	-
28	ZC196.4	+	-	-	-	-
29	F48G7.5	+	-	-	-	-
30	Y105E8A.17 EKL-4	+	-	-	-	-
31	ZK632.9	+	-	-	-	-
32	C06H2.1.1 ATP-5	+	-	-	+	-
33	R03G5.1d EFT-4	+	-	-	-	-
34	B0432.4 MISC-1	+	-	-	-	-
35	F09F7.2a.1 MLC-3	-	+	-	-	-
36	C07A12.4c PDI-2	-	+	-	-	-
37	Y105E8B.1a LEV-11	-	+	-	-	-
38	Y38A10A.5	-	+	-	-	-

Ergebnisse

	CRT-1					
39	Y106G6A.1	-	+	-	-	-
40	T01B11.4 ANT-1.4	-	+	-	-	-
41	C07A12.4b PDI-2	-	+	-	-	-
42	F42G8.10a	-	+	-	-	-
43	Y32F6A.3 PAP-1	-	+	-	-	-
44	C34E10.6.2 ATP-2	-	+	-	-	-
45	F09C6.15	-	+	-	-	-
46	F26D10.3.2 HSP-1, HSP70a	-	+	-	-	-
47	C44C10.11.2	-	+	-	-	-
48	K02F2.2.2 AHCY-1	-	+	-	-	-
49	M03F4.2c ACT-4	-	+	-	-	-
50	F58A4.4 PRI-1	-	+	-	+	-
51	F20B6.2.2 VHA-12	-	+	-	-	-
52	F10C2.6 DARS-2	-	+	-	-	-
53	F58A6.2	-	+	-	-	-
54	H28O16.1d. ATP-3	-	+	-	-	-
55	R11A5.3	-	+	-	-	-
56	F25H5.4.1 EEF-2	-	+	-	-	-
57	ZK809.1	-	+	-	-	-
58	F15E11.1	-	+	-	-	-
59	F11G11.2 GST-7	-	+	-	-	-
60	F59A2.6	-	+	-	-	-
61	Y59A8A.2	-	+	-	-	-

Ergebnisse

62	C16C10.3	-	+	-	-	
63	F21A10.1a	-	+	-	-	-
64	F58D5.4b KSR-2	-	+	-	-	-
65	W03F11.4	-	-	+	-	-
66	T13H10.2	-	-	+	-	-
67	F37C12.13.a EXOS-9	-	-	+	-	-
68	F08D12.10 SDZ-9	-	-	+	-	-
69	ZC412.3	-	-	+	-	-
70	C09D1.1f UNC-89	-	-	+	-	-
71	R13H4.4a HMP-1	-	-	+	-	-
72	M02F4.1	-	-	+	-	-
73	F13A2.3	-	-	+	-	-
74	F25C8.4 ACS-12	-	-	+	-	-
75	M142.5	-	-	+	-	-
76	Y51H1A.6b MCD-1	-	-	+	-	-
77	C40D2.3 MATH-21	-	-	+	-	-
78	Y71G12B.22	-	-	+	-	-
79	T04C9.1b	-	-	+	-	-

4 Diskussion

4.1 Die Optimierung der Methoden zur Proteinaufreinigung von *C. elegans*

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit mit *C. elegans* lag der Schwerpunkt einerseits auf der Optimierung vorhandener Methoden zur Aufreinigung des Probenmaterials und der Aufzucht und Kultivierung von *C. elegans*, um eine valide Ergebnissicherung zu erzielen, andererseits in der Analyse des Sekretoms sowie der funktionellen Klassifizierung der identifizierten Proteine und der Untersuchung der Auswirkung von RNA-Interferenz *knock-downs* dreier ausgewählter Proteine: ASP-6, ASP-2 und der GalNAc-Transferase GLY-10 im Vergleich zu einem leeren Kontrollvektor auf das Sekretom sowie den Reproduktionserfolg von *C. elegans*.

Die bestehende starke methodische Weiterentwicklung in der Proteinanalytik macht eine kontinuierliche Methodenoptimierung erforderlich. Die Kultivierung und Aufzucht von *C. elegans* wurde hinsichtlich der Effizienz der Methoden überprüft und optimiert, ebenso die Entfernung von Zellresten oder anderer Störfaktoren, die die Ergebnissicherung hätten beeinträchtigen können.

Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse war zunächst die optimale Vorbereitung des Probenmaterials. Hierin ergab sich die Schwierigkeit, dass die bereits vorhandenen Proben (Proteinüberstände aus *C. elegans*-Flüssigkulturen) von einem vorangegangenen wissenschaftlichen Mitarbeiter gewonnen wurden und somit die Reproduzierbarkeit bei der Probengewinnung eingeschränkt war.

In dieser experimentellen Arbeit wurden verschiedene Optimierungsmethoden zur effizienten Probengewinnung angewandt. *C. elegans* kann auf zwei unterschiedliche Arten und Weisen kultiviert werden: Die eine Möglichkeit besteht in der Aufzucht auf Agarplatten, die andere in der Aufzucht in definierten Flüssigkulturen. In dieser Arbeit wurde nur mit der ersten Methode gearbeitet.

Um die erforderlichen Mengen an *C. elegans* zu erhalten, müssen aus einer großen Menge adulter *C. elegans* möglichst viele Eier gewonnen werden. Die Überschichtungsmethode (siehe 2.3.2) erwies sich unter allen getesteten Methoden als diejenige, die die geringsten Anteile an Zelltrümmern und *C. elegans*- und *E. coli*-

Resten aufwies. Gerade diese Zellreste können aber die Ergebnisse erheblich beeinflussen. Daneben ist der Materialverlust durch Waschungs- und Erntemethoden der Eier als wichtiger Aspekt zu nennen.

Zunächst musste das Probenmaterial erfolgreich gewonnen werden. *C. elegans* wurde auf Agarplatten mit *E. coli* kultiviert. Nach Inkubation konnten diese mithilfe eines M9-Puffers abgespült, zentrifugiert und mit einer 30%igen Saccharoselösung gereinigt werden. Nach erfolgreich optimierter Materialgewinnung musste dann zunächst das bestehende Probenmaterial in einem optimalen Verhältnis in einem Lysispuffer (siehe 2.6.2) aufgenommen werden, da das Ausgangsmaterial in gefriergetrockneter Form vorlag. Die Verwendung eines optimalen Lysispuffers stellt einen wichtigen Punkt für die Analyse des Sekretoms von *C. elegans* dar. Für die Proben stellte sich der Lysis-IEF-Puffer (siehe 2.6.4) als der optimalste heraus, da mit ihm die höchste Proteinmenge aus den Extrakten gewonnen werden konnte. Die anderen getesteten Extraktionspuffer zeigten nach der Gelelektrophorese ein verwaschenes Säulenmuster, wenige Spots und spärliche Bandenmuster (siehe Abb. 9). Eine anschließende Proteinfällung durch Aceton (siehe 2.6.1) zur zusätzlichen Aufreinigung und Entsalzung der Probe (siehe 2.6.3) erwies sich als vorteilhaft, da erst hierdurch quantitativ und qualitativ die meisten Proteinspots detektiert und identifiziert werden konnten (siehe 3.2, Abb. 9 und 10).

Beim experimentellen Arbeiten war es erforderlich, die Abläufe zeitlich zu optimieren. Dies konnte durch Nutzung technischer Geräte erreicht werden, so zum Beispiel durch das Lysieren und Zentrifugieren in der Speed-Vac, durch Anwendung einer Mehrkanalpipette oder die Nutzung eines Roboters zum automatischen Verdau. In dieser Arbeit wurde ein direkter Vergleich zwischen dem automatischen tryptischen in-gel Verdau sowie dem manuellen Verdau herangezogen. Bei beiden Varianten sind Applikationsfehler mit der Folge der Probenverunreinigung möglich, jedoch überzeugte die Nutzung des Pipettierroboters Hamilton Starlet zum in-gel Verdau durch eine hohe Reproduzierbarkeit und Zeiteinsparung.

Hinsichtlich der RNAi-Versuche war es notwendig, die Kultivierung ausschließlich mit den L1-Larven von *C. elegans* zu starten. Eine Larvenstadien-Synchronisation war erforderlich, damit keine Würmer vorhanden waren, die sich noch von nicht-transformierten *E. colis* ernährt hatten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Festlegung der Inkubationszeiten, wie zum Beispiel im Rahmen der Kultivierung von *C. elegans* auf Agarplatten (siehe 2.3.1), im Rahmen der Proteinaufreinigung bei der Zentrifugation (siehe 2.5) oder im Rahmen des manuellen Verdaus, bei dem die Gelspots mit Trypsinlösung inkubiert wurden (siehe 2.9.4.1). Für diese Arbeit wurden, außer für die Färbereaktion, sämtliche Inkubationszeiten „über Nacht“ festgesetzt.

Fehlerquellen vor, während und nach dem Ablauf einer Gelelektrophorese beziehen sich hier auf die unterschiedlich stark ausgeprägte Rehydratisierung der IEF-Strips. Weiterhin kann es zu Proteinverlusten während der IEF, SDS-Page und Äquilibration kommen. Es war notwendig, die Gele schon am Vortag der Verwendung herzustellen und adäquat zu lagern, um eine vollständige und gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten.

4.2 Proteinidentifikationen aus dem Sekretom von *C. elegans*

Aus 1D-Gelen wurden hauptsächlich Sekretom-Proteine mit einem Molekulargewicht größer 60 kDa identifiziert. Es zeigten sich deutliche Proteinbandenmuster auf Höhe 60 kDa, 80 kDa, 120 kDa und 220 kDa. Das hier aufgetragene Proteinmaterial war jenes, welches einer zusätzlichen Entsalzung unterzogen wurde. Hier waren auch die wenigsten Verschmutzungen zu sehen. Demnach ließ sich der Rückschluss ziehen, dass hier durch intensivierte Probenvorbereitung ein besseres Ergebnis erzielt werden konnte.

Bei den über die eindimensionale Gelelektrophorese durchgeführten Versuchen konnten insgesamt 38 Proteine identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle 1).

Nach Identifikation der Proteine aus der eindimensionalen Gelelektrophorese mittels MALDI-TOF-MS zeigte sich, dass 17 der Proteine einen isoelektrischen Punkt von kleiner 6,0 und 21 größer von 6,0 aufweisen. Davon haben 15 Proteine ein Molekulargewicht von unter 60 kDa und 23 eines von über 60 kDa, davon drei größer 100 kDa und eines größer 200 kDa. Somit lässt sich sagen, dass die meisten Proteine als eher klein bis mittel einzustufen sind.

Es wurden vorrangig strukturgebende Proteine identifiziert (37,5%). Daneben wurden Proteine identifiziert, die der Klasse der Stoffwechselregulation/Metabolismus (27,5%)

– davon 12,5% dem Proteinmetabolismus – zugeordnet werden konnten. Weitaus weniger sekretorische Proteine wurden der Transkription (5%) sowie der Signalübertragung (2,5%) und der Proteinsynthese/Translation (2,5%) zugeordnet. Außerdem wurden einige PC-substituierte Proteine, für die bereits eine PC-Modifikation beschrieben wurde, mit unbekannter Funktion (12,5%) identifiziert (siehe 3.3 und Anhang Tabelle 1).

Allgemein lässt sich sagen, dass eine bessere Aufreinigung des Probenmaterials, z.B. nach Entsalzung, zu mehr Identifikationen von Proteinen führte. Bezüglich der höheren Anzahl an Identifikationen nach besserer Aufreinigung verhielt es sich ähnlich bei den Versuchen der durch 2D-Gelelektrophorese identifizierten Proteine.

Nach RNAi *knock-down* wurden die Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und die Sekretome auf Veränderungen untersucht. In allen Experimenten zeigten sich erhebliche Unterschiede im Vergleich zu dem Kontrollsekretom, einem leeren RNAi-Vektor. Nach ASP-2 *knock-down* wurden 30 Proteine, nach ASP-6 15, nach GalNAcT 34 und in der Kontrolle 61 Proteine identifiziert.

Die identifizierten Proteine haben vielfältige Funktionen. Doch warum ist dies so interessant? Wie schon erwähnt, haben die Proteine sowohl biologische als auch molekulare Funktionen. Vor allem spielt hier die Bedeutung in der Nematodenentwicklung eine große Rolle. Teilweise betreffen diese nur die Entwicklung im Allgemeinen, teilweise aber auch ganz spezifische Entwicklungsschritte in einzelnen Larvenstadien. Vor allem die strukturgebenden Proteine sind wichtig für die Entwicklung der Nematoden. Hier spielt das nukleare Laminin (LMN-1) eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Zellformation und -stabilität als auch in der Larvenentwicklung (Kao *et al.* 2006). Weitere interessante identifizierte Proteine waren das GIP-2, welches eine entscheidende Rolle in der Larvenentwicklung spielt, das REPO-1, das für die Entwicklungsstadien in *C. elegans* maßgeblich beeinflussend sein muss sowie SET-9, das einen Einfluss auf die Lebensdauer in *C. elegans* hat (*The C. elegans sequencing consortium* 1998). Besonderes Augenmerk sollte dem *abnormal cell lineage protein 19* (LIN-19, D2045.6) geschenkt werden, das Bestandteil vieler biologischer Prozesse wie z. B. der Mitose, Zellgrößenregulation, rezeptorvermittelten Endozytose oder Larvenentwicklung ist und eine negative Wirkung auf die Proliferation und das multizelluläre organische Wachstum hat (Kipreos *et al.* 1996).

4.3 ES-Produkte und ihr Einfluss auf das Immunsystem

In den letzten Jahrzehnten haben ES-Produkte von Helminthen hinsichtlich der Behandlung verschiedener Erkrankungen einen großen Stellenwert gewonnen. Helminthen machen sich verschiedenste Strategien zu Nutzen, um das Immunsystem ihres Wirts zu umgehen, indem sie die protektive Immunantwort modifizieren, etwa durch Induktion angeborener und erworbener regulatorischer Zellen, antiinflammatorischer Zytokine und spezifischer inhibitorischer Antikörper-Isotypen (Anthony *et al.* 2007). Es stellt sich die Frage, ob diese immunmodulatorischen Effekte möglicherweise Umstände beeinflussen, die zu Erkrankungen beitragen oder die mit fehlgeleiteten Entzündungsreaktionen assoziiert sind, wie zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen. Es konnte von einer inversen Korrelation zwischen parasitären Infektionen und chronischen Erkrankungen am Beispiel des Metabolischen Syndroms und der Adipositas berichtet werden (Crowe *et al.* 2017). Interessanterweise gibt es auch Hinweise dafür, dass bestimmte parasitäre Infektionen einen protektiven Effekt auf allergologische Erkrankungen haben können. So konnte an einer Vielzahl definierter helminthischer ES-Produkten gezeigt werden, dass diese eine protektive Wirkung gegenüber der Ovalbumin-induzierten bronchialen Hyperreaktivität haben, darunter ES-62 (Melendez *et al.* 2007; Rzepecka *et al.* 2013), Cystatin (Schnoeller *et al.* 2008) und MIF-Homologe des Nematoden *Anisakis simplex* (*A. simplex*) (Park *et al.* 2009) und SEA in *S. japonicum* (Danilowicz-Luebert *et al.* 2013).

ES-62 limitiert die peribronchiale Entzündungsreaktion und Mukosahyperplasie und inhibiert die Eosinophilen- und Neutrophileninfiltration in der Lunge. Dieser Schutzmechanismus korreliert mit einem Anstieg der Produktion von IL-17 und IL-4 (Rzepecka *et al.* 2013). Zudem verhindert ES-62 die Mastzelldegranulation in der Lunge und hat einen inhibitorischen Effekt auf die Zytokinproduktion (Melendez *et al.* 2007). Dem Cystatin in *A. viteae* konnte protektive Wirkung bei allergenvermittelten Atemwegserkrankungen nachgewiesen werden. Im Mausversuch zeigte sich, dass es die Th-2-gesteuerte Entzündungsreaktion und die nachfolgende Empfänglichkeit für allergische Atemwegserkrankungen supprimiert. Eine Behandlung der Mäuse mit dem rekombinanten Cystatin inhibiert die Eosinophileninfiltration und führt zur Reduktion

des Gesamt-IgE und der IL-4-Produktion. Ebenso vermag es die Makrophagen-vermittelte Entzündungsreaktion zu modulieren (Schnoeller *et al.* 2008).

In einer weiteren Studie wurde bei Mäusen durch Antigen-Injektion mit Ovalbumin eine bronchiale Hyperreaktivität induziert. Es konnte gezeigt werden, dass es bei den Mäusen, die mit dem rekombinanten MIF-Homolog von *A. simplex* (rAS-MIF) behandelt wurden, zu einer signifikanten Reduktion der Th2-zugehörigen Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) im bronchoalveolären Sekret sowie des allergenspezifischen IgG2a im Serum kommt. Die IL-10- und TGF- β -Spiegel der mit rAS-MIF behandelten Mäuse waren signifikant höher, ebenso wie die Anzahl an CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen (regulatorische T-Zellen) in Milz und Lunge (Park *et al.* 2009).

Das *schistosome soluble egg antigen* (SEA) in *S. japonicum* erhöht die Produktion von immunsuppressiv wirksamem IL-10 und die Expression von Foxp3 auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Gleichzeitig reduziert SEA die Expression von Th2-assoziierten Zytokinen (IL-4 und IL-5) und antigeninduzierter Atemwegsentzündungen (Danilowicz-Luebert *et al.* 2013).

Die beschriebenen Einflüsse und modulatorischen Effekte von ES-Produkten in Helminthen geben weiteren Aufschluss über mögliche therapeutische Ansätze für parasitäre aber auch autoimmunbedingte oder allergologische Erkrankungen.

4.4 Vergleich des Sekretoms von *C. elegans* mit den Sekretomen anderer Nematoden

4.4.1 *Brugia malayi*

Der parasitäre Nematode *Brugia malayi* ist wie *Wuchereria bancrofti* ein Fadenwurm, der vor allem das Lymphsystem befällt und eine Reihe von klinischen Manifestationen bewirkt, beginnend bei asymptomatischen Ausprägungsformen bis hin zur deformierenden Elephantiasis (Mark 1987). Der Fadenwurm durchläuft mehrere morphologische Entwicklungsstadien von der Mikrofilarie über die L1- und L3-Larve bis zur adulten Filarie. Sein Lebenszyklus teilt sich auf zwei Wirte auf (Moskito und Endwirt). Sobald das infektiöse L3-Stadium durch den Stich des Moskitos im menschlichen Wirt angelangt ist, entwickeln sich die Larven innerhalb von sechs bis

zwölf Monaten in adulte Fadenwürmer. Nach der Paarung setzen die weiblichen Filarien eine große Anzahl von Mikrofilarien in den Blutkreislauf frei, welche dann wiederum von Moskitos aufgenommen werden (Moreno und Geary 2008). Es wird vermutet, dass die einzelnen Stadien der parasitären Entwicklung eine Veränderung im Tropismus des Gewebes verursachen können (Bennuru *et al.* 2009).

In einer Studie von Hewitson *et al.* 2008 der Universität Edinburgh über das Proteomprofil exkretorisch-sekretorischer Produkte adulter Würmer von *B. malayi* wurden die ES-Proteine durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) und zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Es konnten 80 ES-Proteine von *B. malayi* (BES) sowie zwei wirtsspezifische Proteine identifiziert werden, von denen 38% im gesamten Wurmextrakt detektiert werden konnten. Die Proteine, die relativ gesehen zum gesamten Wurmextrakt als ES-Produkte angereichert waren, beinhalteten ein Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein (PEB), eine Leucyl-Amino-peptidase (LAP) – das homologe Protein zu ES-62 der verwandten Filarie *A. viteae*, welches antiinflammatorische Eigenschaften hat (Melendez *et al.* 2007) und von der Modifikation mit Phosphorylcholin (PC) abhängt (Harnett *et al.* 2003) – Galektine (v.a. GAL-1 und GAL-2), eine N-Acetylglucosaminyltransferase (GlcNAcT), die Gluthation-Peroxidase (gp29, GPX-1) als häufigstes Hüllprotein des adulten *B. malayi*, das möglicherweise die parasitären Lipide vor reaktivem Sauerstoffangriff schützen kann (Tang *et al.* 1996) sowie den Zytokin-homologen Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF-1). MIF-1 wurde als ein von aktivierten T-Lymphozyten sezerniertes Molekül beschrieben, welches in der Lage ist, die ungerichtete Migration von Makrophagen zu hemmen (Bloom und Bennett 1966; David 1966). Eines der häufigsten sezernierten Proteine war die Triosephosphat-Isomerase (TPI), die in der 2D-Gelelektrophorese die stärkste Spot-Intensität aufzeigte, während andere glykolytische Enzyme wie z.B. die Enolase, Aldolase und GAPDH nur im somatischen Extrakt gefunden wurden (Hewitson *et al.* 2008).

Zu den neu identifizierten Proteinen zählten u.a. elf Mitglieder der Transthyretin-ähnlichen Proteinfamilie (TLP), welche nahe verwandt zu der klassischen Transthyretin (TTR) und der Transthyretin-verwandten Proteinfamilie sind. TTR ist für den Transport von Schilddrüsenhormonen, Vitamin A und Retinsäure verantwortlich. Zudem wurden drei *glutamine-rich-repeat-mucin-like* Proteine identifiziert. Es konnten

erstaunlicherweise keine Hinweise auf korrespondierende Proteine des Genoms des in *B. malayi* anwesenden Endosymbionten *Wolbachia* gefunden werden (Hewitson *et al.* 2008). Durch Western-Blot mit einem anti-PC-spezifischen monoklonalen Antikörper konnte die GlcNAc-Transferase als führendes PC-tragendes Protein identifiziert werden (Hewitson *et al.* 2008).

Infektionen mit *B. malayi* und dem nahe verwandten *Wuchereria bancrofti* sind mit immunologischen *down*-Regulationen assoziiert. Während der Infektion dominieren regulatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-10 und TGF- β , diese inhibieren die spezifische T-Zell-Proliferation und -Zielfunktion im Parasiten (Babu *et al.* 2006; King *et al.* 1993). Auch Defekte in Antigen-präsentierenden Zellen (APC) sind nachgewiesen (Semnani *et al.* 2003), ebenso die Empfänglichkeit für inflammatorische Stimuli bei Monozyten (Sasisekhar *et al.* 2005).

Die Mehrzahl der parasitären Proteine (66%), die in den ES-Produkten identifiziert wurden, hatten detektierbare Signalsequenzen, entweder nicht-klassisch oder klassisch N-terminal. Den verbliebenen 33% der Proteine fehlten diese. Möglicherweise werden solche Proteine in Folge von holokriner Sekretion (Sekretion unter Zellzerfall) freigesetzt, wie es bereits für *S. mansoni* beschrieben wurde (Curwen *et al.* 2006). Das im Gesamtextrakt am häufigsten vorkommende Protein war das Galektin Bm1_24940 (GAL-1), gefolgt von GAL-2. Galektine sind eine Untergruppe der Lektine und gehören der Familie der Zucker-bindenden Proteine an. Sie haben durch eine vorhandene Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) eine Affinität für N-Acetyllactosamine (Cao und Guo 2016; Cooper und Barondes 1999). Galektine wurden auch schon in anderen Helminthen identifiziert, so ist dem GAL-1 in *B. malayi* das *O. volvulus* Galektin AAA20541 (Kilon und Donelson 1994) am ähnlichsten und dem GAL-2 das *H. contortus*-Homolog O44126 (Newlands *et al.* 1999). Bisher konnte keinem einzigen Galektin in Helminthen eine Funktion zugeschrieben werden, aber interessanterweise ist beschrieben, dass einige Galektine in Säugetieren die Eigenschaft haben, Th1- und Th2-vermittelte Entzündungsreaktionen zu inhibieren (Toscano *et al.* 2007; Kato *et al.* 2007). Die Bindung der Galektine an die Ziel-Glykoproteine ist durch das Vorhandensein ihrer Polylactosamin-Liganden determiniert. Dies wird wiederum von der Aktivität Golgi-ständiger Glykosyltransferasen wie die der β -1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT V) und der core 2 β -1,6-N-

Acetylglucosaminyltransferase V (core 2 GnT) reguliert, welche die Bindung von Polylactosaminen zu O- und N-Glykanen unterstützen (Daniels *et al.* 2002; Demetriou *et al.* 2001). Diese Liganden ermöglichen es an Oberflächenproteine zu binden, diese zu vernetzen und somit Galektin-Glykoprotein-Gitter zu erschaffen, die durch Anhebung der Signalschwelle für die T-Zell-Aktivierung eine *down*-Regulation des Immunsystems bewirken (Demetriou *et al.* 2001; Rabinovich *et al.* 2007).

In diesem Zusammenhang wurde außerdem eine N-Acetylglucosaminyltransferase (GlcNAcT) identifiziert. Dieses Protein hat eine signifikante Ähnlichkeit zu dem menschlichen core 2 GNT als auch zu einem hypothetischen Protein von *C. elegans*. Es ist noch nicht bekannt, ob die *B. malayi* GlcNAcT in der Lage ist, die Glykosylierung und Galektinbindung eines Proteins im extrazellulären Milieu auszulösen, da Glykosyltransferasen normalerweise im Golgi-Apparat funktionsfähig sind. Demnach ist es möglich, dass die GlcNAcT eine andere Extrazellularfunktion hat; so wurde für eine sekretierte Form des menschlichen Proteins GnT V nachgewiesen, dass es die Angiogenese fördern kann (Saito *et al.* 2002).

Weitere dominierende Proteine in BES waren die γ -Glutamyltranspeptidase und ein Protein, das als „major allergen“ (Hewitson *et al.* 2008:17) beschrieben wurde, beide bekannt als Ziel für wirtsspezifisches IgE (Lobos *et al.* 1996; Lobos *et al.* 2003). Letzteres hat Ähnlichkeit zu zwei Proteinen in *C. elegans* (ZC412.3 und T10G3).

In *B. malayi* gibt es drei Cysteinproteaseinhibitoren (Cystein CPI-1, -2, -3). Vor allem CPI-2-Homologe tauchen in der Sekretion vieler Nematoden auf. Bm-CPI-2 vermag Proteasen zu inhibieren, die bei der Prozessierung und Präsentation von Antigenen eine Rolle spielen, so auch das Schlüsselenzym Asparaginy-Endopeptidase. Jedoch ist noch nicht bekannt, ob andere Homologe, wie zum Beispiel OV-16 in *O. volvulus* (Lobos *et al.* 1991) oder TES-26 in *Toxocara canis* (Gems *et al.* 1995), diese Funktion oder Fähigkeit teilen. Weiter konnten die Zyklophiline CYP-2 und CYP-5 sowie FKBP (FK506-Binding Protein)-12 identifiziert werden. Sie besitzen Isomerase-Aktivität und spielen als Chaperone eine Rolle in der Proteinfaltung. Ob sie eine immunologisch bedeutsame Rolle spielen ist unklar. CYP-18 in *Toxoplasma gondii* ist jedoch in die direkte Wirts-Parasits-Kommunikation involviert, indem es die Th1-Immunantwort durch Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 stimulieren kann (Ibrahim *et al.* 2009). Auch hypothetische Proteine wurden identifiziert, von denen zwei leichte Ähnlichkeit

zu Einträgen von *C. elegans* (Bm1_46475 zu KO1A11.1) und *C. briggsae* (Bm1_19065 zu CBG_09470) aufweisen.

In einer weiteren großen stadien- und geschlechtsspezifischen Proteomanalyse der ES-Produkte von *B. malayi* durch Moreno und Geary 2008 mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS) wurden 228 verschiedene Proteine als Teil der ES-Proteine von Mikrofilarien, weiblichen und männlichen adulten Würmern identifiziert. Das Profil und die Funktionen der sekretierten Proteine in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums und des Geschlechts sowie mögliche Varianten von immunologischen Mechanismen sollten hierbei untersucht werden. Ungefähr 14% der sekretierten Proteine konnten in allen Stadien/Geschlechtern gefunden werden. Hier zog man den Rückschluss, dass diese Proteingruppen essentiell für das Überleben im Wirt sind. Eine große Präsenz zeigten glykolytische Enzyme wie die Enolase (A8PFE3) und die TPI (A8PKM4). In allen drei Stadien/Geschlechtern wurden potentiell immunmodulatorische Proteine wie ein Homolog von MIF-1 (A8PJU3), ein Galektin (GAL-1, A8PGM6), ein Cystatin-Typ Cysteinprotease-Inhibitor (CPI-2, O16159) und eine Leucyl-Aminopeptidase (LAP, A8QH34), das Homolog von ES-62 in *A. viteae*, gefunden. Das *core-2/I-branching enzyme family protein* (A8NPW6) konnte – ebenso wie eine Isoform des menschlichen MIF (MIF-2) (Q9NAS2) (Zang *et al.* 2002) und GAL-2 – nur in den adulten Stadien gefunden werden. Es wurden aber auch viele hypothetische oder uncharakterisierte Proteine gefunden, dessen mögliche Funktionen es noch aufzuklären galt (Moreno und Geary 2008). Hierzu zählte das in der Gruppe der Mikrofilarien am häufigsten identifizierte Antigen R1 (A8NW22), das scheinbar präferiert in Mikrofilarien exprimiert wird, aber auch in den männlichen und weiblichen adulten Würmern identifiziert wurde (Moreno und Geary 2008).

Die meisten ES-Proteine aus der Gruppe der Mikrofilarien spielen eine Rolle in Entwicklungsprozessen und der Regulation von Enzymaktivitäten (hierunter wurde die Gruppe der Proteaseinhibitoren als häufigste funktionelle Klasse identifiziert). Immunologisch bedeutsame Proteine sind möglicherweise die Endochitinase (MF1 antigen, P29030) und der Serinprotease-Inhibitor 2 in *B. malayi* (Bm-SPN-2, O18656), der eine Th1-Antwort induziert. Außerdem wurden einige Zink-Finger-Proteine und ein vermeintlicher Trypsininhibitor (A8P664) identifiziert, der eine *trypsin inhibitor-like*

cystein rich domain (TIL) enthält, die möglicherweise Peptidasen der Familien S1, S8 und M4 inhibieren kann (Moreno und Geary 2008). Der Trypsininhibitor hat zu 50% Ähnlichkeit mit einem Trypsininhibitor aus *A. suum* (Martzen 1990).

Das *major sperm protein 2* (MSP-2) wurde nur von männlichen adulten Würmer exprimiert, das *embryonic fatty acid binding protein* (Bm-FAB-1, Q9GU91) und *papain family cystein protease containing protein* (A8NND7), das im Uterus und in sich entwickelnden Gameten und Embryos exprimiert wird, wiederum nur von weiblichen Würmern (Moreno und Geary 2008).

Vergleicht man das Sekretom von *B. malayi* mit dem von *C. elegans*, zeigt sich, dass bei *B. malayi* vorrangig Proteine aus der Gruppe der Entwicklung und Regulierung der Enzymaktivität, Oberflächenproteine und glykolytische Enzyme zu finden waren. Weiter wurden als besondere Proteine die TPI, die LAP, eine GlcNAc-Transferase, GAL-1 und MIF-1 identifiziert (Moreno und Geary 2008).

4.4.2 *Schistosoma japonicum*

Schistosoma japonicum ist der Erreger der Schistosomiasis, auch Bilharziose genannt, eine parasitäre Erkrankung mit großer Relevanz. *S. japonicum* zählt zusammen mit *S. mansoni*, *S. intercalatum* und *S. mekongi* zu den Bilharziose-Erregern. Der Lebenszyklus dieses Erregers ist sehr komplex. Die Cercarie, eine zweite Larvenform des Parasiten, bezeichnet das für den Menschen und andere Wirbeltiere infektiöse Stadium. Süßwasserschnecken scheiden Cercarien ins Wasser aus. Diese gelangen dann in Kontakt mit der Hautoberfläche des Endwirts. Nach Durchdringen der Haut erfolgt die Umwandlung zum Schistosomulum, welches, angekommen in der Leber, das adulte Stadium erreicht. Das Miracidium, eine vielzellige Larve, die sich aus dem Ei entwickelt, schlüpft und wird von der Wasserschnecke aufgenommen. Über weitere Entwicklungsschritte erfolgt letztlich wieder die Entstehung der Cercarien (Kayser *et al.* 2005). Das Schistosomulum-Stadium hat insofern Bedeutung, als dass durch sezernierte Proteine möglicherweise das Immunsystem des Wirts beeinflusst werden kann (Pearce und Sher 1986). Wie diese genauen Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems oder auch die des langfristigen Überlebens der Schistosomen im Wirt aussehen, ist bisher noch nicht vollständig geklärt (Liu *et al.* 2009). In zahlreichen

Studien konnte jedoch die Bedeutung der durch Schistosomen produzierten ES-Produkte in der Modulation des Immunsystems des jeweiligen Wirtes festgestellt werden. So wurden die Umgehungsstrategien als eine Art „mimicry“-System (Liu *et al.* 2009:1236) beschrieben, dass in der Lage ist, Antigene zu produzieren, die endogenen Wirtskomponenten ähneln (Yoshino und Bayne 1983; Damian 1997; Salzet *et al.* 2000). Weiter können Schistosomen mithilfe von Wirtsmolekülen ihre äußere Hülle und Antigene tarnen (McLaren 1984; McLaren und Terry 1982) oder durch Interferenz mit dem Immunsystem des Wirts eine immunologische Modulation bewirken (Jenkins *et al.* 2005; Fallon und Mangan 2007; van Riet *et al.* 2007; Arruda und Santos *et al.* 2005). Die ES-Produkte von Schistosomen werden von der epithelialen Oberfläche des Magens und/oder des Integuments freigesetzt (Liu *et al.* 2009). Sobald diese in die Umgebung des Wirts gelangen, können sie auf verschiedene Art und Weise mit dem Immunsystem des Wirts interagieren und unterschiedliche Funktionen immunologisch modulieren (Jenkins *et al.* 2005; Lightowers and Rickard 1988). Weiter wurde berichtet, dass primäre Sporozysten des Nematoden *S. mansoni* während der *in vitro* Kultivierung eine Vielzahl an Glykoproteinen synthetisieren und sekretieren (Lodes und Yoshino 1989; Crews-Oyen und Yoshino 1995), denen antioxidative Eigenschaften nachgewiesen wurden (Connors *et al.* 1991). Das Protein Sm16.8 in *S. mansoni* ist vorrangig mit einer antiinflammatorischen Aktivität assoziiert (Ramaswamy *et al.* 1995-1996).

In einer Studie von Liu *et al.* 2009 zum exkretorisch-sekretorischen Proteom adulter Würmer von *Schistosoma japonicum* wurden mittels LC-MS/MS insgesamt 101 *S. japonicum* Proteine – davon 53 sekretierte Proteine – und sieben Wirtspoteine identifiziert. Unter allen identifizierten Proteinen wurde das FABP, ein Fettsäurebindendes Protein, als häufigstes ES-Protein von *S. japonicum* im *in vitro* ES-Proteom identifiziert. Schistosomen sind nicht in der Lage Fettsäuren *de novo* zu synthetisieren und daher auf die Nährstoffe des Wirts angewiesen (Liu *et al.* 2009). Die größte Proteinfamilie machte die Gruppe der Hitzeschockproteine (HSP) aus, so z.B. HSP-70s, HSP-90 α , HSP-4 und HSP-97. HSP-70s wurde am häufigsten identifiziert. Hitzeschockproteine werden traditionell als zytosolische molekulare Chaperone angesehen. Studien zeigen, dass sie aber auch von dualen immunregulatorischen Effekten wie Immunstimulation und -suppression Gebrauch machen (Asea 2008; Pockley *et al.* 2008). Das HSP-70 in *Toxoplasma gondii* induziert die

Immunsuppression durch Reduzierung der Stickoxid-Bildung sowie durch Stimulation einer kontinuierlichen Produktion von Th2-Zytokinen (Ahmed *et al.* 2004). Als weiteres häufiges ES-Protein wurde das Aktin-bindende Protein 14-3-3, ein im exkretorischen System und der Hülle weiblicher *S. mansoni* Würmer vorkommendes Protein, nachgewiesen (Schlechtmann *et al.* 2001).

Aus der Gruppe der Strukturproteine (Zytoskelett- und Muskelproteine eingeschlossen) wurden vorrangig Aktine (Aktin-1 und -2), Tubuline, Titine, Paramyosine und Myophilline identifiziert, die möglicherweise aus Zellresten toter Würmer resultierten. Allerdings wurden Aktin und Paramyosin, die beide im Zytoskelett und in den Muskelzellen vorkommen, auch bereits auf der Oberfläche der Schistosomen nachgewiesen (Matsumo *et al.* 1988), was ebenfalls die Begründung für die Anwesenheit dieser Proteine in den ES-Produkten sein könnte (Liu *et al.* 2009).

Ebenso wurden eine Aminopeptidase, eine Enolase und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase identifiziert. Unter den sieben Wirtsproteinen, die innerhalb der ES-Produkte von *S. japonicum* identifiziert wurden, waren das antimikrobielle Protein CAP-18, Immunglobuline und eine Komplement-Komponente, die möglicherweise selektiv durch spezifische Oberflächenrezeptoren absorbiert wurden, wie es schon bei *S. mansoni* beschrieben wurde (Tarleton und Kemp 1981). Eine Reihe zytosolischer glykolytischer Enzyme wie die Pyruvat-Kinase, Enolase und GADPH sowie einige Detoxifikationsmoleküle wie TPX-1, TPX-2, SOD, GSTs und die Thioredoxin-Gluthathion-Reduktase wurden ebenfalls identifiziert (Liu *et al.* 2009).

In einer Studie u.a. des Shanghai Veterinary Research Institutes in China über das ES-Proteom 14 Tage alter Schistosomula von *S. japonicum*, zeigte eine Analyse, dass die identifizierten Proteine hauptsächlich im Kohlenhydratstoffwechsel und in der Proteindegradation involviert waren – korrelierend mit der Hypothese, dass der parasitäre Stoffwechsel Kohlenhydrate als Hauptenergiequelle nutzt, um so in der anaeroben Umgebung überleben zu können (Cao *et al.* 2016).

Vergleicht man die Sekretome von *S. japonicum* und *C. elegans*, zeigt sich, dass der größte Bestandteil des ES-Proteoms in *S. japonicum* aus Fettsäure-bindenden Proteinen besteht. Die dominierende Proteinfamilie stellten die Hitzeschockproteine dar, darunter HSP-70, HSP-90 und HSP-97. Andere wichtige ES-Proteine von *S. japonicum* sind Aminopeptidasen, Enolasen und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Das

Sekretom von *C. elegans* hingegen besteht überwiegend aus Proteinen der Familie der Strukturproteine und des Metabolismus.

4.4.3 *Ascaris suum*

Ascaris suum, der Schweinespulwurm, ist neben *Ascaris lumbricoides*, welcher den Mensch befällt, der häufigste Darmparasit weltweit und der Erreger der Ascariasis. Nach digestiver Aufnahme von Eiern, welche bereits das infektiöse L2-Stadium beinhalten, durchstoßen die Larven auf Höhe des Caecums die Darmwand, vollziehen eine Wanderung über die *V. portae* in die Leber, woraus eine autoinduzierte Entzündungsreaktion in der Leber und der Lunge eingeleitet wird (Wang *et al.* 2013). Hierbei korreliert die Anzahl der inkorporierten Eier mit dem Ausprägungsgrad der Immunantwort. Es konnte eine Produktion von B-Zellen und CD4⁺-T-Zellen in den lokalen Lymphknoten gesehen werden (Jungersen *et al.* 2001). Nach weiteren Häutungen bis zur L4-Larve schließt sich letztlich der Kreislauf über Repassage in den Gastrointestinaltrakt, in dem die nun adulten Würmer herangewachsen sind. Nach Fertilisation der Eier, welche mit der Faeces ausgeschieden werden, können diese einen potentiellen neuen Wirt infizieren. Die Dauer dieses beschriebenen Zyklus beträgt ca. sechs bis acht Wochen (Wang *et al.* 2013).

Anhand von Genomanalysen geht man davon aus, dass das Sekretom 775 Proteine mit diversen Funktionen umfasst. Nennenswert in diesem Zusammenhang sind 68 sezernierte Proteasen, darunter 20 Serinproteasen (S9- und S33-Familie), 18 Metalloproteasen (M10-, M12-, M41-Familie) und fünf Cysteinproteasen (C1- und C13-Familie). Andere Anteile des *A. suum* Sekretoms werden der Steuerung oder Umgehung der Immunantwort zugeschrieben. Diese Proteine umfassen das Homolog der LAP von *A. viteae*, welches die B- und T-Zell-Antwort und Mastzellproliferation inhibiert und eine alternative Aktivierung der Wirtsmakrophagen durch die Inhibierung des Toll-like-Rezeptor-Signalweges induziert. Zudem wurden immunmodulatorische Moleküle für *A. suum* beschrieben, darunter Homologe von B-Zell-Inhibitoren, das *B. malayi* Cystatin CPI-2, einige Homologe von TGF- β und Makrophagen-Aktivierungsfaktoren, vielzählige Neutrophileninhibitoren, verschiedene Oxidoreduktasen und fünf nahe Homologe des Thrombozytenfaktors alpha. *A. suum*

umfasst somit eine große Anzahl an potentiellen ES-Proteinen, die in die direkte Manipulation oder Umgehung der Immunantwort involviert sein könnten (Wang *et al.* 2013).

In einer Proteomanalyse wurden erste ES-Produkte von *A. suum* und mehrere Serpine in Form von Serinproteaseinhibitoren identifiziert. Ähnliche Proteine wurden auch in *C. elegans* gefunden. Serpine regulieren die Enzymaktivität von Proteasen, Serinproteaseinhibitoren hemmen wiederum die Enzymaktivität von Serinproteasen und haben eine Vielzahl an anderen biologischen Funktionen. Die homologen Gene 3 und 8 wurden bereits im Genom von *C. elegans* identifiziert (Zang und Maizels 2001). Die Serpine in ES-Produkten von Nematoden sollen in der Lage sein, die immunologischen Reaktionen oder Funktionen abzuschwächen (Molehin *et al.* 2012). Die Aktivität bestimmter Wirtsproteasen, wie z.B. Trypsin und Chymotrypsin, kann hierbei stark durch das Mikro-Umfeld der jeweiligen Nematode beeinflusst werden und zu einem Anstieg der Serpine führen (Wang *et al.* 2013). Man vermutet, dass die Serinproteaseinhibitoren nicht nur einen protektiven Effekt auf den sich im Gastrointestinaltrakt des Wirts befindlichen Nematoden haben, sondern auch die Oberfläche der sich entwickelnden Larven maskieren, damit diese dem Immunsystem des Wirts während ihrer Passage durch den Wirt entgehen können (Wang *et al.* 2013). Das Protein 14-3-3 aus der Proteinfamilie der regulatorischen Proteine wurde ebenso identifiziert. In *C. elegans* reguliert ein 14-3-3 Protein den DAF-2/*insulin-like* Signalweg, der ausschlaggebend für die Regulation der Entwicklung der Langlebigkeit, des Stoffwechsels und der Widerstandsfähigkeit gegenüber Stressoren ist (Li *et al.* 2007). Über die genaue Funktion in Parasiten ist jedoch nur wenig bekannt. Die Identifizierung von 16 Proteinen aus der Familie der Glykosylhydrolasen der Familie 31 (GH31) war überraschend, da bisher keine andere Studie über die Anwesenheit solcher Enzyme in ES-Produkten von Nematoden berichtet hat. In *C. elegans* und *B. malayi* wurden nur vier Gene des Proteins GH31 im Genom erwähnt (Wang *et al.* 2013). In *A. suum* konnte die höchste Glykosidaseaktivität in intestinalen Proteinextrakten von adulten Würmern nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass die meisten Nährstoffe von *A. suum* aus den teils verdauten Speiseresten im Darm des Wirts stammen (Hall *et al.* 2008). Möglicherweise bildet der Kohlenhydratabbau einen essentiellen Teil des Energiestoffwechsels dieses Parasiten, sobald sich dieser im Darm

niedergelassen hat. Betrachtet man weitere ES-Produkte mit immunologischer Bedeutung, so wird PAS-1 (Protein 1 von *A. suum*) eine immunsuppressive Funktion zugeschrieben (Antunes *et al.* 2014). In Mäusen konnte durch Ovalbumin-Immunisierung die Th1- und Th2-Immunantwort durch hochmolekulare Extrakte aus *A. suum* herabgesetzt werden, indem die T-Lymphozyten-Aktivierung mithilfe dendritischer Zellen über einen IL-10 gesteuerten Mechanismus herunterreguliert wurde. Einen wesentlichen Bestandteil zur Klärung solcher bedeutenden Funktionen spielen dabei verschiedenste Rezeptoren wie z. B. die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 (Favoretto *et al.* 2013).

Vergleicht man nun das Sekretom von *A. suum* mit dem von *C. elegans*, fällt auf, dass bei *A. suum* viele ES-Proteine mit potentiell immunologischer Bedeutung identifiziert wurden. In *C. elegans* wurde dahingegen eine Vielzahl noch uncharakterisierter Proteine identifiziert, deren Funktion es noch aufzuklären gilt.

4.5 Veränderungen des Sekretoms durch RNAi

Für die RNAi-Versuche wurden drei Proteine ausgewählt. Das Protein ASP-6, wurde ausgewählt, da es das erste ES-Produkt von *C. elegans* ist, welches als PC-modifiziert beschrieben wurde (Grabitzki *et al.* 2008). ASP-2 wurde vergleichend dazu ausgewählt wurde, da es ebenfalls als ES-Produkt identifiziert wurde und homologe Proteine bei *B. malayi* (Moreno und Geary 2008; Hewitson *et al.* 2014, 2008; O'Regan *et al.* 2014) sowie bei *S. japonicum* (Liu *et al.* 2009; Cao *et al.* 2016) beschrieben wurden. Schließlich wurde die GalNAc-Transferase GLY-10 ausgewählt, da dieses Protein häufig bei Sekretomanalysen identifiziert wurde und an der O-Glykosylierung sekretorischer Proteine beteiligt ist (Wandall *et al.* 2007).

Nach RNAi *knock-down* zeigten sich die Sekretome im Vergleich zum leeren Kontrollvektor und vergleichend zum analysierten Sekretom von *C. elegans* (siehe Anhang Tabelle 1) sowohl hinsichtlich der Zahl der identifizierten Proteine als auch in ihrer Zusammensetzung jeweils stark verändert. Nach ASP-2 *knock-down* wurden 30 Proteine, nach ASP-6 15, nach GalNAcT 34 und in der Kontrolle 61 Proteine identifiziert.

Nach ASP-6 *knock-down* wurde von den ursprünglich im Sekretom identifizierten 38 Proteinen keines mehr nachgewiesen. Stattdessen wurden 15 neue Proteine identifiziert (siehe Tabelle 8). Hierbei handelte es sich vorwiegend um strukturgebende Proteine wie R13H4.4a (HMP-1), ZC412.3, C09D1.1f (UNC-89), C40D2.3 (MATH-21), Proteine, die an Entwicklungsmechanismen beteiligt sind wie Y51H1A.6b (MCD-1), F37C12.13.a (EXOS-9) und Proteine mit metabolischer Funktion wie FS25C8.4 (ACS-12) und der Protein-Tyrosin-Phosphatase W03F11.4. Von besonderer Bedeutung ist das Strukturprotein C09D1.1f (UNC-89), welches verschiedene Bindungsaktivitäten wie die der ATP oder GTPase hat (Qadota, Blangy *et al.* 2008). Die Proteine Y71G12B.22, F13A2.3, M02F4.1, T13H10.2 und M142.5 sind bisher funktionell nicht näher charakterisiert. Nur ein einziges Protein konnte der Transkription zugeordnet werden (F08D12.10, SDZ-9).

Nach ASP-2 *knock-down* konnten doppelt so viele Proteine wie nach ASP-6 *knock-down* identifiziert werden (siehe Tabelle 9). Die meisten Proteine stammten aus den Klassen Struktur, Entwicklung und Stoffwechsel. Ein einziges Protein, welches zuvor im Sekretom aus dem ersten Teil der Arbeit nachgewiesen werden konnte, wurde auch nach ASP-2 *knock-down* wieder gefunden: Das Myosin-Leichte-Kette-Protein F09F7.2a (MLC-3). Ähnlich zu dem Protein C02A12.4 (LYS-7) konnte das Protein C07A12.4c, eine Protein-Disulfid-Isomerase 2 (PDI-2), identifiziert werden. Hier kann möglicherweise der Rückschluss gezogen werden, dass eine bestimmte Enzymgruppe durch den ASP-2 *knock-down* in der Expression inhibiert, eine andere dafür supprimiert wurde. Vier weitere strukturgebende Proteine wurden identifiziert: Y59A8A.2 (PHF-14), ein Zink-Finger-Protein, F21A10.1a (NSC-4), ein Protein mit Calcium-Ionen-Bindungsfähigkeit, M03F4.2c (ACT-4) mit Aktinfilament-Bindung sowie ein multifunktionales Protein Y105E8B.1a (LEV-11), welches unter anderem an der Organisation der Aktinfilamente, der Morphologie, Zytokinese, Larvenentwicklung, Bewegung und der Regulation der Proteinbindung beteiligt ist (Kagawa *et al.* 1995; *The C. elegans sequencing consortium* 1998; Kagawa *et al.* 1997; Ono und Ono 2002; Dixon und Roy 2005; Gruninger *et al.* 2006). Es konnten deutlich mehr Proteine identifiziert werden, die am Proteinmetabolismus beteiligt sind, als nach ASP-6 *knock-down*. Darunter C07A12.4c (PDI-2), welches Elektronentransport- und Protein-Disulfid-Isomerase-Aktivität besitzt, K02F2.2.2 (AHCY-1), eine

Diskussion

Adenosylhomozysteinase, ZK809.1, mit Tyrosinphosphatase-Aktivität, F11G11.2 (GST-7), mit Glutathion-Transferase-Aktivität, als auch Y106G6A.1, mit ATP- und Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität.

Proteine, die an der Entwicklung beteiligt sind, wie F26D10.3.2 (HSP-1), ein Hitzeschockprotein der Familie 70, F24G8.10a, C07A12.4b (PDI-2), Y38A10A.5.1 (CRT-1), welches an der Chaperon-Faltung über Calcium-Bindung agiert und C16C10.3 konnten ebenfalls identifiziert werden.

Nur das Protein F58D5.4b (KSR-2) konnte der Signaltransduktion zugeordnet werden. *C. elegans* exprimiert sowohl KSR-1 und KSR-2. Beide sind in Ras-gesteuerte Prozesse involviert: KSR-1 in der Myoblastenbewegung, KSR-2 in der Signaltransduktion während der geschlechtlichen meiotischen Entwicklung und der Entwicklung des exkretorischen Systems (Ohmachi *et al.* 2002).

Keiner Gruppe zugeordnet werden konnten die noch nicht funktionell charakterisierten Proteine C44C10.11.2, F15E11.1, F59A2.6, R11A5.3 und F58A6.2.

Im Vergleich zu den identifizierten Proteinen nach ASP-6 *knock-down* konnten nach ASP-2 *knock-down* jeweils zwei Proteine gefunden werden, die an der Translation beteiligt sind: F25H5.4.1 (EEF-2) und F10C2.6 (DARS-2). Ebenso konnten zwei Proteine dem Bereich der Transkription zugeordnet werden: Y32F6A.3 (PAP-1), F58A4.4 (PRI-1). Zusätzlich wurden neue Proteine identifiziert, die an der Energiegewinnung beteiligt sind: H28O16.1d.4 (ATP-3), F20B6.2.2 (VHA-12), C34E10.6.2 (ATP-2) und T01B11.4 (ANT-1).

Nach GalNAcT *knock-down* wurden insgesamt 34 Proteine identifiziert (siehe Tabelle 10). Zwei dieser Proteine, nämlich die Motorproteine MLC-2 und MLC-3, wurden bereits als strukturgebende Proteine im Sekretom von *C. elegans* aus dem ersten Teil der experimentellen Arbeit identifiziert. Der *knock-down* scheint hier also nicht zu einer Inhibierung der Sekretion geführt zu haben.

Vorrangig wurden hier Strukturproteine wie Aktin-4 (ACT-4, M03F4.2c) und das Levamisol-Resistenz-Protein 11 (LEV-1, Y105E8B.1a) identifiziert, ein Tropomyosin mit zentraler Rolle in der Calcium-abhängigen Regulation der Muskelkontraktion, welches vor allem das Protein F-Aktin (UNC-89, C09D1.1a) bindet. UNC-89 wurde jedoch erstaunlicherweise nicht nach GalNAcT *knock-down* gefunden, stattdessen UNC-70. Dies ist erstaunlich, da das Protein LEV-1 an UNC-89 bindet und man davon

Diskussion

ausgehen würde, dass nach *knock-down* eine entsprechende Veränderung auf beide genannten Proteine entstehen würde. Dies war jedoch nicht der Fall. Nur das UNC-89 wurde in seiner Expression im Sekretom unterdrückt.

Funktionell nicht zugeordnet werden konnten folgende Proteine: ZK632.9, ZC196.4, C27H6.8.2, Y57G11C.7, F19B10.3, B0454.9, C06C6.7, F13A2.3, K03E5.2b, F28E10.1a, B0454.9. Als einziges Transportprotein wurde das integrale Membranprotein B0432.4 (MISC-1) identifiziert.

Vergleichend zu den anderen RNAi *knock-downs* konnten nach GalNAcT *knock-down* erstaunlicherweise Proteine identifiziert werden, die als Elongationsfaktoren dienen: R03G5.1d (EFT-4), F54H12.6 (EEF-1B.1) und Y41E3.10a.1 (EEF-1B.2).

Metabolische Funktionen konnten den Proteinen C06H2.1.1 (ATP-5), H28O16.1d.4 (ATP-3), F09E5.15a.1 (PDRX-2), W02D3.5.2 (LBP-2) zugewiesen werden. Das Protein Y105E8A.17a (EKL-4), das an der Histon-Acetylierung beteiligt zu sein scheint, konnte als einziges der Transkription zugeordnet werden.

Proteine, die an der Entwicklung von *C. elegans* beteiligt sind, waren F48G7.5 und C07H6.5.2 (CGH-1), Y51H1A.6b (MCD-1), ein intrazellulär gelegenes Protein mit Zink-Ionen-Bindungsfähigkeit sowie K11C4.3a (UNC-70) als Aktin-Ligand. Weiter konnten drei Chaperone identifiziert werden: C47E8.5.4 (DAF-21), das an der Zellzykluskontrolle und der Signaltransduktion beteiligt ist, DAF-11, eine transmembrane Guanylylcyclase sowie das Hitzeschockprotein HSP-43 (C14F11.a). Zwei neu identifizierte Proteine konnten der Gruppe des Proteinmetabolismus zugeordnet werden: Die Adenosylhomocysteinase (AHCY-1, K02F2.2.2) und die Protein-Disulfid-Isomerase 2 (PDI-2, C07A12.4b).

Nach GalNAcT *knock-down* wurden auffällig viele Proteine aus dem Bereich der Transkription und Translation neu identifiziert, darunter der Replikationsfaktor 4 Untereinheit c (RFC-4, F31E3.3), die DNA-gesteuerte RNA-Polymerase Untereinheit RPOA-1 (Y48E1A.1a), die Untereinheit der DNA-Primase 1 (PRI-1, F58A4.4), das *Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein* (PQN-52, M01E11.4b), das Protein R10E11.1 (CBP-1), welches den Promoter der RNA-Polymerase II positiv reguliert, W06H3.2b (PUS-1), das an der Pseudouridin-Synthese beteiligt ist sowie das *Serrate RNA effector molecule homolog* E01A2.2a.1, welches RNA-Effektormoleküle miteinander verzahnt und als Bindeglied zwischen dem CBC-Komplex (*cap-binding-*

complex) und der miRNA (micro-RNA) dient. Am Metabolismus beteiligt sind die Proteine: C06H2.1.1 (ATP-5), welches am ATP-gebundenen Protonentransport beteiligt ist, F53F1.3, das Oxidoreduktaseaktivität besitzt, Vitellogenin-1 (VIT-1, K09F5.2), ein Speicherprotein mit Transportaktivität für Lipide, die Glutathion-S-Transferase Kappa-1 (GSTK-1, ZK1320.1), die Glykosyltransferase UGT-61 (F39G3.1) und die Chitinase (CHT-3, C25A8.4).

Vergleicht man nun die Sekretome der RNAi *knock-downs* mit den identifizierten Proteinen aus dem *knock-down* mit leerem Kontrollvektor, so zeigen sich deutlichere Übereinstimmungen.

In der Kontrolle wurden insgesamt 61 Proteine identifiziert (Tabelle 11). Das Tropomyosin (TMY-1), auch *levamiosole resistant protein 11* (LEV-11) genannt, (Y105E8B.1a) wurde sowohl nach ASP-2, nach GalNAcT *knock-down* und in der Kontrolle gefunden. Das Protein C09D1.1b (UNC-89) wurde sowohl nach ASP-6 als auch nach GalNAcT *knock-down* gefunden.

Übereinstimmend mit der Kontrolle wurden im Vergleich zum ASP-2 *knock-down* die Proteine F58 A4-4 (PRI-1) und M03F4.2c (ACT-4) gefunden. Nicht identische, aber ähnliche Übereinstimmungen ergaben sich mit dem identifizierten Protein F20B6.2.2 (VHA-12) nach ASP-2 *knock-down* und Y49A3A.2.2 (VHA-13) aus der Kontrolle sowie dem Protein F11G11.2 (GST-7) nach ASP-2 *knock-down* vergleichbar zu dem Protein ZK1320.1 (GSTK-1) aus der Kontrolle. Nach ASP-6 *knock-down* wurde UNC-89 als einziges übereinstimmendes Protein ebenso in der Kontrolle gefunden. Vergleichbare Proteine waren (jeweils nach ASP-6 *knock-down*) das ribosomale Protein F37C12.13 (EXOS-9) im Vergleich zu dem Protein F34H10.1 aus der Kontrolle sowie das Protein C40D2.3 (MATH-21) vergleichend zum Protein M01D1.2 (MATH-34) aus der Kontrolle. ATP-5 (C06H2.1.1) konnte sowohl nach GalNAcT *knock-down* als auch in der Kontrolle identifiziert werden.

Mit insgesamt 14 Proteinen waren die Proteine aus der Gruppe Entwicklung ebenso stark vertreten. Zu den identifizierten Proteinen zählen: K08C9.7, C06H2.1.1 (ATP-5), T25C8.2.1 (ACT-5), F34H10.1, Y41C4A.9.1, Y45F10D.4, ZK563.7 (APY-1), Y71H2AM.1.1, T07D3.7b.1 (ALG-2), Y73B6B1.38 (PUF-11), R06C7.1 (ELF-2c), ZK381.4b (PGL-1), T26C5.5.2, D2030.3 und F52H3.1.1 (LET-268). Es wurden fünf Proteine gefunden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind: Das Protein T12C9.5a

(NHR-109), welches Steroidhormon-Rezeptor-Aktivität sowie sequenzspezifische DNA-bindende Transkriptionsfaktor-Aktivität besitzt, der Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor F55C7.7b (UNC-73), das Protein R07E4.1b, das eine Domäne für Fibronectin Typ III und Ras besitzt, das Protein F20G4.1 (SMGL-1), welches an katabolischen mRNA Prozessen beteiligt zu sein scheint und das Protein C06A12.4a (GCY-27) mit Proteinkinase-Aktivität. Zwölf Proteine konnten als strukturgebende Proteine eingeordnet werden: F46C3.3b (HUM-4), F58G4.1 (MYO-5), T25C8.2.1 (ACT-5), K08C9.7, F34H10.1, ein ribosomales Protein der Familie S27Ae, C09D1.1b (UNC-9), M03F4.2c (ACT-4), F18C5.3 (TAG-184), Y59A8A.2 (PHF-14), ein Zink-Finger-Protein, Y105E8B.1a (LEV-11) und F02A9.6 (GLP-1, EMB-33). Aus der Gruppe der Proteine des Proteinmetabolismus sind zu nennen: C10E2.2.1, ein Zink-Ionen bindendes Protein, Y42A5A.4, F38B7.5 (DUO-1), mit Ubiquitin-Thioesterase-Aktivität, F59F3.5 (VER-4) und Y49A3A.2.2 (VHA-13). Identifizierte Proteine ohne Funktion waren: Y37D8A.4, Y17G7B.10a/b, F41G3.3, C02F12.7 (TAG-278), F48B9.1 (CRB-GAP-1), Y116F11b.11, W10G11.20.2 (DNC-3), Y105C5A, R07C3.7 (FBXC-29), M01A8.2a, Y105C5A.26, C16C8.13, Y57G11C.9c.2 sowie letztlich das Protein F56C9.6a.

Die beobachteten Unterschiede zwischen dem Sekretom von *C. elegans* bei Verwendung des *E. coli*-Stammes OP50 und bei Verfütterung der *E. coli* mit dem RNAi-Kontrollvektor deuten darauf hin, dass die zur Fütterung verwendeten Bakterienstämme einen erheblichen Einfluss auf das Sekretom haben. Daher müssen die Ernährung und evtl. weitere Kulturbedingungen der Nematoden bei der Interpretation der Zusammensetzung des Sekretoms immer mitberücksichtigt werden.

Noch deutlichere Unterschiede waren bei dem Vergleich zwischen dem RNAi-Kontrollvektor und den beiden ASP *knock-downs* zu beobachten. Dies reflektiert sicher den hohen Einfluss dieser beiden Proteasen auf die Zusammensetzung der Sekretome. Ursächlich hierfür könnten die Prozessierung von Nährstoffen aber auch Vorstufen der im Sekretom aufgefundenen Proteine sein.

Auch die Interferenz bei der Glykosylierung von Proteinen durch den *knock-down* der GalNAcT hat ganz offensichtlich dramatische Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Sekretoms. Hierfür dürfte die Beeinflussung der Sekretion von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Glykosylierung verantwortlich sein.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit diente der Methodenoptimierung zur Identifizierung exkretorisch-sekretorischer Proteine des Nematoden *C. elegans* sowie der Untersuchung der Effekte von RNA-Interferenz *knock-downs* der drei ausgewählten Proteine GalNAc-Transferase GLY-10 sowie der Aspartylproteasen ASP-2 und ASP-6 auf die Zusammensetzung des Sekretoms.

Die Proteine aus dem Sekretom von *C. elegans* wurden durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach in-gel Verdau mit Trypsin wurden die Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert. Durch die Methodenoptimierung bei der Probenaufreinigung konnte die Zahl der identifizierbaren Proteine deutlich gesteigert werden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass nach den RNAi *knock-downs* eine geringere Anzahl an Proteinen identifiziert werden konnte als in den Sekretomen aus dem ersten Teil der Arbeit oder dem Sekretom des leeren Kontrollvektors. Es zeigte sich auch eine deutliche Verschiebung innerhalb der funktionellen Proteinklassen. Es dominierten Struktur- und Stoffwechselproteine, während vor allem nach dem ASP-6- und GalNAcT *knock-down* hauptsächlich Proteine mit bislang unbekannter Funktion identifiziert wurden. Bemerkenswert war die Identifikation von Chaperonen nach GalNAcT *knock-down*, welche in keinem anderen Experiment identifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Aspartylproteasen und die GalNAc-Transferase große Bedeutung für die Zusammensetzung des Sekretoms haben. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass die Verwendung von Protease- oder Glykosylierungsinhibitoren ein interessanter und vielversprechender Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien hinsichtlich parasitärer Erkrankungen darstellt, da hiermit evtl. das immunmodulatorische Potential der Sekretome signifikant verändert und die Überlebensfähigkeit parasitärer Nematoden herabgesetzt werden könnte.

6 Summary

This thesis served for the optimization of methods for the identification of excretory-secretory proteins from the nematode *C. elegans* and the investigation of the changes within the secretome protein composition after RNA interference targeting three proteins: the GalNAc-transferase GLY-10, the aspartylprotease 2 and the aspartylprotease 6.

The secretome proteins of *C. elegans* were separated by one- and two-dimensional gel electrophoresis. After in-gel digestion with trypsin, the proteins were identified by mass spectrometry. The method optimization led to a significant increase of the number of identified proteins.

Summarizing, the thesis showed a reduced number of identified proteins after RNA interference knock-down experiments compared to the secretome of the first part of the thesis and the secretome of the control vector. There was a significant change within the functional classes of the identified proteins observed. Structural and metabolic proteins dominated the secretomes, whereas especially after ASP-6 and GalNAcT knock-down proteins with unknown function were highly abundant. The most apparent difference after GalNAcT knock-down was the identification of chaperons, which were not identified in the other RNAi experiments.

The results show that the aspartylproteases and the GalNAc-transferase have significant impact on the composition of the secretomes. This raises the hypothesis that the use of protease- or glycosylation inhibitors might be an interesting and promising approach for the development of new anthelmintic strategies thus changing the immunomodulatory potential of the secretome significantly and lowering the survival of parasitic nematodes.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed, A.K., Mun, H.S., Aosai, F., Piao, L.X., Fang, H., Norose, K. and Yano, A. (2004): "Roles of *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 in ost defence against *T. gondii* infection", *Microbiology and Immunology* 48:911-915.
- Al-Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R. and Dale, P.J. (1998): "Transcriptional and post-transcriptional plant gene silencing in response to a pathogen", *Science* 279: 2113-2115.
- Alpatov, R., Munguba G.C., Caton P., Joo J.H., Shi Y., Shi Yu., Hunt M.E. and Sugrue S.P. (2004): "Nuclear speckle-associated protein Pnn/Drs binds to the transcriptional corepressor CtBP and relieves CtBP-mediated repression of the E-cadherin gene", *Molecular Cell Biology* 24 (23): 10223-10235.
- Altun, Z., F. and Hall, D.H. (2009): "Introduction", In: *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.1
- Ambler, R.P. and Wynn, M. (1973): "The amino acid sequences of cytochromes c-551 from three species of *Pseudomonas*", *Biochemical Journal* 131(3):485-498.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T. H. and Vance, V. B.(1998): "A viral suppressor of gene silencing in plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:13079-13084.
- Antebi, A. (2006): "Nuclear hormone receptors in *C. elegans*", *WormBook* 3:1-13.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, Jr., J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C. (2007): "Protective immune mechanisms in helminth infection", *Nature Reviews of Immunology* 7(12):975-987.
- Antunes, M.F.P, Titz, T.O., Batista, I.F.C., Marques-Porto, R., Oliveira, C.F., Alves de Araujo, C.A. and Macedo-Soares, M.F. (2014): "Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*", *Journal of Helminthology* 89 (3): 367-374.
- Appasani, K. (2005): "RNA Interference Technology. From Basic Science to Drug Development", *Cambridge University Press*:29-45.
- Arruda, L.K. and Santos, A.B. (2005): "Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease", *Current Opinions in Allergy and Clinical Immunology* 5:399–402.
- Asea, A. (2008): "Heat shock proteins and toll-like receptors", *Handbook of Experimental Pharmacology* 183:111-127.

- Avery, O.T., MacLeod, C.M. and McCarty, M. (1944): "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types", *The Journal of Experimental Medicine* 79:137-158.
- Babu, S., Blauvelt, C.P., Kumaraswami, V. and Nutman, T.B. (2006): "Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence", *Journal of Immunology* 176:3248–3256.
- Badano, J., Mitsuma, N., Beales, P. and Katsanis, N. (2006): "The ciliopathies: An emerging class of human genetic disorders", *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7:125-148 .
- Balklava Z., Pant, S., Fares, H. and Grant, B.D. (2007): "Genome-wide analysis identifies a general requirement for polarity proteins in endocytic traffic", *Nature Cell Biology* 9(9):1066-1073.
- Bargmann, C. I. (2001): "High-throughput reverse genetics: RNAi screens in *Caenorhabditis elegans*", *Genome Biology* 2001, 2(2): reviews1005.1–reviews1005.3.
- Baulcombe, D. (2000): "Unwinding RNA silencing", *Science* 290:1108-1109.
- Baumeister, S., Dennis, R.D., Klünder, R., Schares, G., Zahner, H. and Geyer, E. (1994): "*Litomosoides carinii*: macrofilariae-derived glycolipid-chromatography, serology and potential in the evaluation of anthelmintic efficacy", *Parasite Immunology* (12):629-641.
- Becker, M.M., Harrop, S.A, Dalton, J.P., Kalinna, B.H., McMANus, D.P. and Brindle, P.J. (1995): "Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation", *Journal of Biological Chemistry* 270(14):24496-24501.
- Benian, G.M., Tinley, T.L., Tang, X. and Borodovsky, M. (1996): "The *Caenorhabditis elegans* gene *unc-89*, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains", *The Journal of Cell Biology* 132 (5):835-848.
- Bennuru, S., Semnani, R., Meng, Z., Ribeiro, J.M.C., Veenstra, T.D. and Nutmann, T.D (2009): "*Brugia malayi* Excreted/Secreted Proteins at the Host/Parasite Interface: Stage and Gender-Specific Proteomic Profiling", *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(4): e410.
- Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (2000): "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA", *Reviews in Medical Virology* 10:355-371.
- Birnby, D.A., Link, E.M., Vowels, J.J., Tian, H., Colacurcio, P.L. and Thomas. J.H. (2000): "A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*", *Genetics* 155 (1):85-104.

- Blaque, O.E., Reardon, M.J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M.R., Ansley, S.J., Badano, J.L., Mah, A.K., Beales, P.L., Davidson, W.S., Johnsen, R.C., Audeh, M., Plasterk, R.H.A., Baille, D.L., Katsanis, N., Quarmby, L.M., Wicks, S.R. and Leroux, M.R. (2004): "Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport", *Genes Development* 18(13):1630-1642.
- Blomberg, N., Baraldi, E., Sattler, M., Saraste, M. and Nilges, M. (2000): "Structure of a PH Domain From the *C. elegans* Muscle Protein UNC-89 Suggests a Novel Function", *Structure* 8 (10):1079-1087.
- Blomberg, N. and Nilges, M. (1997): "Functional diversity of PH domains: an exhaustive modelling study", *Fold. Des.* 2 (6):343-355.
- Bloom, B.R. and Bennett, B. (1966): "Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity", *Science* 153:80-82.
- Boag, P.R., Nakamura, A. and Blackwell, T.K. (2005): "A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*", *Development* 132 (22):4975-4986.
- Boehnisch, C., Wong, D., Habig, M., Isermann, K., Michiels, N.K., Roeder, T., May, R.C. and Schulenburg, H. (2011): "Protist-Type Lysozymes of the Nematode *Caenorhabditis elegans* Contribute to Resistance against Pathogenic *Bacillus thuringiensis*", *PloS One* 6(9):e24619.
- Boulton, S.J., Gartner, A., Reboul, J., Vaglio, P., Dyson, N., Hill, D.E. and Vidal, M. (2001): "Combined Functional Genomic Maps of the *C. elegans* DNA Damage Response", *Science* 295:127-131.
- Boutros, M. and Ahringer, J. (2008): "The art and design of genetic screens: RNA interference", *Nature Reviews Genetics* 9(7):554-566.
- Brenner, S. (1976): "Complexe genetic programmes" Mainz: Akademie der Wissenschaft und der Literatur Wiesbaden: Steiner (in Kommentar).
- Brown, A., Girod, N., Billett, E.E. and Pritchard, D.I. (1999): "*Necator americanus* (human hookworm) aspartyl proteinases and digestion of skin macromolecules during skin penetration", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60:840-847.
- Cao, X., Fu, Z., Zhang, M., Han, Y., Han, Q., Lu, K., Li, H., Zhu, C., Hong, Y. and Lin, J. (2016): "Excretory/secretory proteome of 14-day schistosomula, *Schistosoma japonicum*", *Journal of Proteomics*. 130:221-230.
- Cao, Z-Q. and Guo, X-L. (2016): "The role of galectin-4 in physiology and diseases", *Protein & Cell* 7(5):314-324.

- Ceron, J., Rual, J.F., Chandra, A., Dupuy, D., Vidal, M. and van den Heuvel, S. (2007): “Large-scale RNAi screens identify novel genes that interact with the *C. elegans* retinoblastoma pathway as well as splicing-related components with synMuv B activity”, *BMC Developmental Biology* 7:30.
- Cech, T.R. (2000): “The Ribosome is a Ribozyme”, *Science* 11(289):878879.
- Chew, Y.L., Fan, X., Götz, J. and Nicholas, H.R. (2013): “Aging in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*“, *Communitative and Integrative Biology* 6(5): e25288, DOI: 10.4161/cib.25288.
- Cipollo, J.F., Awad, A.M., Costello, C.E. and Hirschberg, C.B. (2005): “N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages”, *Journal of Biological Chemistry* 280(28):26063-26072.
- Cohen, M., Tzur, Y.B., Neufeld, E., Feinstein, N., Delannoy, M.R., Wilson, K.L. and Gruenbaum, Y. (2002): “Transmission electron microscope studies of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans* embryos”, *Journal of Structural Biology* 140 (1-3):232-240.
- Connors, V.A., Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. (1991): “Identification of a *schistosoma mansoni* sporocysts excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes”, *Journal of Invertebrate Pathology* 58:387-395.
- Cooper, D.N. and Barondes, S.H. (1999): “God must love galectins; he made so many of them”, *Glycobiology* 9(10):979-984.
- Corsi, A., K., Wightman, B. and Chalfie, M., A. (2015): “A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*”, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, doi/10.1985/wormbook1.177.1.
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J. and Priess, J.R. (1998): “A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo”, *Journal of Cell Biology* 141 (1):297-308.
- Crews-Oyen, A.E. and Yoshino, T.P. (1995): “*Schistosoma mansoni*: characterization of excretory-secretory polypeptides synthesized in vitro by daughter sporocysts”, *Experimental Parasitology* 80:27-35.
- Crick, F.H., Barnett, L., Brenner, S. and Watts-Tobin, R.J. (1961): “General nature of the genetic code for proteins”, *Nature* 192 (4809): 1227-32.
- Crowe, J., Lumb, F.E., Harnett, M.M., Harnett, W. (2017): “Parasite excretory-secretory products and their effects on metabolic syndrome“, *Parasite Immunology* 9(5): doi: 10.1111/pim.12410. Epub 2017 Mar 26.
- Crittenden, S.L., Rudel D., Binder J., Evans T.C. and Kimble J. (1997): “Genes required for GLP-1 asymmetry in the early *Caenorhabditis elegans* embryo”, *Developmental Biology* 181:36-46.

- Cui, M., Kim, E.B. and Han, M. (2006): "Diverse chromatin remodeling genes antagonize the Rb-involved SynMuv pathways in *C. elegans*", PLoS Genetics 2 (5):e74.
- Cummins, C. and Anderson, P. (1988): "Regulatory myosin light-chain genes of *Caenorhabditis elegans*", Molecular Cell Biology 8 (12):5339-5349.
- Curwen, R.S., Ashton, P.D., Sundaralingam, S. and Wilson, R.A. (2006): "Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry", Molecular Cell Proteomics 5(5):835-844.
- Damian, R.T. (1997): "Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections", Parasitology 115:169-175.
- Daniels, M.A., Hogquist, K.A. and Jameson, S.C. (2002): "Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses", Nature of Immunology 3:903-910.
- Danilowicz-Luebert, E., Steinfelder, S., Kuhl, A.A., Drozdenko, G., Lucius, R., Worm, M., Hamelmann, E. and Hartmann, S. (2013): "A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive Th2 inflammation", International Journal of Parasitology 43:201-210.
- David, J.R. (1966): "Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction", Proceedings of the National Academy of Science 56:72-77.
- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S. and Dennis, J.W. (2001): "Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation", Nature 409:733-739.
- Dillin, A., Hsu, A., L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Kenyon, C. (2002): "Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development", Science 298:2398-2401.
- Dixon, S.J. and Roy P.J. (2005): "Muscle arm development in *Caenorhabditis elegans*", Development 132 (13):3079-3092.
- Eastburn, D.J. and Han, M. (2005): "A gain-of-function allele of *cbp-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the mammalian CBP/p300 gene, causes an increase in histone acetyltransferase activity and antagonism of activated Ras", Molecular Cell Biology 25(21):9427-9434.
- Edman, P. (1949): "A method of the determination of amino acid sequences in peptides", Archives of Biochemistry and Biophysics 22 (3):475.
- Fallon, P.G. and Mangan, N.E. (2007): "Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection", Nature Reviews Immunology 7:220-230.

- Favoretto, B.C., Silva, S.R., Jacysyn, J.F., Câmara, N.O.S. and Faquim-Mauro, E.L. (2013): “TLR-2- and 4-independent immunomodulatory effect of high molecular weight components from *Ascaris suum*”, *Molecular Immunology* 58:14-56.
- Files, J.G., Carr, S. and Hirsh, D. (1983): “Actin gene family of *Caenorhabditis elegans*”, *Journal of Molecular Biology* 164 (3):355-375.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998): “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*”, *Nature* 391(6669):806-811.
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. and Moerman, D. (1991): “Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle”, *Development* 113: 503-514.
- Fields, S. and Song, O. (1989): “A novel genetic system to detect protein-protein interactions”, *Nature* 340: 245-246.
- Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000): “Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference”, *Nature* 408 (6810):325-330.
- Freemont, P.S. (1993): “The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger”, *Annals of the New York Academy of Science* 684:174-192.
- Friedl, C.H., Lochnit, G., Zähringer, U., Bahr, U. and Geyer, R. (2003): “Structural elucidation of zwitterionic carbohydrates derived from glycosphingolipids of the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*”, *Biochemical Journal* 369:89-102.
- Friend K., Campbell, Z.T., Cooke, A., Kroll-Conner, P., Wickens, M.P. and Kimble, J. (2012): “A conserved PUF-Ago-eEF1A complex attenuates translation elongation”, *Nature Structural and Molecular Biology* 19 (2):176-183.
- Fuchs, F., Ingelfinger, D., Steinbrink, S. und Boutros, M. (2006): „Funktionelle Genomik. Genomweite RNAi-screens”, *BioSpektrum* 12: 610-614.
- Furukawa, M., He, Y.J., Borchers, C. and Xiong, Y. (2003): “Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases”, *Nature Cell Biology* 5:1001-1007.
- Gallo, M., Park, D., Luciani, D.S., Kida, K., Palmieri, F., Blacque, O.E., Johnson, J.D. and Riddle, D.L. (2011): “MISC-1/OGC Links Mitochondrial Metabolism, Apoptosis and Insulin Secretion”, *PloS One* 6(3):e17827.
- Gbewonyo, K., Rohrer, S.P., Lister, L., Burgess, B., Cully D. and Buckland, B. (1994): “Large scale cultivation of the free living nematode *Caenorhabditis elegans*”, *Biotechnology* 12:50-54.

- Geier, G., Banaj, H.-J., Heid, H., Bini, L., Pallini, V. and Zwilling, R. (1999): "Aspartylproteases in *Caenorhabditis elegans*", *European Journal of Biochemistry* 264:872-879.
- Geldhof, P., Claerebout, E., Knox, D.P., Jagneessens, J. and Vercruyssen, J. (2000): "Proteinases released in vitro by the parasitic stages of the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*", *Parasitology* 121, 639-647.
- Gems, D.H., Ferguson, C.J., Robertson, B.D., Page, A.P., Blaxter, M.L. and Maizels, R.M. (1995): "An abundant, *trans-spliced* mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encode a 26 kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine binding proteins", *Journal of Biological Chemistry* 270:18517-18522.
- Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J. and Wolf, D.A. (2003): "BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases", *Molecular Cell* 12:783-790.
- Ghazi, A., Henis-Korenblit, S. and Kenyon, C. (2007): "Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by a proteasomal E3 ligase complex", *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 104 (14):5947-5952.
- González-Aguilera, C., Palladino, F. and Askjaer, P. (2013): "*C. elegans* epigenetic regulation in development and aging", *Briefings in Functional Genomics* 13(3):223-234.
- Goodridge, H.S., Wilson, E.H., Harnett, W., Campbell, C.C., Harnett, M.M. and Liew, F.Y. (2001): "Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*", *The Journal of Immunology* 167(2):940-950.
- Gottesman, S. (2004): "The small RNA regulators of *Escherichia coli*: Roles and mechanisms", *Annual Review of Microbiology* 58:303-328.
- Gottschalk, A., Almedom, R.B., Schedletzky, T., Anderson, S.D., Yates, J.R. and Schafer, W.R. (2005): "Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*", *The EMBO Journal* 24 (14):2566-2578.
- Gönczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S.J., Copley, R.R., Dupéron, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A.M., Martin, C., Ozlü, N., Bork, P. and Hyman, A.A. (2000): "Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III", *Nature*. 408 (6810):331-336.
- Grabitzki, J. and Lochnit, G. (2009): "Immunomodulation by Phosphocholine-Biosynthesis, Structures and Immunological Implications of Parasitic PC-epitopes", *Molecular Immunology* 47 (2-3):149-163.

- Grabitzki, J., Ahrend, M., Schachter, H., Geyer, R. and Lochnit, G. (2008): "The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins", *Molecular and Biochemical Parasitology* 161(2):101-111.
- Grabitzki, J., Lochnit, G., Henkel, B., Tavernakis, N. and Geyer, R., (2006): "First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from *Caenorhabditis elegans*: isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6", *Biological Chemistry*, 387(10-11):1487-1493.
- Green, R.A., Kao, H.L., Audhya, A., Arur, S., Mayers, J.R., Fridolfsson, H.N., Schulman, M., Schloissnig, S., Niessen, S., Laband, K., Wang, S., Starr, D.A., Hyman, A.A., Schedl, T., Desai, A., Piano, F., Gunsalus, K.C. and Oegema, K. (2011): "A high-resolution *C. elegans* essential gene network based on phenotypic profiling of a complex tissue", *Cell*. 145(3):470-482.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J. and Aroian, R.V. (2005): "Glycolipids as Receptors for *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin", *Science* 307 (5711):922-925.
- Gruninger, T.R., Gualberto, D.G., LeBoeuf, B. and Garcia, L.R. (2006): "Integration of male mating and feeding behaviors in *Caenorhabditis elegans*", *The Journal of Neuroscience* 26(1):169-179.
- Hall, A., Hewitt, G., Tuffrey, V. and de Silva, N. (2008): "A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition", *Maternal & Child Nutrition* 4(1):118-236.
- Hannak, E., Oegema, K., Kirkham, M., Gönczy, P., Habermann, B., Hyman, A.A. (2002): "The kinetically dominant assembly pathway for centrosomal asters in *Caenorhabditis elegans* is gamma-tubulin dependent", *Journal of Cell Biology* 157:591-602.
- Hannon, J. (2003): "RNAi: A Guide to Gene Silencing", Cold Spring Harbour, New York:4.
- Hansen, M., Hsu, A.L., Dillin, A. and Kenyon, C. (2005): "New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen", *PLoS Genetics* 1(1):119-128.
- Harnett, W. (2014): "Secretory products of helminth parasites as immunomodulators", *Molecular and Biochemical Parasitology* 195(2):130-6.
- Harnett, W., Harnett, M.M. and Byron, O. (2003): "Structural/functional aspects of ES-62-a secreted immunomodulatory phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein", *Current Protein and Peptide Science* 4(1): 59-71.
- Harnett, W. and Harnett, M.M. (2001): "Modulation of the host immune system by phosphorylcholine-containing glycoproteins secreted by parasitic filarial nematodes", *Biochimica et Biophysica Acta* 1539(1-2):7-15.

- Harnett, W., Harnett, R.M. and Parkhouse, E. (1995): “Nature and function of parasitic nematode surface and excretory-secretory antigens”, Perspectives in Nematode Physiology and Biochemistry. M. L. Sood and J. Kapur, editors. Narendra Publishing House, Delhi:207–242.
- Harnett, W., Frame, M.J, Nor, Z.M, MacDonald, M. and Houston, K.M. (1994): “Some preliminary data on the nature/structure of the PC-glycan of the major excretory-secretory produkt E-62 of *Acanthocheilonema viteae* (ES-62)”, Parasite (2):179-181.
- Harrop, S.A., Prociw, P. and Brindley, P.J. (1996): “Acasp, a gene encoding a cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum*”, Biochemical and Biophysical Research Communications 227:294–302.
- Haslam, S.M., Gems, D., Morris, H.R. and Dell, A. (2002): “The glycomes of *Caenorhabditis elegans* and other model organisms”, Biochemical Society Symposia (69):117-134.
- Hewitson, J.P, Rückerl, D., Harcus, Y., Murray, J., Webb, L.M., Babayan, S.A., Allen, J.E., Kurniawan, A. and Maizels, R.M. (2014): “The secreted triose phosphate isomerase of *Brugia malayi* is required to sustain microfilaria production in vivo”, Plos Pathology 10(2):e1003930.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M. (2009): “Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity“, Molecular Biochemical Parasitology 167(1-9):1-11.
- Hewitson, J.P., Harcus, Y.M., Curwen, R.S., Dowle, A.A., Atmadja, A.K., Ashton, P.D., Wilson, A. and Maizels, R.M. (2008): “The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products”, Molecular Biochemical Parasitology 160(1):8-21.
- Holley, R.W., Apgar J., Everett G.A., Madison J.T., Marquicee M., Merrill, S.H., Penswick J.R. and Zamir A. (1965): “Structure of a Ribonucleic Acid”, Science 147:1462–1465.
- Hope, I.A. (1999): “*C. elegans*. A practical approach”, Oxford University Press Inc, New York:1-13.
- Hübschmann, H.-J. (2009): “Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications. Second edition”, WILEY-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim:231.
- Ibrahim, H.M., Bannai, H., Xuan, X. and Nishikawa, Y. (2009): “*Toxoplasma gondii* Cyclophilin 18-Mediated Production of Nitric Oxide Induces Bradyzoite Conversion in a CCR5-Dependent Manner”, Infection and Immunity 77(9):3686–3695.
- Inoue, T., Hirata, K., Kuwana, Y., Fujita, M., Miwa, J., Roy, R. and Yamaguchi, Y. (2006): “Cell cycle control by daf-21/Hsp90 at the first meiotic prophase/metaphase boundary during oogenesis in *Caenorhabditis elegans*”, Development, Growth and Differentiation 48(1):25-32.

- Inoue, T., Takamura, K., Yamae, H., Ise, N., Kawakami, M., Tabuse, Y., Miwa, J. and Yamaguchi, Y. (2003): “*Caenorhabditis elegans* DAF-21 (HSP90) is characteristically and predominantly expressed in germline cells: spatial and temporal analysis”, *Development, Growth and Differentiation* 45(4):369-376.
- Ishikawa, H. and Marshall, W. (2011): “Ciliogenesis: building the cell's antenna”, *Molecular Cell Biology* 12:222-234.
- Jenkins, S.J., Hewitson, J.P., Jenkins, G.R. and Mountford, A.P. (2005): “Modulation of the host's immune response by schistosome larvae”, *Parasite Immunology* 27:385–393.
- Jungblut, P.R., Holzhütter, G.H., Alpweiler, R. and Schlüter, H. (2008): “The speciation of the proteome”, *Chemistry Central Journal* 2(16):1-10.
- Jungblut, P.R. und Schlüter, H. (2008): „Proteinbiochemie-Proteinanalytik-Proteomics“, *BioSpektrum* 14. Jahrgang 01.08., *Wissenschaft Special: Proteinanalytik/-Aufreinigung*.
- Jungersen, G., Eriksen, L., Nansen, P., Lind, P., Rasmussen, T. and Meeusen, E.N.T. (2001): “Regional immune responses with stage-specific antigen recognition profiles develop in lymph nodes of pigs following *Ascaris suum* larval migration”, *Parasite Immunology* 23:185-194.
- Kaji, H., Kamiie, J., Kawakami, H., Kido, K., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Takahashi, N. and Isobe, T. (2007): “Linked glycoprotein diversity in *Caenorhabditis elegans* and suggests an atypical translocation mechanism for integral membrane proteins”, *Molecular and Cellular Proteomics* 6:2100-2109.
- Kaji, H., Saito, H., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Hirabayashi, J., Kasai, K., Takahashi, N. and Isobe, T. (2003): “Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins”, *Nature Biotechnology* 21:667-672.
- Kagawa, H., Takuwa, K. and Sakube, Y. (1997): “Mutations and expressions of the tropomyosin gene and the troponin C gene of *Caenorhabditis elegans*”, *Cell Structure and Function* 22(1):213-218.
- Kagawa, H., Sugimoto, K., Matsumoto, H., Inoue, T., Imadzu, H., Takuwa, K. and Sakube, Y. (1995): “Genome structure, mapping and expression of the tropomyosin gene *tmy-1* of *Caenorhabditis elegans*”, *The Journal of Molecular Biology* 251(5):603-613.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003): “Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi”, *Nature*. 421(6920):231-237.
- Kamath, R.S. and Ahringer, J. (2003): “Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*”, *Nature*. 30(4):313-321.

- Kao, G., Huang, C.-C., Hedgecock, E.M., Hall, D.H. and Wadsworth, W.G. (2006): "The role of the laminin β subunit in laminin heterotrimer assembly and basement membrane function and development in *C. elegans*", *Developmental Biology* 290:211-219.
- Karabinos, A., Schmidt, H., Harborth, J., Schnabel, R. and Weber, K. (2001): "Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development", *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 98(14):7863-7868.
- Karala, A.R., Psarrakos, P., Ruddock, L.W. and Klappa, P. (2007): "Protein disulfide isomerases from *C. elegans* are equally efficient at thiol-disulfide exchange in simple peptide-based systems but show differences in reactivity towards protein substrates", *Antioxidants & Redox Signaling* 9(11):1815-23.
- Kato, A., Favoreto, Jr. S., Avila, P.C. and Schleimer, R.P. (2007): "2TLR3- and Th2 Cytokine-Dependent Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Airway Epithelial Cells", *Journal of Immunology* 179(2):1080-1087.
- Kayser, F.H., Böttger, E.C. und Zinkernagel, R.M. (2005): „Medizinische Mikrobiologie. Verstehen- Lernen - Nachschlagen“, Thieme Verlag Stuttgart 10.Auflage:571-579.
- Keikhaee, M.R., Nash, E.B., O'Rourke S.M. Ans Bowermann, B. (2014): "A Semi-Dominant Mutation in the General Splicing Factor SF3a66 Causes Anterior-Posterior Axis Reversal in One-Cell Stage *C. elegans* Embryos", *PloA One* 9(9):2106484 doi:10.1371/journal.pone.0106484.
- King, C.L., Mahanty, S., Kumaraswami, V., Abrams, J.S., Regunthan, J., Jayaraman, K., Ottesen, E.A. and Nutman, T.B. (1993): "Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset", *Journal of Clinical Investigation* 92:1667-16673.
- Kilon, A.D. and Donelson, J.E. (1994): "OvGalBP, a filarial antigen with homology to vertebrate galactoside-binding proteins", *Molecular and Biochemical Parasitology* 65:305-315.
- Kipreos, E.T., Lander, L.E., Wing, J.P., He, W.W. and Hedgecock, E.M. (1996): "Cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family", *Cell* 85(6):829-839.
- Knippers, R. (2012): „Eine kurze Geschichte der Genetik“, Springer Verlag Berlin, Heidelberg:122-124; 346.
- Knippers, R. (2006): „Molekulare Genetik“, Thieme Verlag Stuttgart, 9. komplett überarbeitete Auflage:65-70.
- Knox, D.P. and Jones, D.J (1990): "Studies on the presence and release of proteolytic enzymes (proteinases) in gastro-intestinal nematodes of ruminants", *International Journal for Parasitology* (20):243-249.

- Knox, D.P. and Kennedy, M.W. (1988): “Proteinases released by the parasitic larval stages of *Ascaris suum* and their inhibition by antibody”, *Molecular and Biochemical Parasitology* (28):207-216.
- Kooij, G., Braster, R., Koning, J.J., Laan, L.C., van Vliet, S.J., Los, T., Eveleens, A.M., van der Pol, S.M., Förster-Waldl, E., Boztug, K., Belot, A., Szilagy, K., van der Berg, TK, van Buul, J.D, van Egmond, M., de Vries, H.E., Cummings, R.D., Dijkstra, C.D. and van Die, I. (2015): “*Trichuris suis* induces human non-classical patrolling monocytes via the mannose receptor and PKC: implications for multiple sclerosis”, *Acta Neuropathologica Communications* (3):45.
- Krab, I.M. and Parmeggiani A. (2002): “Mechanisms of EF-Tu, a pioneer GTPase”, *Progress in Nucleic and Acid Research of Molecular Biology* 71:513-551.
- Krause, M., Wild, M., Rosenzweig, B. and Hirsh, D. (1989): “Wild-type and mutant actin genes in *Caenorhabditis elegans*”, *The Journal of Molecular Biology* 208(3):381-392.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982): “Selfsplicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*”, *Cell* 31:147-157.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P. (2001): “An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*”, *Science* 294:858-862.
- Layden, M., Schwartz, A., Mookerjee, S. and Hagen, F. (2001): “Gly-3 through gly-11 are glycosyltransferases critical for embryo morphogenesis”, *The Journal of Biological Chemistry* 273:8268-8277.
- Lee, R., Feinbaum, R. and Ambros, V. (2004): “A short history of a short RNA”, *Cell*. 116(2): 89-92, 96.
- Lee, R. and Ambros, V. (2001): “An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*”, *Science* 294 (5543):862-864.
- Lee, R., Feinbaum, R. and Ambros, V. (1993): “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*”, *Cell*. 75 (5): 843-854.
- Leitinger, B. (2014): “Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions”, *international Reviews of Cell and Molecular Biology* 310:39-87.
- Li, J., Tewari, M., Vidal, M. and Lee, S.S. (2007): “The 14-3-3 protein FTT-2 regulates DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*”, *Developmental Biology* 301:32-91.
- Lightowers, M.W. and Rickard, M.D. (1988): “Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses”, *Parasitology* 96:123-66.

- Lin, R., Thompson, S. and Priess, J.R. (1995): "Pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos", *Cell* 83:599-609.
- Liu, F., Cui, S.-J., Hu, W., Feng, Z., Wang, Z.-Q. and Han, Z.G. (2009): "Excretory/Secretory Proteome of the Adult Developmental Stage of Human Blood Fluke, *Schistosoma japonicum*", *Molecular Cell Proteomics* 8(6):1236-1251.
- Liu, J., Ben-Shahar, T.R., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A. and Gruenbaum, Y. (2000): "Essential roles for *Caenorhabditis elegans* laminin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes", *Molecular Biology of the Cell* 11:3937-3947.
- Lobos, E., Nutman, T.B., Hothersall, J.S. and Moncada, S. (2003): "Elevated immunoglobulin E against recombinant *Brugia malayi* gamma-glutamyl transpeptidase in patients with bancroftian filariasis: association with tropical pulmonary eosinophilia or putative immunity", *Infection and Immunity* 71(2):747-753.
- Lobos, E., Zahn, R., Weiss, N. and Nutman, T.B. (1996): "A major allergen of lymphatic filarial nematodes is a parasite homolog of the gamma-glutamyl transpeptidase", *Molecular Medicine* 2(6):712-724.
- Lobos, E., Weiss, N., Karam, M., Taylor, H.R., Ottesen, E.A. and Nutman, T.B. (1991): "An immunogenic *Onchocera volvulus* antigen: a specific and early marker of infection", *Science* 251:1603-1605.
- Lochnit, G., Bongaarts, R. and Geyer, R. (2005): "Searching new targets for anthelmintic strategies: interference with glycosphingolipid biosynthesis and phosphorylcholine metabolism affects development of *Caenorhabditis elegans*", *International Journal for Parasitology* 35(8):911-923.
- Lochnit, G., Nispel, S., Dennis, R.D. and Geyer, R. (1998): "Structural analysis and immunohistochemical localisation of two acidic glycosphingolipids from the porcine, parasitic nematode, *Ascaris suum*", *Glycobiology* 8(9):891-899.
- Lodes, M.J. and Yoshino, T.P. (1989): "Characterisation of excretory-secretory proteins synthesized in vitro by *Schistosoma mansoni* primary sporocysts", *Journal of Parasitology* 75:853-862.
- Macqueen, A.J., Baggett, J.J., Perumov, N., Bauer, R.A., Januszewski, T., Schriefer, L. and Waddle, J.A. (2005): "ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation", *Molecular Biology of the Cell* 16, 3247-3259.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. and Sugimoto, A. (2001): "Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi", *Current Biology* 11(3):171-176.

- Mark, J.W. (1987): "Epidemiology of lymphatic filariasis", Ciba Foundation symposium:5-14.
- Martzen, M.R. (1990): "Primary structure of the major pepsin inhibitor from the intestinal parasitic nematode *Ascaris suum*", Biochemistry 29:7366-7372.
- Maruyama R., Endo, S., Sugimoto, A. and Yamamoto, M. (2005): "*Caenorhabditis elegans* DAZ-1 is expressed in proliferating germ cells and directs proper nuclear organization and cytoplasmic core formation during oogenesis", Developmental Biology 277(1):142-154.
- Matsumo, Y., Perry, G., Levine, R.J., Blanton, R., Mahoud, A.A. and Aikawa, M. (1988): "Paramyosin and actin in schistosomal teguments", Nature 333(6168):76-78.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J. and Vance, V.B. (2001): "RNA-based silencing strategies in plants", Current Opinion in Genetics & Development 11(2):221-227.
- McLaren, D.J. (1984): "Disguise as an evasive stratagem of parasitic organisms", Parasitology 88:597-611.
- McLaren, D.J. and Terry, R.J. (1982): "The protective role of acquired host antigens during schistosome maturation", Parasite Immunology 4:129-148.
- Melendez, A. J., Harnett, M.M., Pushparaj, P.N., Wong, W.S., Tay, H.K., McSharry, C.P. and Harnett, W. (2007): "Inhibition of Fc-epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes", Nature Medicine 13:375-381.
- Mello, C.C., Draper, B.W. and Priess, J.R.(1994): "The maternal genes *apx-1* and *glp-1* and establishment of dorsal-ventral polarity in the early *C. elegans* embryo", Cell 77:95-106.
- Merrifield, R.B. (1963): "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide", Journal of the American Chemical Society 85:2149-2154.
- Mizuno, T., Chou, M.-Y. and Inouye, M. (1984): "A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)", Proceedings of the National Academy of Sciences 81:1966-1970.
- Molehin, A.J., Gobert, G.N. and McManus, D.P. (2012): "Serine protease inhibitors of parasitic helminths", Parasitology 139:681-695.
- Moreno, Y. and Geary, T.G. (2008): "Stage- and gender-specific proteomic analysis of *Brugia malayi* excretory-secretory products", PLoS Neglected Tropical Diseases 2(10):326.
- Mullis, K.B., Ferre, F. and Gibbs, R.A (1994): "The polymerase chain reaction", Birkhäuser-Verlag Boston. 1. Ausgabe:3-13.

- Müller, W.A. und Hassel, M. (2012): „Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie des Menschen und bedeutender Modellorganismen“, Springer Spektrum, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 5. Auflage:78.
- Natarajan, L., Witwer, N.E. and Eisenmann, D.M. (2001): “The divergent *Caenorhabditis elegans* beta-catenin proteins BAR-1, WRM-1 and HMP-2 make distinct protein interactions but retain functional redundancy in vivo”, *Genetics* 159(1):159-172.
- Navarro, R.E., Shim, E.Y., Kohara, Y., Singson, A. and Blackwell, T.K. (2001): “cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*”, *Development* 128(27):3221-3232.
- Newlands, G.F., Skuce, P.J., Knox, D.P., Smith, S.K. and Smith, W.D. (1999): “Cloning and characterisation of a beta-galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite”, *Parasitology* 119:483-490.
- Nordström, K. and Wagner, E.G. (1994): “Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA”, *Trends of Biochemical Science* 19:294-300.
- Norman, K.R. and Moemann, D.G. (2000): “The let-268 locus of *Caenorhabditis elegans* encodes a procollagen lysyl hydroxylase that is essential for type IV collagen secretion”, *Developmental Biology* 227:690-705.
- Nowikovsky, K., Froschauer, E.M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G. and Schweyen, R.J. (2004): “The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome”, *Journal of Biological Chemistry* 279(29): 30307-30315.
- Ohmachi, M., Rocheleau, C.E., Church, D., Lambie, E., Schedl, T. and Sundaram, M.V (2002): “*C. elegans* ksr-1 and ksr-2 have both unique and redundant functions and are required for MPK-1 ERK phosphorylation”, *Current Biology* 12:427-433.
- Ono, S. and Ono, K. (2002): “Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics”, *The Journal of Cell Biology* 156(6):1065-1076.
- Ou, G., Koga, M., Blacque, O.E., Murayama, T., Ohshima, Y., Schafer, J.C., Li, C., Yoder, B.K., Leroux, M.R. and Scholey, J.M. (2007): “Sensory ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans*: assignment of IFT components into distinct modules based on transport and phenotypic profiles”, *The Molecular Biology of the Cell* 18:1554-1569.
- Ouyang, P. and Surgrue, S.P. (1996): “Characterization of pinin, a novel protein associated with the desmosome-intermediate filament complex”, *The Journal of Cell Biology* 35(4):1027-42.
- O’Farrell, P. H. (1975): “High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins”, *The Journal of Biological Chemistry* 250:4007-4021.

- O'Regan, N.L., Steinfelder, S., Venugopal, G., Rao, G.B., Lucius, R., Srikantam, A. and Hartmann, S. (2014): “*Brugia malayi* Microfilariae Induce a Regulatory Monocyte/Macrophage Phenotype That Suppresses Innate and Adaptive Immune Responses”, *PloS Neglected Tropical Diseases* 8(10):e3206.
- Ossareh-Nazari, B., Katsiarimpa, A., Merlet, J. and Pintard, L. (2016): RNAi-Based Suppressor Screens Reveal Genetic Interactions Between the CRL2^{LRR-1} E3-Ligase and the DNA Replication Machinery in *Caenorhabditis elegans*”, *G3: Genes|Genomes|Genetics* 6(10):3431-3442.
- Pappin, D.J., Hojrup, P. and Bleasby, A.J. (1993): “Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting”, *Current Biology* 3(6):327-332.
- Park, S.K., Cho, M.K., Lee, K.H., Lee, S.J., Choi, S.H., Ock, M.S., Jeong, H.J., Lee, M.H. and Yu, H.S. (2009): “Macrophage migration inhibitory factor homologs of anisakis simplex suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment”, *The Journal of Immunology* 182:6907-6914.
- Park, B.-J., Lee, D.-G, Yu, J.-R., Jung, S., Choi, K., Lee, J., Lee, J., Kim, Y.S., Lee, L., Kwon, J.Y., Lee, J., Singson, A., Song, W.K., Eom, S.H., Park, C.-S., Kim, D.H., Bandyopadhyay, J. and Ahn, J. (2001): “Calreticulin, a Calcium-binding Molecular Chaperone, Is Required for Stress Response and Fertility in *Caenorhabditis elegans*”, *Molecular Biology of the Cell* 12(9):2835-2845.
- Park, Y.-D., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M. and Matzke, M.A. (1996): “Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity”, *The Plant Journal* 9(2):183-194.
- Parker, J. D., Hilton, L.K., Diener, D.R., Rasi, M.Q., Mahjoub, M.R., Rosenbaum, J.L. and Quarumby, L.M. (2010): “Centrioles are freed from cilia by severing prior to mitosis”, *Cytoskeleton* 67:425-430.
- Pearce, E. and Sher, A. (1986): “Mechanism of immune evasion in schistosomiasis”, *Contributions to Microbiology and Immunology* 8:219-232.
- Piano, F., Schetter, A.J., Mangone, M., Stein, L. and Kemphues K.J. (2000): “RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*”, *Current Biology* 10(24):1619-1622.
- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.L., Srayko, M., Kurz, T., Mains, S., Tyers, M., Bowerman, B. and Peter, M. (2003): “The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase”, *Nature* 425:311-316.
- Pockley, A.G., Muthana, M. and Calderwood, S.K. (2008): “The dual immunoregulatory roles of stress proteins”, *Trends in Biochemical Science* 33:71-79.
- Prasad, S.S., Starr, T. and Rose, A.M. (1993): “Molecular characterization in the dpy-14 region identifies the adenosylhomocysteine hydrolase gene in *Caenorhabditis elegans*”, *Genome* 36(1):57-65.

- Qadota, H., Blangy, A., Xiong, G. and Benian, G.M. (2008): "The DH-PH region of the giant protein UNC-89 activates RHO-1 GTPase in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle", *The Journal of Molecular Biology* 383(4):747-752.
- Qadota, H., McGaha, L.A., Mercer, K.B., Stark, T.J., Ferrara, T.M. and Benian, G.M. (2008): "A novel protein phosphatase is a binding partner for the protein kinase domains of UNC-89 (Obscurin) in *Caenorhabditis elegans*", *Molecular and Cellular Biology* 19(6):2424-2432.
- Rabilloud, Th. (2000): "Proteome research: Two-dimensional electrophoresis and Identification methods", Springer-Verlag Berlin Heidelberg:203.
- Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson, S.S. and Vasta, G.R. (2007): "Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices", *Current Opinion in Structural Biology* 17:513-20.
- Ramaswamy, K., Salafsky, B., Potluri, S., He, Y.X., Li, J.W. and Shibuya, T. (1995-1996): "Secretion of an anti-inflammatory, immunomodulatory factor by Schistosomulae of *Schistosoma mansoni*", *Journal of Inflammation* 46:13-22.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. and Deutzmann, R. (2006): „Duale Reihe Biochemie“, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart:164-166.
- Rehm, H. (2006): „Der Experimentator. Proteinbiochemie. Proteomics“, Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 5. Aufl. 2006. Korr. Nachdruck (11. Mai 2006):221.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, H.R., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000): "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*", *Nature* 403:901-906.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. and Priess J.R. (1997): "*C. elegans* II, 2nd edition", Cold Spring Harbor Monograph Series 33.
- Rock, B., Martins, C.R., Theofilopoulos, A.N., Balderas, R.S., Anhalt, G.J., Labib, R.S., Futamura, S., Rivitti, E.A. and Diaz, L.A (1989): "The pathogenetic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)", *The New England Journal of Medicine* 320(22):1463-1469.
- Roehl, H. and Kimble, J.(1993): "Control of cell fate in *C. elegans* by a GLP-1 peptide consisting primarily of ankyrin repeats", *Nature* 364:632-635.
- Rose, L.S. and Kemphues, K. (1998): "The let-99 gene is required for proper spindle orientation during cleavage of the *C. elegans* embryo", *Development* 125(7):1337-1346.
- Rual, J.F., Ceron, J., Koreth, J., Hao, T., Nicot, A.S., Hirozane-Kishikawa, T., Vandenhaute, J., Orkin, S.H., Hill, D.E., van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2004): "Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library", *Genome Research* 14(10B):2162-2168.

- Rushforth, A.M., Cummins White, C. and Anderson, P. (1998): "Functions of the *Caenorhabditis elegans* Regulatory Myosin Light Chain Genes *mlc-1* and *mlc-2*", *Genetics* 150:1067-1077.
- Ruvkun, G. (2001): "Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world", *Science* 294(5543):797-799.
- Rzepecka, J., Siebeke, I., Coltherd, J.C., Kean, D.E., Steiger, C.N., Al-Riyami, L., McSharry, C., Harnett, M.M. and Harnett, W. (2013): "The helminth product, ES-62, protects against airway inflammation by resetting the Th cell phenotype", *International Journal of Parasitology* 43:211-223.
- Saito, T., Miyoshi, E., Sasai, K., Nakano, N., Eguchi, H., Honke, K. and Taniguchi, N (2002): "A secreted type of beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation: a novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferase activity", *Journal of Biochemical Chemistry* 277(19):17002-17008.
- Salzet, M., Capron, A. and Stefano, G.B. (2000): "Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions", *Parasitology Today* 16:536-540.
- Sarkis, G.J., Kurpiewski, M.R., Ashcom, J.D., Jen-Jacobson, L. and Jacobson, L.A. (1988): "Proteases of the nematode *Caenorhabditis elegans*", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 261(1):80-90.
- Sarov, M., Murray, J.I., Schanze, K., Pozniakovski, A., Niu, W., Angermann, K., Hasse, S., Rupprecht, M., Vinis, E., Tinney, M., Preston, E., Zinke, A., Enst, S., Teichgraber, T., Janette, J., Reis, K., Janosch, S., Schloissnig, S., Ejsmont, R.K., Slightam, C., Xu, X., Kim, S.K., Reinke, V., Stewart, A.F., Snyder, M., Waterston, R.H. and Hymann A.A. (2012): "A genome-scale resource for in vivo tag-based protein function exploration in *C. elegans*", *Molecular Cell* 150:855-866.
- Sasisekhar, B., Aparna, M., Augustin, D.J., Kaliraj, P., Kar, S.K., Nutman, T.B. and Narayanan, R.B. (2005): "Diminished monocyte function in micro-filaremic patients with lymphatic filariasis and its relationship to altered lymphoproliferative responses", *Infections and Immunology* 73:3385-3393.
- Schlechtmann, D., Tarrab-Hazdai, R., Ram, D., Shinder, V., Grevelding, C.G., Kunz, W. and Armon, R. (2001): "Expression and immunolocalization of the 14-3-3 protein of *Schistosoma mansoni*", *Parasitology* 123:573-582.
- Schnoeller, C., Rausch, S., Pillai, S., Avagyan, A., Wittig, B.M., Loddenkemper, C., Hamann, A, Hamelmann, E., Lucius, R. and Hartmann, S. (2008): "A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages", *The Journal of Immunology* 180:4265-4272.
- Schüler, J. (2016): „Die Biotechnologie-Industrie. Ein Einführungs-, Übersichts- und Nachschlagewerk“, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016:37.

- Semnani, R.T., Liu, A.Y., Sabzevari, H., Kubofcik, J., Zhou, J., Gilden, J.K. and Nutman, T.B. (2003): “*Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4⁺ T cells”, *Journal of Immunology* 171(4):1950-1960.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962): “Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*”, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59:223-239.
- Shimomura, O. (2005): „The discovery of aequorin and green fluorescent protein”, *Journal of Microscopy* 217:1-15.
- Silverthorn, D.U. (2007): “Physiologie”, 4. aktualisierte Auflage, Pearson Education Deutschland GmbH. Deutsche Bearbeitung: Weber, W.-M., 2009:271-274.
- Simmer, F., Moorman, C., van der Linden, A.M., Kuijk, E., van den Berghe, P.V., Kamath, R.S., Fraser, A.G., Ahringer, J. and Plasterk, R.H. (2003): “Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions”, *PLoS Biology* 1(1):E12.
- Siomi, H. and Siomi, M.C. (2009): “On the road to reading the RNA-interference code”, *Nature* 457:396-404.
- Skokan, T.D. (2016): “A structure–function analysis of the *C. elegans* γ -TuSC protein GIP-1”, Department of Biology, Stanford:12-14.
- Small, T.M., Gernert, K.M., Flaherty, D.B., Mercer, K.B., Borodovsky, M. and Benian, G.M. (2004): “Three new isoforms of *Caenorhabditis elegans* UNC-89 containing MLCK-like protein kinase domains”, *Journal of Molecular Biology* 342(1):91-108.
- Snodgrass, C.J., Burnham-Marusich, A.R., Meteer, J.C. and Berninsone, P.M. (2015): “Conserved ion and amino acid transporters identified as phosphorylcholine-modified N-glycoproteins by metabolic labeling with propargylcholine in *Caenorhabditis elegans* cells”, *Glycobiology* 25(4): 403-411.
- Sorokin, S. (1962): “Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells”, *Journal of Cell Biology* 15:363-377.
- Sönnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Röder, M., Finell, J., Häntsch, H., Jones, S.J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K.C., Oegema, K., Gönczy, P., Coulson, A., Hyman, A.A. and Echeverri, C.J. (2005): “Full genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*”, *Nature* 434(7032):462-469.
- Srayko, M., Kaya, A., Stamford, J. and Hyman, A.A. (2005): “Identification and Characterization of Factors Required for Microtubule Growth and Nucleation in the Early *C.elegans* Embryo”, *Developmental Cell* 9:223-236.

- Steven, R., Kubiseski, T.J., Zheng, H., Mancillas, J., Ruiz Morales, A., Houge, C.W., Pawson, T. and Culotti, J. (1998): "UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*", *Cell* 92(6):785-795.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K. and Prive, G.G. (2005): "Sequence and structural analysis of BTB domain proteins", *Genome Biology* 6(10):R82.
- Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M. and Tavernarakis, N. (2002): "Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*", *Nature* 419: 939-944.
- Tammachote, R., Hommerding, C.J., Sindera, R.M., Miller, C.A., Czarnecki, P.G., Leightner A.C., Salisbury, J.L., Ward, C.J., Torres, V.E., Gattone V.H. and Harris, P.C. (2009): "Ciliary and centrosomal defects associated with mutation and depletion of the Meckel syndrome genes MKS1 and MKS3", *Human Molecular Genetics* 18:3311-3323.
- Tang, N., Michnowicz, J. und Goodley, P. (2006): "Elektronentransferdissoziation (EDT). Eine neue Methode zur Identifikation von Proteinen", *BIOspektrum* 07.06. ,12. Jahrgang, Methoden und Anwendungen:746-747.
- Tang, L., Smith, V.P., Gounaris, K. and Selkirk, M.E. (1996): "*Brugia pahangi*: the cuticular glutathione peroxidase (gp29) protects heterologous membranes from lipid peroxidation", *Experimental Parasitology* 82:329-332.
- Tarleton, R.L. and Kemp, W.K. (1981): "Demonstration of IgG-Fc and C3 receptors on adult *Schistosoma mansoni*", *Journal of Immunology* 126:379-384.
- Tcherepanova, I., Bhattacharyya, L., Rubin, C.S. and Freedman, J.H. (2000): "Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of asp-1", *Journal of Biological Chemistry* 275(34):26359-26369.
- The *C. elegans* sequencing consortium (1998): "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology", *Science* 282(5396):2012-2018.
- Tian, C., Sen, D., Shi, H., Foehr, M.L., Plavskin, Y., Vatamaniuk, O.K. and Liu, J. (2010): "The RGM protein DRAG-1 positively regulates a BMP-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*", *Development* 137(14):2375-2384.
- Timm, T., Lenz, C., Merkel, D, Sadiffo, C., Grabitzki, J., Klein, J. and Lochnit, G. (2015): "Detection and site localization of phosphorylcholine-modified peptides by NanoLC-ESI-MS/MS using precursor ion scanning and multiple reaction monitoring experiments", *Journal of American Mass Spectrometry* (3):460-471.
- Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H. and Dalton, J.P. (1999): "Proteinases and associated genes of parasitic helminths", *Advanced Parasitology* 43:161-266.

- Toscano, M.A., Bianco, G.A., Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Correale, J., Hernandez, J.D., Zwirner, N.W., Poirier, F., Riley, E.M., Baum, L.G. and Rabinovich, G.A. (2007): "Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death", *Nature Immunology* 8(8):825-834.
- Tsou, M.-F.B., Hayashi, A. and Rose, L.S. (2003): "LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling", *Development* 130(23):5717-5730.
- Tsou, M.-F.B., Hayashi, A., DeBella, L.R., McGrath, G. and Rose, L.S. (2002): "LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in *C. elegans* embryos", *Development* 129(19):4469-4481.
- Tzur, Y.B., Hersh, B.M., Horvitz, H.R. and Gruenbaum, Y. (2002): "Fate of the nuclear lamina during *Caenorhabditis elegans* apoptosis", *Journal of Structural Biology* 137(1-2):146-153.
- Urban, J.F., Madden, K.B., Svetica, A., Cheever, A., Trotta, P.P., Gause, W.C., Katona, I. M. and Finkelman, F.D. (1992): "The Importance of Th2 Cytokines in Protective Immunity to Nematodes", *Immunological Reviews* (127): 205–220.
- Van Riet, E., Hartgers, F.C. and Yazdanbakhsh, M. (2007): "Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms", *Immunobiology* 212(6):475-490.
- Wandall, H.H., Irazoqui, F., Tarp, M.A., Bennett, E.P., Mandel, U., Takeuchi, H., Kato, K., Irimura, T., Suryanarayanan, G., Hollingsworth, M.A. and Clausen, H (2007): "The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: Lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation", *Glycobiology* 17:374-387.
- Wang, T., Van Steendam, K., Dhaenens, M., Vlaminck, J., Deforce, D., Jex, A.R., Grasser, R.B. and Geldhof, P. (2013): "Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases", *PloS Neglected Tropical Diseases* 7(10):e2467.
- Waterston, R.H., Thomson, J.N. and Brenner, S. (1980): "Mutants with altered muscle structure of *Caenorhabditis elegans*", *Developmental Biology* 77(2):271-302.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A. A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I. (1995): "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*", *Electrophoresis* 16:1090-1094.
- Wessel, D. and Flügge, U.I. (1984): "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids", *Analytical Biochemistry* 138(1):141-143.

- Westermeier, R. (1990): "Electrophoresis in practise", VCH Verlagsgesellschaft mbh Weinheim, Germany:150.
- White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. and Brenner, S. (1986): "The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*", Philosophical Transactions of the Royal Society Series B, Biological Sciences 315:1-340.
- Wicks, S.R., de Vries, C.J., van Luenen, H.G.A.M. and Plasterkl, R.H.A. (2000): "CHE- 3. A Cytosolic Dynein Heavy Chain, Is Required for Sensory Cilia Structure and Function in *Caenorhabditis elegans*", Developmental Biology 221: 295-307.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993): "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*", Cell 75:855-862.
- Willis, J.H., Munro, E., Lyczak, R. and Bowerman, B. (2006): "Conditional Dominant Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Gene *act-2* Identify Cytoplasmic and Muscle Roles for a Redundant Actin Isoform", Molecular Biology of the Cell 17(3):1051-1064.
- Wilkins, M.R., Appel, R.D., Williams, K.L. and Hochstrasser, D.F. (2007): "Proteome Research. Concepts, Technology and Application", Springer-Verlag Berlin Heidelberg:1.
- Wuhrer, M., Rickhoff, S., Dennis, R.D, Lochnit, G., Soboslay, P.T., Baumeister, S. and Geyer, R. (2000): "Phosphocholine-containing, zwitterionic glycosphingolipids of adult *Onchocerca volvulus* as highly conserved antigenic structures of parasitic nematodes", Biochemical Journal 348(2):417-423.
- Xiong G., Qadota, H., Mercer, K.B., McGaha, L.A., Oberhauser, A.F. and Benian, G.M. (2009): "A LIM-9 (FHL)/SCPL-1 (SCP) complex interacts with the C-terminal protein kinase regions of UNC-89 (obscurin) in *Caenorhabditis elegans* muscle", Journal of Molecular Biology 386(4):976-988.
- Yamashiro, S., Cox, E.A., Baillie, D.L., Hardin, J.D. and Ono, S. (2008): "Sarcomeric actin organization is synergistically promoted by tropomodulin, ADF/cofilin, AIP1 and profilin in *C. elegans*", Journal of Cell Science 121:3867-3877.
- Yoshino, T. P. and Bayne, C. J. (1983): "Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*", Parasite Immunology 5:317-328.
- Zamore, P.D. (2006): "RNA Interference: Big Applause for Silencing in Stockholm", Cell 127(6):1083-1086.
- Zang, X., Talyor, P., Wang, J.M., Meyer, D.J., Scott, A.L., Walkinshaw, M.D. and Maizels, R.M. (2002): "Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode: Gene cloning, protein activity, and crystal structure", Journal of Biological Chemistry 277:44261-44267.

Zang, X. and Maizels, R.M. (2001): "Serin proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogens", Trends in Biochemical Science 26:191-197.

8 Anhang

Tabelle 1: Identifizierte ES-Proteine aus den Überständen der L1-Larven von *C. elegans*.

Nr.	Protein	Name	GO	Fkt	MW [kDa]	pI	SC [%]
1	DH11.4	UC	NI	U	41,7	8,8	30,0
2	T07H3.7	UC	NI	U	79,7	8,88	18,0
3	D1044.6	UC	NI	U	118,1	6,73	32,8
4	F25A2.1	UC	0006629	U	16,6	5,74	34,1
5	C33H5.1	UC	NI	U	34,7	6,02	21,0
6	LLC1.2	UC	0019915	U	30,4	5,7	39,7
7	ZK1037.5 NHR-247	<i>Nuclear Hormone Receptor family</i>	0006355	Si	38,8	9,81	30,0
8	D2045.6 LIN-19	<i>Abnormal cell lineage protein 19</i>	0005488	Si	89,5	6,38	28,7
9	C45G3.3 GIP-2	<i>Gamma-tubulin interacting protein 2</i>	0000003	E	73,4	9,39	13,2
10	K08E7.3 LET-99	<i>Protein let-99, Lethal protein 99</i>	0009792	E	80,1	9,52	15,8
11	F58G11.1a LETM-1	<i>LETM1 (Leucine zipper, EF-hand, TransMembrane mitochondrial protein) homolog</i>	0040018	E	88,7	5,94	12,4
12	F11A10.2 REPO-1	<i>Reversed Polarity in early embryos</i>	0000003	E	25,5	9,27	32,0
13	K07H8.1 TBCE-1	<i>Tubulin folding Cofactor E homolog</i>	0008340	E	56,7	5,99	22,1
14	F15E6.1 SET-9	<i>Set (Trithorax/polycomb) domain containing protein 9</i>	0008340	E	182,6	8,65	29,0
15	T18H9.2b ASP-2	<i>Aspartyl Protease-2</i>	0006508	M	68,6	5,00	13,0
16	F21F8.7.1 ASP-6	<i>Aspartyl Protease-6</i>	0006508	PM	41,5	5,63	23,2
17	F3511.11a DYF-14	<i>Abnormal dye filling protein 14</i>	NI	PM	223,4	5,68	30,0
18	F11D5.3 a/b DDR-2	<i>Discoidin domain receptor protein 2</i>	0006468	PM	86,9	6,05	6,2
19	D2045.5	UC	0006468	PM	40,2	9,29	24,8
20	R05F9.12 AAGR-2	<i>Acid Alpha Glucosidase Relate</i>	0005975	M	106,8	5,51	10,0
21	Y45F10D.3 GLY-10	<i>Putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10</i>	0002119	M	10,2	9,89	15,3

Anhang

Nr.	Protein	Name	GO	Fkt	MW [kDa]	pI	SC [%]
22	F58B3.3 LYS-6	<i>Lysozyme-6</i>	0003796	M	23,1	6,03	17,2
23	T21H3.1 a	UC	0006629	M	33,5	5,92	34,1
24	F53F4.10	<i>Probable NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial</i>	0003954	M	26,2	6,54	24,1
25	Y41G9A.1 OSM-5	OSM-5	00035058	M	92,3	5,47	7,1
26	F35C5.6 CLEC-63	<i>C-type lectin</i>	0005488	M	44,5	5,47	46,2
27	C02A12.4 LYS-7	<i>Lysozyme-like protein 7</i>	0008340	M	30,9	6,71	32,1
28	F18C12.1 CHE-3	<i>Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1</i>	0006200	M	47,3	5,81	6,8
29	F25B5.7 NONO-1, PSF-1	<i>NONO (Conserved nuclear protein, aka PSF) homolog</i>	0002119	S	22,7	9,34	12,3
30	F33E2.6	UC	NI	S	94,6	6,54	19,0
31	C44B7.5	UC	0005576	S	26,3	8,44	23,4
32	T07H3.1 BATH-47	<i>BTB and MATH domain-containing protein 47</i>	NI	S	79,7	8,88	18,1
33	F09F7.2 MLC-3	<i>Myosin Light Chain</i>	0018991	S	17,1	4,61	20,4
34	Dy3.2 LMN-1, LAM-1	<i>Laminin-1</i>	0000003	S	64,1	5,43	14,7
35	R186.7 PNN-1	<i>PiNiN nuclear speckle-associated protein and splicing factor homologue</i>	NI	S	42,5	5,27	20,0
36	F40F4.6 IRG-7	<i>C-type lectin domain protein Infection response protein 7</i>	0040010	S	24,3	4,72	28,4
37	Y71G12B.16 DRAG-1	<i>RGM domain family member drag-1</i>	NI	S	47,0	8,91	32,1
38	ZK666.7 CLEC-61	<i>C-type lectin</i>	0005488	S	44,5	5,24	32,8

UC = Uncharakterisiert, U = Unbekannt, M = Metabolismus, S = Struktur, Si = Signaltransduktion, PM = Proteinmetabolismus, E = Entwicklung, Fkt = Funktion, GO = GO-Annotation, MW = Molekulargewicht, NI = Nicht identifiziert, pI = isoelektrischer Punkt, SC = Sequence coverage

Danksagung

Zum Abschluss der Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei allen bedanken, die mich während der langen Zeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Die äußerst kollegiale Zusammenarbeit habe ich jederzeit sehr geschätzt. Besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Lochnit, der mir ein interessantes Thema für meine Doktorarbeit bereitstellte, mich ausgezeichnet betreute und immer die Zeit aufbrachte, mir mit seinem Wissen und Engagement bei meinen vielen Fragen zur Seite zu stehen. Ich konnte zu jedem Zeitpunkt auf seine Unterstützung zählen.

Dr. Julia Grabitzki, die mir zu jeder Zeit – meist über regen Schriftverkehr über große örtliche Distanzen – mit Rat und Tat zur Seite stand und mir eine unbeschreibliche Hilfe war.

Der großen Geduld und Mühe von Michael und Christina und ihrem großen Engagement, mir die Gerätschaften und die Abläufe bezüglich der Gelelektrophorese schnellstmöglich eigenständig beizubringen. Vinzent, der sich die Zeit nahm, mir die RNAi-Methode vertraut zu machen und mir die Zeit im Labor mit Zuspruch und positivem Erfahrungsaustausch verkürzte.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich alle auf unterschiedliche Weise motiviert und unterstützt haben und zum Abschluss ganz besonders meinem Ehemann: Ohne die kontinuierliche Motivation meines Mannes hätte ich diese Arbeit in Anbetracht der nicht einfachen Lebensumstände meiner Laufbahn als Sanitätsoffizierin definitiv nicht zu Ende geführt! Dafür bin ich ihm unendlich dankbar!

Vielen Dank!