

**Transkriptomanalyse verschiedener Entwicklungsstadien des
Pansenegels *Calicophoron daubneyi* in der Umwelt und im
Zwischenwirt sowie Erstellung eines Genomentwurfes**

von Leah Renee Knöpfle

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Transkriptomanalyse verschiedener Entwicklungsstadien
des Pansenegels *Calicophoron daubneyi* in der Umwelt
und im Zwischenwirt sowie Erstellung eines
Genomentwurfes**

von Leah Renee Knöpfle

aus Amberg (Bayern)

München 2025

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Experimentelle Parasitologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Markus Meissner

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Markus Meissner

Korreferent/en: Prof. Dr. Elisabeth G. Kemter

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	<i>C. daubneyi</i> und die Paramphistomidose in Europa	3
1.1.	Epidemiologie in Europa.....	4
1.2.	Lebenszyklus	5
1.3.	Zwischenwirte	6
1.4.	Prävalenzen in Europa.....	7
1.5.	Pathogenese und klinisches Bild der Paramphistomidose	8
1.6.	Diagnostik	9
1.7.	Therapie und Bekämpfung der Paramphistomidose	10
2.	Genomik	11
2.1.	Einführung in die Genomik.....	11
2.2.	Technologien und Methoden der DNA-Sequenzierung.....	12
2.2.1.	Illumina Sequencing by Synthesis	12
2.2.2.	Oxford Nanopore Sequencing.....	14
2.3.	Überblick über die aktuelle Forschungslage der Egelgenomik.....	16
3.	Transkriptomik	18
3.1.	Die Ribonukleinsäure und das Transkriptom.....	18
3.2.	Einführung in die Transkriptomik.....	20
3.3.	Technologien und Methoden der Transkriptomik.....	21
3.3.1.	RNA-Seq	21
3.3.2.	Bioinformatische Analysen.....	23
3.4.	Überblick über die aktuelle Forschungslage der Egeltranskriptomik	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Gewinnung der <i>C. daubneyi</i> Probenmaterialien.....	29
1.1.	Examination infizierter Rinder und Sammlung adulter Panseneigel ...	29
1.2.	Eiausscheidung adulter Panseneigel.....	30
1.2.1.	Gruppe Eier T0: Unentwickelte Eier.....	31
1.2.2.	Gruppe Eier T7: Eier zu Beginn der Entwicklung	31
1.2.3.	Gruppe Eier T14: Vollständig embryonierte Eier	32
1.3.	Produktion von <i>C. daubneyi</i> Mirazidien und Infektion von <i>G.</i>	

	<i>truncatula</i>	33
1.4.	Schneckensektion	33
1.4.1.	Gewinnung von <i>C. daubneyi</i> Redien.....	33
1.4.2.	Gewinnung von <i>C. daubneyi</i> Zerkarien	34
1.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Bestätigung der Spezies <i>C. daubneyi</i>	34
1.5.1.	DNA-Extraktion	34
1.5.2.	Primer	35
1.5.3.	Positiv- und Negativkontrolle	35
1.5.4.	Temperatur-Protokoll	35
1.5.5.	Elektrophorese.....	35
2.	DNA-Extraktion, Vorarbeiten und Durchführung der DNA-Sequenzierung.....	36
2.1.	DNA-Extraktion	36
2.1.1.	Bestimmung von Quantität und Qualität der DNA.....	37
2.2.	DNA-Sequenzierung: Oxford Nanopore Sequencing	37
3.	RNA-Extraktion, Vorarbeiten und Durchführung der RNA-Sequenzierung.....	38
3.1.	RNA-Extraktion	38
3.1.1.	Ermittlung von RNA Quantität und Qualität mittels 4150 TapeStation	39
3.1.2.	Ermittlung von RNA Quantität und Qualität mittels 2100 Bioanalyzer	39
3.2.	Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken	40
3.2.1.	Qualitätskontrolle der RNA-Seq-Bibliotheken	40
3.2.2.	Library-Pooling und Finalisierung	40
3.3.	RNA-Sequenzierung: Illumina Sequencing by Synthesis.....	40
3.3.1.	Datenprozessierung und Qualitätskontrolle	41
3.3.2.	Trimming.....	41
4.	Genomanalyse: Bioinformatische Auswertung	41
4.1.	Read-Assembly	41
4.2.	Assembly Statistiken	42
4.3.	Scaffolding	42
4.4.	Kontaminationsüberprüfung.....	42

4.5.	Vergleich von deutschem und nordirischem Genom mittels Dotplots	43
5.	Transkriptomanalyse: Bioinformatische Auswertung	43
5.1.	Zuordnung (Mapping) der RNA-Seq Daten zum Genom.....	43
5.2.	De-Novo-Assembly des Transkriptoms	43
5.3.	Differenzielle Genexpression	44
5.3.1.	Visualisierung: MA-Plots und Vulcano-Plots.....	44
5.3.2.	Darstellung der differentiellen Genexpression im IGV-Browser.....	44
5.3.3.	Visualisierung: Heat-Maps.....	45
5.3.4.	Subcluster-Analyse.....	45
5.4.	Funktionelle Annotation.....	45
5.5.	GO-Enrichment Analyse	46
IV.	ERGEBNISSE	47
1.	Ergebnisse der Vorarbeiten.....	47
1.1.	Eigengewinnung aus adulten Pansenegelein	47
1.2.	Begutachtung der Kontrollgruppen	47
1.3.	Sammlung der verschiedenen Entwicklungsstadien <i>C. daubneyis</i> im Zwischenwirt	49
1.4.	Speziesidentifikation mittels PCR.....	49
1.5.	Vorarbeiten zur Genomanalyse	50
1.5.1.	Nanodrop-Messungen zur Bestimmung von Quantität und Qualität der extrahierten DNA	50
1.6.	Vorarbeiten zur Transkriptomanalyse	51
1.6.1.	Automatisierte Elektrophorese zur Bestimmung von Quantität und Qualität der extrahierten RNA	51
1.6.2.	2100 Bioanalyzer Kontrollmessung, Erstellung der RNA-Seq Library und RNA-Sequenzierung	53
2.	Genomanalyse.....	56
2.1.	Genom Assemblierung und Statistik.....	56
2.2.	Visueller Vergleich von deutschem und nordirischem Genomentwurf	57
3.	Transkriptomanalyse	60
3.1.	Differenzielle Genexpressionsanalyse	60

3.1.1.	Vergleich der differentiellen Genexpression mittels MA-Plots	61
3.1.2.	Vergleich der differentiellen Genexpression mittels Volcano-Plots ..	64
3.1.3.	Darstellung der unterschiedlichen Transkriptlevel in IGV	67
3.1.4.	Heat-Maps	70
3.1.5.	Subcluster-Analyse.....	72
3.2.	Funktionelle Annotation und GO-Enrichment Analyse.....	74
3.2.1.	GO-Enrichment: Gruppe Eier T0 und Eier T7	77
3.2.2.	GO-Enrichment: Gruppe Eier T14.....	78
3.2.3.	GO-Enrichment: Eier gesamt.....	79
3.2.4.	GO-Enrichment: Redien.....	80
3.2.5.	GO-Enrichment: Zerkarien	82
V.	DISKUSSION	83
1.	Einleitung	83
2.	Einordnung des deutschen Genomentwurfes <i>C. daubneyi</i> in die vorhandene Literatur.....	85
3.	Auswahl der Parasitenstadien für die vergleichende Transkriptomanalyse und Gewinnung des parasitären Probenmaterials	88
3.1.	Relevanz und Auswahl der untersuchten Parasitenstadien	88
3.1.1.	Eistadien repräsentieren die Entwicklung in der Umwelt.....	89
3.1.2.	Redien und Zerkarien repräsentieren Stadien im Zwischenwirt	90
3.2.	Besondere Hitzelabilität von <i>C. daubneyi</i> -RNA.....	91
4.	Rückschlüsse auf die Entwicklung und das Verhalten <i>C. daubneyi</i> in der Umwelt und im Zwischenwirt auf Basis der Transkriptomanalyse	93
4.1.	Einordnung der differentiellen Genexpression von Entwicklungsstadien <i>C. daubneyi</i> im Zwischenwirt und in der Umwelt in den Gesamtzyklus	93
4.2.	Die Bedeutung des GO-Enrichment einzelner Subcluster in Zusammenhang mit den untersuchten Entwicklungsstadien für den Lebenszyklus und das Verhalten <i>C. daubneyi</i>	95
4.2.1.	Entwicklung frisch ausgeschiedener und früh entwickelter Eier in der Umwelt.....	95

4.2.2.	Die Entwicklung vollständig embryonierter Eier hin zum Mirazidium in der Umwelt.....	97
4.2.3.	Eigenschaften aller Eistadien	99
4.2.4.	Entwicklung und Verhalten von Redien im Schnecken-Zwischenwirt	100
4.2.5.	Stoffwechselerhalten von Zerkarien.....	101
5.	Fazit und Ausblick	103
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	105
VII.	SUMMARY.....	107
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	109
IX.	ANHANG	135
1.	Abbildungsverzeichnis	135
2.	Tabellenverzeichnis	138
3.	Abbildungen des Anhangs	139
4.	Digitales Zusatzmaterial	141
X.	DANKSAGUNG	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	aminoacids (Aminosäuren)
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
BP	Biological Process (Biologischer Prozess)
bp(s)	Basenpaar(e)
C.	<i>Calicophoron</i>
CC	Cellular Component (Zellkomponente)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
d. h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	doppelsträngige (doublestranded) Desoxyribonukleinsäure
EpG	Eizahl pro Gramm Kot
F.	<i>Fasciola</i>
FDR	False Discovery Rate (Falscherkennungsrate)
FEC	Fecal Egg Count (Anzahl der Eier im Kot)
FPKM	Fragment Per Kilobase Million (Einheit)
Gb	Gigabyte
GC	Guanin und Cytosin (Basen)
ggf.	gegebenenfalls
GO	Gene Ontology
h	hour (Stunde)
Hi-C	Hochdurchsatztechnik zur Erfassung der Chromosomenkonformation
hrs	hours (Stunden)
i. d. R.	in der Regel
IGV	Integrative Genomic Viewer
kb	Kilobase(n)
kg	Kilogramm

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
lncRNA	long non-coding ribonucleic acid (lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure)
logFC	log Fold Change
log2	Logarithmus zur Basis 2
Mb	Megabasen
MF	Molecular Function (Molekulare Funktion)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	micro ribonucleic acid (Mikro-Ribonukleinsäure)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
N	Platzhalter für „Anzahl“
NaCl	Natriumchlorid
NaClO	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumhydroxid
ncRNA	non-coding ribonucleic acid (nicht-kodierende Ribonukleinsäure)
NEJ	Newly Excysted Juvenile (frisch ausgeschlüpfte Jungegel)
NGS	Next Generation Sequencing (Sequenzierung der nächsten Generation)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
ONT	Oxford Nanopore Technologies
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pg	Pikogramm
pH-Wert	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
p. i.	post infectionem (nach der Infektion)

pmol	Pikomol
RINe	RNA-Integrity-Number (RNA-Integritäts-Nummer)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNA-Seq	Ribonucleic acid Sequencing (Ribonukleinsäure-Sequenzierung)
RPKM	Read Per Kilobase Million (Einheit)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression (Serielle Analyse der Genexpression)
siRNA	small interfering ribonucleic acid (kleine eingreifende Ribonukleinsäure)
snoRNA	small nucleolar ribonucleic acid (kleine nukleoläre Ribonukleinsäure)
ssDNA	single stranded DNA (einsträngige DNA)
Tab.	Tabelle
TPM	Transcripts Per Million (Einheit)
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer-Ribonukleinsäure)
u. a.	unter anderem
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vs.	versus
x	mal
z. B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
λ	Lambda, Symbol für Wellenlänge
%	Prozent
∅	Durchschnitt
®	Registered Trademark Symbol (Symbol für eingetragene Marken)
™	Trademark Symbol
>	mehr/größer als
<	weniger/kleiner als
≤	kleiner gleich
≥	größer gleich

I. EINLEITUNG

Die Paramphistomidose ist eine weltweit verbreitete Parasitose, welche durch einen Befall mit Pansenegeln verursacht wird. Endwirte sind hauptsächlich Rinder, Schafe, Ziegen und Wildwiederkäuer (Deplazes et al., 2020). Ursprünglich auf die Subtropen und Tropen beschränkt, haben sich Pansenegel in den letzten Jahrzehnten zunehmend bis in gemäßigte Klimazonen ausgebreitet (Huson et al., 2017). Viele europäische Länder berichteten von einem signifikanten Anstieg sowohl der Prävalenz, als auch der Schwere von Pansenegelinfektionen (Atcheson et al., 2020; Bastyrova Brutovska et al., 2023; Busin et al., 2023; Dinnik, 1962; Mage et al., 2002; Zintl et al., 2014). Infolgedessen wird die Paramphistomidose mittlerweile auch in Europa als sich ausbreitende Parasitose angesehen (Huson et al., 2017). Lange wurde angenommen, dass *Paramphistomum cervi* die vorherrschende Pansenegelspezies in Europa sei (Gordon et al., 2013). Etliche Untersuchungen haben aber gezeigt, dass mittlerweile *Calicophoron daubneyi* die dominierende Pansenegelspezies ist – auch in Deutschland (Alstedt et al., 2022; Bosco et al., 2021; Busin et al., 2023; Červená et al., 2022; Forstmaier et al., 2021; Hecker et al., 2024).

C. daubneyi teilt sich seinen Zwischenwirt, die Zwergschlammschnecke *Galba truncatula*, mit dem weit verbreiteten großen Leberegel *Fasciola hepatica*. Damit *C. daubneyi* seinen komplexen Lebenszyklus vollenden kann, ist das Vorhandensein des Zwischenwirts obligatorisch. Unembryonierte Parasiteneier, die mit dem Kot des Endwirts in die Umwelt ausgeschieden werden, entwickeln sich binnen weniger Wochen zu schlupffreien Mirazidien (Deplazes et al., 2020; Sey, 1977). Diese dringen in den Zwischenwirt ein und pflanzen sich dort asexuell von Sporozysten über Redien zu Prozerkarien fort. Schließlich treten freischwimmende, reife Zerkarien aus der Schnecke aus und enzystieren an umliegenden Pflanzen zu infektiösen Metazerkarien, welche letztendlich vom Säugetierwirt mit dem Futter oder Trinkwasser aufgenommen werden (Dinnik, 1962; Kumar, 1999; Sey, 1977).

Das klinische Bild der Paramphistomidose wird hauptsächlich durch eine schwere Dünndarminfektion mit juvenilen Parasitenstadien verursacht (Deplazes et al., 2020; Fuertes et al., 2015). Durchfall, Anorexie, Dehydratation, Schwäche bis hin zu Todesfällen wurden als mögliche Folgen beschrieben (Devos et al., 2013; Foster

et al., 2008; Mason et al., 2012; Millar et al., 2017; O'Shaughnessy et al., 2018). Die Behandlungsmöglichkeiten der Paramphistomidose sind sehr begrenzt, da zurzeit der Wirkstoff Oxyclozanid das einzig wirksame Anthelminthikum ist (Arias et al., 2013; Huson et al., 2021a).

„Omic“-Datensätze haben bereits Studien zu anderen Trematoden erheblich vorangetrieben und vergleichende Analysen zwischen verschiedenen Arten und Lebenszyklusstadien ermöglicht. Grundlegendes, molekularbiologisches Wissen über *C. daubneyi* ist, insbesondere im Vergleich zu anderen Parasiten wie *F. hepatica*, dahingegen bisher noch kaum vorhanden. Vergangene „Omic“-Studien zu *C. daubneyi* legten zwar bereits einen wichtigen Grundstein, konzentrierten sich jedoch ausschließlich auf die Entwicklungsstadien im Säugetierendwirt (Huson et al., 2021b; Huson et al., 2018).

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der erstmaligen Durchführung einer vergleichenden Transkriptomanalyse von Umwelt- und Zwischenwirtsstadien *C. daubneyi*. Berücksichtigt wurden sowohl Eier in drei unterschiedlichen Entwicklungsstufen, wie sie in der Umwelt zu finden sind, als auch Redien und Zerkarien aus dem Zwischenwirt. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieses Projektes erstmalig die DNA von adulten *C. daubneyi* Exemplaren aus Deutschland sequenziert und daraus ein erster Genomentwurf erstellt. Diese Bemühungen konnten letztendlich dazu beitragen, die vorhandene Wissenslücke mit „Omic“-Datensätzen weiter zu schließen und langfristig ein tieferes Verständnis des Parasiten und dessen Entwicklungsstadien außerhalb des Endwirts zu erlangen. Dadurch könnten mittelfristig beispielsweise neuartige Strategien zur Parasitenbekämpfung erarbeitet werden, welche schon vor einem Ausbruch der Paramphistomidose ansetzen und auf Umwelt- und Zwischenwirtebene beginnen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *C. daubneyi* und die Paramphistomidose in Europa

Die Paramphistomidose kommt weltweit bei Wiederkäuern, sowie vereinzelt bei Neuweltkameliden vor und wird durch einen Befall mit Pansenegeln verursacht (Deplazes et al., 2020; Millar et al., 2017; O’Toole et al., 2014). Der Parasit ist ein Plattwurm (Stamm *Platyhelminthes*) und gehört der Klasse der Saugwürmer (*Trematoda*), genauer der Unterklasse der Egel (*Digenea*) an, deren Spezies während ihrer Entwicklung einen obligatorischen Wirtswechsel durchlaufen. Pansenegel zeichnen sich durch einen konischen Körper mit zwei Saugnäpfen aus, mit welchen die adulten Stadien an der Pansenschleimhaut des Endwirts anhaften können (Deplazes et al., 2020).

Ursprünglich nur in den Subtropen und Tropen vorkommend, breitet sich die Paramphistomidose seit einigen Jahren auch in gemäßigteren Klimazonen aus und gewinnt dort zunehmend an Bedeutung (Dinnik, 1962; Huson et al., 2017). Lange nahm man an, dass *P. cervi* die vorherrschende Pansenegelspezies in Europa sei (Gordon et al., 2013). Zahlreiche Studien der letzten Jahren zeigten aber mit Hilfe molekularer Sequenzierungsmethoden auf, dass aktuell *C. daubneyi* die Dominanz übernommen hat – auch in Deutschland (Alstedt et al., 2022; Bastyrova Brutovska et al., 2023; Bosco et al., 2021; Busin et al., 2023; Červená et al., 2022; Forstmaier et al., 2021; García-Dios et al., 2024; Hecker et al., 2024). Daneben wird auch *Paramphistomum leydeni*, wenn auch deutlich seltener, identifiziert (Forstmaier et al., 2021; Hecker et al., 2024; Morariu et al., 2023; Wiedermann et al., 2021).

Als weitere Pansenegelspezies sind u. a. *Paramphistomum ichikwai*, *Calicophoron microbothrium* und *Calicophoron calicophorum* zu nennen, welche aber hauptsächlich außerhalb Europas in tropischen Regionen zu finden sind und in gemäßigteren Klimazonen bisher eine untergeordnete Rolle spielen (Deplazes et al., 2020; Lotfy et al., 2010; Rolfe et al., 1991).

In dieser Arbeit wird der Fokus hauptsächlich auf *C. daubneyi* gelegt.

1.1. Epidemiologie in Europa

Erstmals identifiziert und beschrieben wurde *C. daubneyi* (Syn. *Paramphistomum daubneyi*) in den 1950er Jahren im ostafrikanischen Kenia bei einem Kalb (Dinnik, 1962). Mögliche Gründe für die zunehmende Ausbreitung dieser Spezies bis nach (West-) Europa werden diskutiert, sind aber noch nicht abschließend geklärt. Der fortschreitende Klimawandel mit milderem Wintern, höheren plötzlichen Niederschlagsmengen und einer steigenden Anzahl an Gesamtsonnenstunden, scheint die Bedingungen für den Zwischenwirt *C. daubneyis*, die Zwergschlamm Schnecke *G. truncatula*, zu verbessern und somit seine Ausbreitung zu fördern (Jones et al., 2017a; Skuce et al., 2013). *C. daubneyi* Populationen zeigen eine hohe genetische Diversität, wodurch insbesondere freilebende Stadien und Stadien im Zwischenwirt Vorteile bei der Anpassung an veränderte Umwelteinflüsse und wechselndes Tiermanagement haben könnten (Sargison et al., 2019).

Auch der weit verbreitete große Leberegel *F. hepatica* ist auf *G. truncatula* für die Vervollständigung seines Entwicklungszyklus angewiesen und Doppelinfektionen mit Leber- und Pansenegeln, sowohl des Zwischen-, als auch des Endwirts sind möglich (Augot et al., 1996; Jones et al., 2017a; Rondelaud et al., 2004). Mancherorts übersteigt das Pansenegelvorkommen sogar mittlerweile das des großen Leberegels (Busin et al., 2023; Rondelaud et al., 2022). Die selektive Bekämpfung der Fasciolose und das gleichzeitige Fehlen effektiver Behandlungsmöglichkeiten der Paramphistomidose könnten eine Nische für den Pansenegel freimachen und seine Ausbreitung dadurch ebenfalls begünstigen (Mage et al., 2002; O'Shaughnessy et al., 2018). Eine der aktuellsten Studie zeigte beispielsweise, dass die Eier *C. daubneyis* in einem größeren pH-Bereich und gegenüber NaClO sogar widerstandsfähiger sind, als die Eier von *F. hepatica* (Clancy et al., 2025).

Darüber hinaus liegt ein Zusammenhang zwischen den Haltungsbedingungen der Endwirte und der Gefahr einer Pansenegelinfektion vor. So besteht eine höhere Infektionswahrscheinlichkeit für weidende Rinder oder solche, die mit frischem Gras gefüttert werden, sowie für Tiere, die nach ökologischen Standards gehalten werden (Forstmaier et al., 2021).

1.2. Lebenszyklus

Damit *C. daubneyi* seinen heteroxenen Lebenszyklus schließen kann, ist neben dem Endwirt das Vorhandensein eines geeigneten Zwischenwirts obligatorisch. Dazwischen laufen Entwicklungsphasen in der Umwelt ab. Domestizierte Wiederkäuer, wie Rinder, Schafe, Ziegen und Büffel, sowie Wildwiederkäuer und Neuweltkameliden kommen als Endwirt infrage (Deplazes et al., 2020; Millar et al., 2017). Die Zwergschlamm Schnecke *G. truncatula* aus der Familie der *Lymnaeidae* stellt den Haupt-Zwischenwirt *C. daubneyi* dar (Abrous et al., 2000; Iglesias-Piñeiro et al., 2016).

Die ovalen, farblosen, unembryonierten Eier *C. daubneyi* werden durch den infizierten Endwirt mit dem Kot in die Umwelt ausgeschieden. Unter bevorzugten Bedingungen, mit ausreichend Feuchtigkeit und einer Temperatur von 15 bis 25 °C, entwickelt sich im Parasiten nach wiederholten Zellteilungen ein Embryo, welcher innerhalb drei Wochen zum Mirazidium, der Flimmerlarve, ausreift (Deplazes et al., 2020; Sey, 1977). Die Mirazidien schlüpfen, ausgelöst durch Lichtreize, aus ihrer Eihülle, schwimmen zu einer geeigneten Zwischenwirtschnecke und dringen in diese mit bohrenden Bewegungen ein (Kumar, 1999).

Im Zwischenwirt findet anschließend die Weiterentwicklung und ungeschlechtliche Vermehrung des Parasiten statt (Fenemore et al., 2021): Nach der Penetration in die Schnecke entwickeln sich die Mirazidien durch Verlust einiger innerer Strukturen und ihrer bewimperten Epidermisplatten zu ovalen Sporozysten weiter. Diese wachsen in den darauffolgenden acht bis zehn Tagen bis auf das 10-fache ihrer ursprünglichen Größe an (Sey, 1977). Sporozysten beherbergen Keimballen, welche sich ungeschlechtlich zu Redien der ersten (etwa am Tag 14 p. i.) und zweiten Generation (ab Tag 28 p. i.) differenzieren (Abrous et al., 1996; Kumar, 1999). Die Redien treten aus der Elternsporozyste aus und nehmen selbst an Größe zu, bis sich die Keimlinge in ihnen zu Prozerkarien (unreifen Zerkarien) entwickeln. Auch die ersten Prozerkarien verlassen nach etwa 35 Tagen p. i. wiederum ihre Elternredie und setzen ihre Differenzierung bis zur reifen Zerkarie fort (Dinnik, 1962; Sey, 1977). Die Zerkarien werden schließlich etwa 42 Tage nach Infektion aus der Zwischenwirtschnecke ausgeschüttet (Dinnik, 1962; Kumar, 1999). Sie schwimmen an umliegende Pflanzen heran und enzystieren durch Schwanzabwurf und Einkapselung an ihnen zu runden Metazerkarien. Metazerkarien haben einen

Durchmesser von 200 bis 250 μm und stellen das infektiöse Stadium für den Endwirt dar. Sie bleiben bei ausreichender Feuchtigkeit bis zu fünf Monate lang in der Umgebung infektiös, gehen aber bei Trockenheit schnell zugrunde (Deplazes et al., 2020).

Die Infektion des Endwirts erfolgt oral mit der Aufnahme von Metazerkarien mit dem Futter oder Trinkwasser (Kahl et al., 2021). Diese exzystieren im Dünndarm und reifen für etwa zwei Monate im Duodenum zu Jungegeln heran, ehe sie retrograd über die Vormägen bis in den Pansen abwandern und sich dort an den Pansenzotten anhaften (Fuertes et al., 2015; Kumar, 1999). Adulte Panseneigel sind ausgereift etwa 3 bis 12 mm lang, birnenförmig und rosafarben (Deplazes et al., 2020). Sie pflanzen sich im Pansen geschlechtlich fort und legen ihre Eier direkt in den Vormagen ab. Die Eier werden schlussendlich nach einer Präpatenzzeit von etwa drei Monaten (Rind, Schaf) über die Ingesta und den Magendarmtrakt wieder in die Umwelt ausgeschieden (Deplazes et al., 2020; Fenemore et al., 2021; Wenzel et al., 2025).

1.3. Zwischenwirte

Zu den typischen Habitaten der Zwergschlammschnecke *G. truncatula* (Abb. 1), welche ebenso den Haupt-Zwischenwirt des großen Leberegels *F. hepatica* darstellt, gehören verschiedene Süßwasservorkommen wie z. B. langsam fließende Bäche, Quellen, Moore und Drainagegräben (Abrous et al., 1999c; Augot et al., 1996; Rondelaud et al., 2016; Schweizer et al., 2007). In Deutschland, Spanien und Großbritannien wurden bisher keine weiteren Zwischenwirtarten *C. daubneyi* identifiziert (Iglesias-Piñeiro et al., 2016; Jones et al., 2015; Küchler, 2021; Martínez-Ibeas et al., 2013).

In Frankreich findet die Schlammschneckenart *Omphiscola glabra* als möglicher Zwischenwirt *C. daubneyi* Erwähnung (Abrous et al., 2000; Dreyfuss et al., 2014). Allerdings wird *G. truncatula* gegenüber *O. glabra* als Zwischenwirt bevorzugt, wenn beide Schnecken im selben Habitat leben (Abrous et al., 1999c).

Auch *Pseudosuccinea columella* wird als möglicher Zwischenwirt beschrieben, der allerdings eine altersabhängige Resistenz gegen eine *C. daubneyi* Infektion zu haben scheint (Dar et al., 2015).



Abbildung 1: Schneckengehäuse von *G. truncatula*

Natürliche Koinfektionen von *G. truncatula* mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* werden schon seit den 1990er Jahren beobachtet (Rondelaud et al., 2004). Beide Parasiten sind häufig in denselben Gebieten oder Habitaten vorzufinden, trotzdem sind Doppelinfektionen des Zwischenwirts verhältnismäßig selten (Abrous et al., 2000; Jones et al., 2017b; Jones et al., 2015).

Bei experimentellen Infektionsstudien konnten unterschiedliche Reaktionen der Parasiten auf Temperaturschwankungen im Habitat (niedrigere Temperaturen begünstigen *C. daubneyi*, konstante, wärmere Temperaturen *F. hepatica*) und die Gehäusegröße der Schnecken (eine zunehmende Größe erhöhte die Infektionswahrscheinlichkeit mit *F. hepatica*, eine abnehmende Größe die mit *C. daubneyi*) festgestellt werden (Abrous et al., 1999a; Abrous et al., 1999b; Iglesias-Piñeiro et al., 2016). Kommt eine Doppelinfektion tatsächlich zustande, beeinflussen sich die beiden Parasiten gegenseitig negativ in ihrer Entwicklung, während immer eine der Spezies die Dominanz in der Schnecke zu übernehmen scheint (Rondelaud et al., 2007).

1.4. Prävalenzen in Europa

Noch vor einigen Jahren wurde der Paramphistomidose in Europa wenig Beachtung geschenkt, mittlerweile gilt sie aber aufgrund stetig steigender Prävalenzen und vereinzelt verheerenden Ausbrüchen als ernstzunehmende, sich ausbreitende Parasitose (Huson et al., 2017).

Eine in Frankreich durchgeführte Langzeituntersuchung im Zeitraum von 1990 – 1999 zeigte erstmals einen deutlichen Anstieg der Pansenegel Prävalenz von 5,2 % auf 44,7 % bei Weiderindern (Mage et al., 2002). Auch in Irland stieg zwischen 2009 und 2013 der Anteil positiver Pansenegelbefunde bei Rindern von 3 - 9 % auf

20 % an (Zintl et al., 2014). Mittels molekularer Speziesidentifikation, wie der Multiplex-PCR-Analyse (Martínez-Ibeas et al., 2013) und Kotuntersuchungen mittels Sedimentation (Hecker et al., 2024), wurden mittlerweile etliche Daten zum Vorkommen des Pansenegels in Europa erhoben. So wurde auf Herdenbasis eine Prävalenz bei Rindern von 59 % in Wales (Jones et al., 2017a), 55 % in der Mittelmeerregion (Bosco et al., 2021), 22 % in Belgien (Malrait et al., 2015) und 15,8 % in den Niederlanden (Ploeger et al., 2017) erfasst. Bei Schafen lagen die Prävalenzen bei 77,3 % in Irland (Martinez-Ibeas et al., 2016), bei bis zu 44 % bei Lämmern in Spanien (García-Dios et al., 2024) und bei Ziegen bei 7,9 % bzw. 2,7 % in der Mittelmeerregion (Bosco et al., 2021).

Auch auf Einzeltieruntersuchungen basierende Ergebnisse zeigten hohe Prävalenzen bei Rindern von 53,8 % in Nordirland (Atcheson et al., 2020), 29 % in Schottland (Sargison et al., 2016), 18,8 % in Spanien (González-Warleta et al., 2013) und 12,9 % in der Tschechischen Republik (Bastyrova Brutovska et al., 2023).

Mit Werten auf Herdenebene zwischen 5,5 % (Forstmaier et al., 2021) und 17,6 % (May et al., 2019) bei (Milch-) Rindern und 2,2 % bei Schafen und Ziegen (Alstedt et al., 2022) liegen die Prävalenzen in Deutschland aktuell noch deutlich unter denen der Europäischen Nachbarländer. Während *C. daubneyi* anteilmäßig auch in Deutschland klar dominiert, wurde darüber hinaus, wenn auch deutlich seltener, die Pansenegelspezies *P. leydeni* gefunden. Erst kürzlich wurde erstmals eine Doppelinfektion von Rindern von *C. daubneyi* und *P. leydeni* festgestellt (Hecker et al., 2024).

1.5. Pathogenese und klinisches Bild der Paramphistomidose

Das klinische Bild der Paramphistomidose wird hauptsächlich durch eine starke intestinale Infektion mit Jungeweln verursacht, welche an der Dünndarmschleimhaut anhaften (Deplazes et al., 2020). Histologische Untersuchungen zeigen an betroffenen Stellen sowohl im Duodenum, als auch im Abomasum, hämorrhagische Läsionen und Ödeme mit Infiltration von Entzündungszellen (Devos et al., 2013; Fuertes et al., 2015). Zusätzlich verursachen die Jungeweln im Darm kleine lokale Blutungen und Nekrosen, die mit einem erheblichen Albuminverlust einhergehen können. Durchfall, Anorexie, Dehydratation, Blutveränderungen und Schwäche, bis hin zu Todesfällen sind als

mögliche Folgen der intestinalen Phase beschrieben (Deplazes et al., 2020; Devos et al., 2013; Foster et al., 2008).

Dahingegen entstehen in der ruminalen Phase nur geringe Gewebsschäden, die klinisch unauffällig bleiben und i. d. R. gut toleriert werden (Busin et al., 2023; Deplazes et al., 2020; Zintl et al., 2014). Die adulten Egel (Abb. 2) sitzen vornehmlich im kranialen Pansensack bzw. Pansenvorhof und im Übergang zum Netzmagen (Ferrerias et al., 2014; Sargison et al., 2016).

Ein Zusammenhang zwischen einer steigenden Anzahl an adulten Egeln im Pansen und der weicher werdenden Kotkonsistenz konnte festgestellt werden (Malrait et al., 2015). Eine weitere Studie untersuchte den Effekt eines Pansenegelbefalls auf verschiedene Leistungsparameter von Zweinutzungsrindern: Solange die Infektionsintensität gering ausfiel, bestand kein negativer Einfluss auf die Milchmenge oder die Stoffwechsellage, dennoch tendierten infizierte Tiere zu schlechteren Fertilitätsparametern (Teschner et al., 2025).

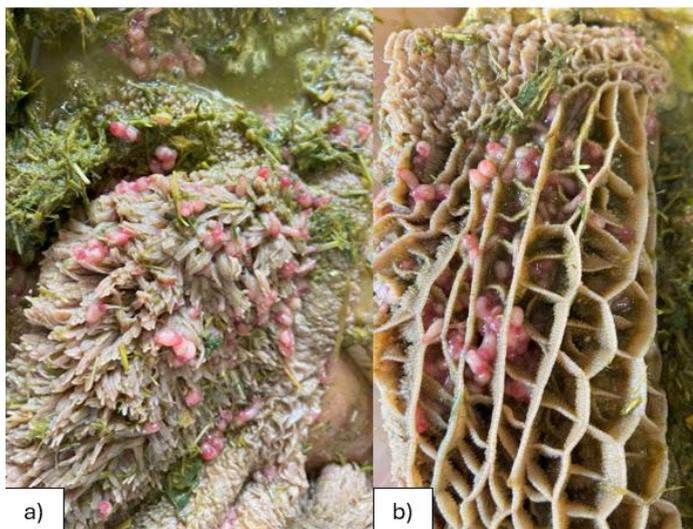


Abbildung 2: Untersuchung eines frisch geschlachteten, mit *C. daubneyi* infizierten Rindes: a) an den Pansenzotten anhaftende, adulte Pansenegel, b) am Netzmagen anhaftende, adulte Pansenegel

1.6. Diagnostik

Zum intravitalen Nachweis einer patenten Paramphistomidose dient die Koproskopie. Zur Untersuchung der Fäzes kann klassischerweise die quantitative Sedimentationstechnik angewendet werden, bei welcher das Sediment unter dem Mikroskop nach Eiern abgesucht wird. Die Eier *C. daubneyi* sind 100 - 190 x 50 - 1150 µm groß und denen von *F. hepatica* in Größe und Form sehr ähnlich, im

Gegensatz zu diesen aber farblos (Deplazes et al., 2020). Höhere FEC-Werte („Fecal egg count“, Anzahl der Wurmeier in „Eier pro Gramm Kot“, EpG) korrelieren mit einer höheren Pansenegezahl in den Vormägen (Sargison et al., 2016).

Weitere koproskopische Methoden sind die kommerziell erhältliche Flukefinder®-Methode (FLUKEFINDER® Diagnostic System, Soda Springs, Idaho, USA) oder der Einsatz der mini-FLOTAC-Technik (Barda et al., 2013). Ein Cut-off-Wert von 200 EpG zeigt hoch infizierte Tiere mit über 200 adulten Egel in den Vormägen an (Malrait et al., 2015). Generell haben alle drei Techniken eine geschätzte Sensitivität von über 90 % und können auf Farmebene eingesetzt werden (Bosco et al., 2023).

Eine sehr frühe Infektionsphase konnte bisher nur postmortal mittels Sieb-Wasch-Verfahren (Deplazes et al., 2020) oder bei einer Sektion diagnostiziert werden, bei welcher die Dünndarmschleimhaut makroskopisch nach juvenilen Stadien im Duodenum und ggf. im Jejunum abgesucht wird (Fuertes et al., 2015).

Einer irischen Forschungsgruppe ist es mittlerweile gelungen, einen Koproantigen-basierten enzymgekoppelten Immunabsorptionstest zu entwickeln, welcher *C. daubneyi*-Antigen im Kot infizierter Rinder potentiell schon während der Präpatenzphase detektiert. Dieser Test zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen Spezies, wie z. B. *F. hepatica* und eine hohe Sensitivität von 93 % (Huson et al., 2021a).

1.7. Therapie und Bekämpfung der Paramphistomidose

Zurzeit steht kein Mittel zur Verfügung, welches explizit für die Behandlung der Paramphistomidose zugelassen ist. Alle verfügbaren Medikamente müssen folglich umgewidmet werden.

Der Wirkstoff Oxyclozanid, welcher für die Behandlung der Fasciolose zugelassen ist (Präparat in Deutschland auf dem Markt unter dem Handelsnamen Distocur®, Boehringer Ingelheim), zeigte sich in mehreren Studien sowohl in vivo, als auch in vitro als wirksam gegen adulte Pansenegeleinstadien in Rindern, Schafen und Ziegen und ist zurzeit das Mittel der Wahl zur Behandlung eines Pansenegelebefalls (Arias et al., 2013; Bastyrova Brutovska et al., 2023; García-Dios et al., 2020; Huson et al., 2021a; Paraud et al., 2009). Eingesetzt werden orale Dosen von 15 mg/kg bei Rindern (Wenzel et al., 2019).

Die Wirksamkeit des Wirkstoffes Closantel scheint von der Applikationsart abhängig zu sein. Während eine subkutane Injektion nur unzureichend wirkte (Malrait et al., 2015), kann die orale Applikation von 10 mg/kg Closantel bei Milchkühen eine mögliche Alternative für diejenigen Länder darstellen, in denen Oxytetracyclin nicht zugelassen ist (Arias et al., 2013).

Neben der medikamentösen Behandlung selbst, spielt die Anpassung des Betriebsmanagements eine wichtige Rolle bei der Minimierung der Infektionswahrscheinlichkeit. Zyklus und Epidemiologie von *C. daubneyi* ähneln dem von *F. hepatica* und hängen stark vom Vorkommen des Zwischenwirts ab (Iglesias-Piñero et al., 2016). Empfehlungen zum Umgang mit dem Pansenegel halten sich deswegen an diejenigen zur Bekämpfung der Fasciolose. Dabei ist es essentiell, bestandsindividuell Habitate potentieller Zwischenwirte ausfindig zu machen, um das Weidemanagement und eine Behandlung entsprechend darauf abzustimmen (Iglesias-Piñero et al., 2016; Knubben-Schweizer und Torgerson, 2015). Hierbei müssen Faktoren wie die Jahreszeit bzw. Trockenperioden und die Fütterungsmethodik berücksichtigt werden (Knubben-Schweizer et al., 2010).

Eine vor Kurzem erschienene Studie untersuchte darüber hinaus, inwieweit genetische Varianten von Rindern mit Infektionen mit *F. hepatica* oder *C. daubneyi* in Verbindung stehen. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass durch eine gezielte Zucht eine erhöhte Resilienz von Rindern gegenüber Infektionen mit beiden Spezies erreicht werden könnte (May et al., 2025).

2. Genomik

2.1. Einführung in die Genomik

Das „Genom“ bezeichnet die Gesamtheit allen genetischen Materials eines Organismus und ist für jedes Individuum einzigartig (Alberts et al., 2002). Es enthält sowohl Gene, die für Proteine und funktionelle RNA-Moleküle codieren, als auch regulatorische und nicht-codierende Sequenzen. In Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) speichert es alle Informationen über beispielsweise die Reproduktion, die Entwicklung, das Wachstum, die Funktionalität oder den Phänotyp eines Organismus (Alberts et al., 2002).

Seit Watson und Crick (1953) herausfanden, dass ein DNA-Molekül diese Information durch ihre spezifische Abfolge vierer Basen kodiert, ist es der Wissenschaft gelungen etliche Genome (teilweise) zu entschlüsseln und mehr über die Biologie vieler Organismen zu verstehen (van Dijk et al., 2018).

Als „Genomik“ bezeichnet man das interdisziplinäre Fachgebiet der Molekularbiologie, das sich mit der Untersuchung und Sequenzierung des Genoms und dessen Aktivitäten beschäftigt (kodierende und nicht-kodierende DNA inkludiert) (Del Giacco und Cattaneo, 2012). Die Integration von Genomik und Transkriptomik wird auch als funktionelle Genomik bezeichnet und hilft ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen Genotyp und Phänotyp zu erlangen (Milward et al., 2016).

2.2. Technologien und Methoden der DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung der ersten Generation wurde mit der „chemischen“ Methode von Maxam und Gilbert (1977) und der „Kettenabbruchmethode“ von Sanger eingeleitet (1977). Auf deren Grundlage wurde in den 1990er Jahren das revolutionäre „Human Genome Project“ begonnen. Mit Hilfe tausender artifizieller Bakterienklone auf der einen und der Erstellung von Plasmid Bibliotheken mit der sogenannten „Shotgun-Sequencing-Methode“ auf der anderen Seite, konnte unter höchstem Rechen-, Arbeits- und Kostenaufwand erstmals das humane Genom bis auf wenige Lücken sequenziert werden. Dieses Projekt legte den Grundstein für fortschrittliche, biomedizinische Forschung und die Genomik der Zukunft (International Human Genome Sequencing, 2004; Venter et al., 2001).

2.2.1. Illumina Sequencing by Synthesis

Durch stetige Weiterentwicklung folgte die Sequenzierung der zweiten bzw. nächsten Generation, darunter die „Sequencing-by-Synthesis“ Methode, die erstmals die parallele Sequenzierung von Millionen von Sequenzcluster ermöglichte (Kukurba und Montgomery, 2015). Kommerziell erhältliche Plattformen von *Roche*, *Illumina*, *Helicos* und *Life Technologies* bewirkten mit ihrer Einführung einen signifikant sinkenden Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand und öffneten damit die Türen für komplexe Genomuntersuchungen (Mardis, 2008; Niedringhaus et al., 2011). Die Erstellung des *Opisthorchis viverrini* Genoms, (Young et al., 2014), des *F. hepatica* Genoms (McNulty et al., 2017) und des *Fasciolopsis buski* Genoms (Biswal et al., 2018) behalfen sich beispielsweise der

Sequencing-by-Synthesis Methode.

In den letzten Jahren wurde die Sequenzierungsindustrie unter anderem von *Illumina* dominiert (Reuter et al., 2015). Im *Illumina*-Sequenzierungsverfahren wird zu Beginn die aufgereinigte (c)DNA-Probe in zufällige, kleine Fragmente geschnitten und mit Adaptoren versehen, welche als Startpunkte für die Sequenzierung dienen und spezifische Erkennungssequenzen enthalten (Abb. 3). Anschließend werden diese Fragmente auf einer festen Oberfläche immobilisiert und mittels PCR vervielfältigt, wodurch Fragmentcluster entstehen. Die DNA jedes Clusters wird linearisiert und denaturiert, indem sie innerhalb der Adaptersequenz gespalten wird. Dadurch entsteht eine einzelsträngige Vorlage für die eigentliche Sequenzierung, welche von einer Seite aus (single-end), oder von beiden Seiten aus (paired-end), erfolgen kann. Die Sequenzierung geschieht durch sich wiederholende Zyklen der schrittweisen Zugabe einzelner fluoreszenzmarkierter Nukleotide, deren Signale basenspezifisch erkannt und visualisiert werden. Mithilfe spezieller Algorithmen können die erhaltenen Clustersignale anschließend zu einer zusammenhängenden Sequenz montiert werden (Bentley et al., 2008; Yuan et al., 2016). Ein großer Vorteil solcher Plattformen sind niedrige Fehlerraten bei der Sequenzierung von unter einem Prozent und ein extrem hoher Durchsatz (Kukurba und Montgomery, 2015). Jede Fließzelle enthält mehrere Reihen, wobei jede Reihe mehrere Millionen Reads produziert. Zusätzlich ist in jedem Sequenzieradapter ein einzigartiger Barcode in Form von Oligonukleotiden integriert, womit mehrere Proben aus unterschiedlichen Quellen gepoolt werden können (Yuan et al., 2016).

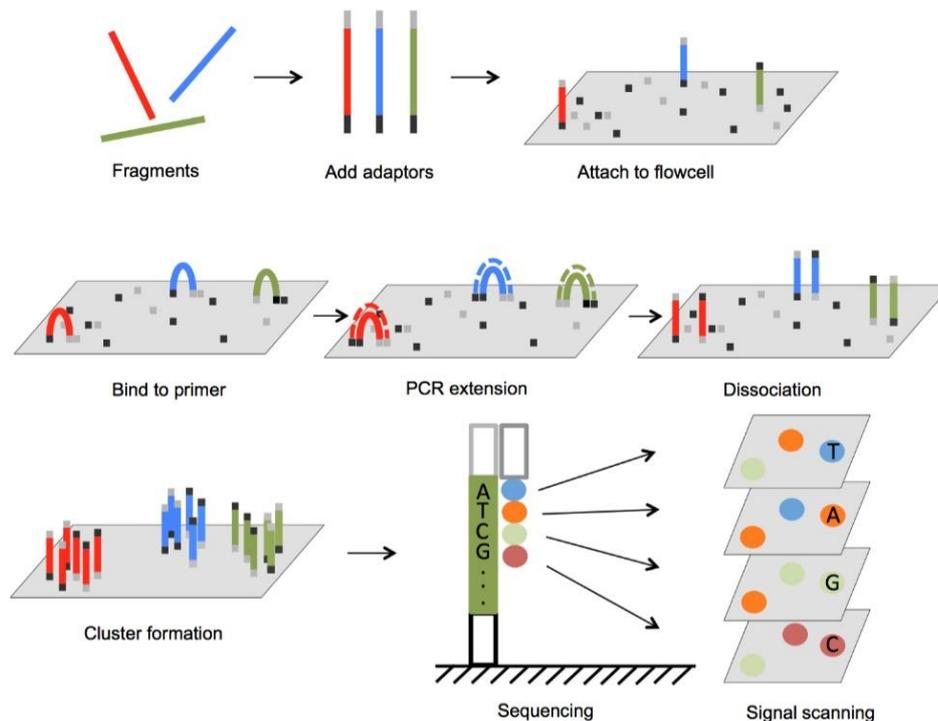


Abbildung 3: Prinzip der *Illumina*-Sequencing-by-Synthesis Methode, übernommen aus Yuan (2016): Adaptoren werden an die DNA-Fragmente gebunden. Die Fragmente binden an Primer auf einer Fließzelle, wo sie per Brücken-PCR zu Clustern amplifiziert werden. Während jedes Sequenzierzyklus wird ein Fluorophor-markiertes Nukleotid an die wachsenden Stränge eingebaut. Diese können per Laser angeregt und deren Signale optisch erfasst werden.

2.2.2. Oxford Nanopore Sequencing

Um die Notwendigkeit von DNA-Amplifikation und optischer Auswertungssysteme zu beseitigen, wurde unter anderem die sogenannte Nanopore Technologie entwickelt, womit die Sequenzierungstechnologie in der dritten Generation angekommen war (Niedringhaus et al., 2011).

Das Oxford Nanopore Technologies Sequencing (ONT) bietet die Möglichkeit, sowohl DNA-, als auch direkt RNA-Sequenzen schnell und in Echtzeit zu sequenzieren und macht derzeit die Sequenzierung zugänglicher und kostengünstiger als noch vor wenigen Jahren (Dyshlovoy et al., 2024). Die sogenannten Nanoporen sind in eine isolierte, elektrisch widerstandsfähige Membran eingebettet, an welche eine konstante Spannung angelegt wird (Abb. 4). Die zu untersuchenden DNA- oder RNA-Stränge wandern durch die Nanoporen und somit durch den hierin erzeugten Ionenstrom. Deren Basen blockieren während der Translokation den Ionenfluss unterschiedlich stark, wodurch sich der

Stromfluss verändert und charakteristische Signale erzeugt werden, die elektronisch identifiziert und wiederum den spezifischen Basen zugeordnet werden können (Deschamps et al., 2016). Polymere mit Kilobasenlänge können so ohne vorherige Amplifikation oder Fluoreszenzmarkierung identifiziert und charakterisiert werden (Branton et al., 2008). Da bei der Sequenzierung keine Nukleotide eingebaut werden müssen, ist die Leselänge theoretisch nur durch die Länge des Nukleotidstranges begrenzt, der durch die Pore wandert. Mithilfe der Nanopore Technologie ist es mittlerweile auch möglich, eine De-Novo-Assemblierung eines Genoms durchzuführen, wie Loman et. al an einem bakteriellen (2015) oder Jain et. al an einem humanen Beispiel (2018) beweisen. Um die Kontinuität und Qualität einer solchen Assemblierung maßgeblich zu verbessern, ist der Einsatz von hochmolekularer, ultralanger DNA nötig (Loman et al., 2015).

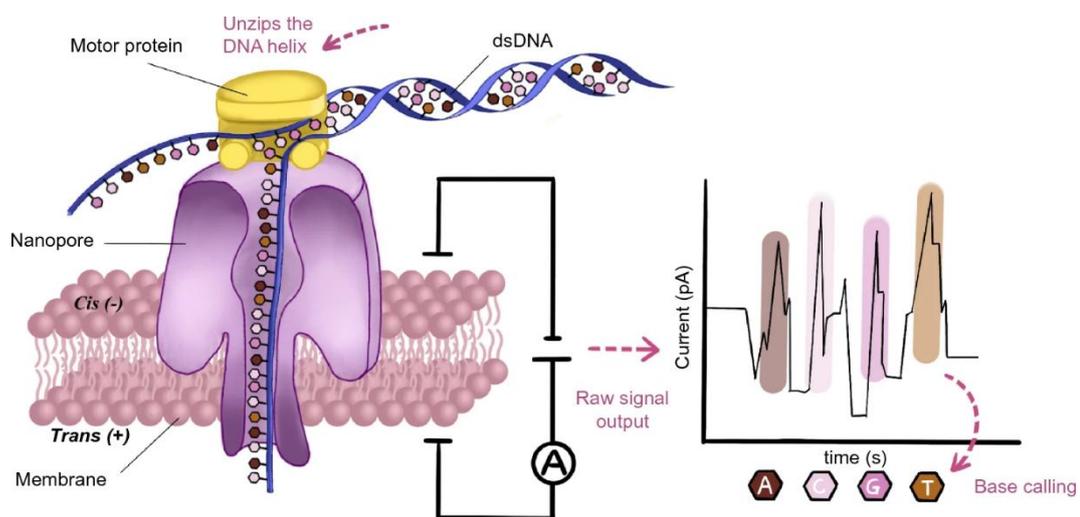


Abbildung 4: Prinzip des Nanopore-Sequencing, übernommen aus Chen und Xu (2023): Unter Spannung bewegen sich negativ geladene DNA- oder RNA-Stränge durch in einer Biomembran eingebettete Nanoporen. Motorproteine spalten zuvor die Doppelstränge auf und steuern die Geschwindigkeit. Jede Base erzeugt spezifische elektronische Stromänderungen, welche abgelesen und durch Algorithmen erkannt werden.

2.3. Überblick über die aktuelle Forschungslage der Egelgenomik

Die raschen Fortschritte bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung und den analytischen Ansätzen haben auch zu einem Zuwachs an Genomressourcen für, oft als „vernachlässigt“ bezeichnete, Wurmparasiten geführt. Sowohl die Zahl öffentlich zugänglicher Helminthengenome, als auch das Forschungsinteresse an ihnen hat in den letzten Jahren enorm zugenommen (Doyle, 2022). Dies hat Portale wie WormBase (Howe et al., 2015) bzw. WormBase ParaSite (Howe et al., 2017) ins Leben gerufen, um mittlerweile über 200 Genomdaten von Nematoden- und *Platyhelminthes*-Spezies zu sammeln, zu veröffentlichen und Forschenden weltweit zugänglich zu machen. Zusätzlich wird aktuell z. B. im Rahmen des „50 Helminth Genomes Project (50HPG)“ intensiv daran gearbeitet, Genom-Entwürfe der wichtigsten Wurmparasiten im Human, Agrikultur und Veterinärbereich zu erstellen und so weitere wichtige Grundlagen zu schaffen (Wellcome Sanger Institute, 2025).

Die ersten vollständig sequenzierten Trematodengenome der Unterklasse *Digenea* (Egel) sind die der Blutwürmer *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma japonicum* und wurden im Jahr 2009 veröffentlicht (Berriman et al.; Zhou et al.). Die Genomstudie half, die Evolution von Lebewesen dieser Art und deren molekulare Architektur zu verstehen und zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien beizutragen (Berriman et al., 2009). Über die Parasit-Wirts-Interaktion wurde bekannt, dass *S. japonicum* in der Lage ist, Nährstoffe, Hormone und Signalwege des Wirts zugunsten seines Wachstums und seiner Entwicklung auszunutzen (Zhou et al., 2009). Mittlerweile sind über ein Dutzend weitere Genome verschiedener Blutegelspezies sequenziert und auf WormBase veröffentlicht (Howe et al., 2015; Howe et al., 2017).

Zunächst folgten Genomstudien der Egelspezies *Clonorchis sinensis* (Huang et al., 2013; Young et al., 2021) und *Opisthorchis viverrini* (Young et al., 2014). Hierbei konnten wichtige Erkenntnisse über deren Migration, Physiologie und Pathologie auf molekularer Ebene (Huang et al., 2013), sowie Überlebensstrategien und Anpassung des Parasiten im Wirt gewonnen werden (Young et al., 2014).

Des Weiteren wurden die Genome des großen Leberegels *F. hepatica* (Cwiklinski et al., 2015; McNulty et al., 2017), des Darmegels *Fasciolopsis buski* (Biswal et al., 2018), des Riesenleberegels *Fasciola gigantica* (Pandey et al., 2020), sowie des

kleinen Leberegels *Dicrocoelium dendriticum* (Berger, 2021) sequenziert. Der Genomentwurf von *F. hepatica* ist mit 1.3 Gb besonders groß und gehört zu den größten bekannten Pathogengenomen. Es wurde ein erhebliches Maß an Polymorphismen, also Genvarianten, festgestellt, was die Fähigkeit zur schnellen Anpassung des Parasiten an Veränderungen der Wirtsverfügbarkeit, an Umweltbedingungen oder an Arzneimittel- oder Impfinterventionen erklären könnte (Cwiklinski et al., 2015).

Umfassende Genomentwürfe von Spezies der Familie *Paramphistomidae* waren bis vor Kurzem nicht vorhanden. Von den nahen Verwandten *C. daubneyi*, *P. cervi* und *Fischoedrius elongatus*, wurden bisher lediglich die mitochondrialen DNA-Sequenzen (mtDNA) bestimmt und als genetischer Marker für ökologische, evolutionäre und diagnostische Studien herangezogen (Yan et al., 2013; Yang et al., 2015).

Zu Beginn des Jahres 2025 wurde nun erstmals die Familie der *Paramphistomidae* berücksichtigt und ein Genomentwurf *C. daubneyi* veröffentlicht, welcher durch die DNA-Sequenzierung von Egelproben aus Nordirland erstellt und mit der Unterstützung von RNA-Seq Daten annotiert wurde (Clancy et al., 2025). Der Genomentwurf ist mit 1,76 Gb noch größer als der von *F. hepatica* und gehört bis jetzt zu denjenigen veröffentlichten Trematodengenomen mit der höchsten Qualität. Die Auswertung konzentrierte sich dabei auf die Anpassung von *C. daubneyi* Entwicklungsstadien an die vorherrschende, mikrobiell diverse Umgebung im Säugetierwendwirt und die Mechanismen, die zu einer erhöhten Eistabilität führen. Eine beachtliche Anzahl an Genfamilien, welche eine Rolle in der Erkennung und Bekämpfung von Bakterien spielen, waren im Vergleich zu anderen phylogenetisch verwandten Spezies erweitert vorhanden und gaben einen detaillierteren Einblick in die morphologischen Anpassungen, die es *C. daubneyi* ermöglichen, sich gegen Mikroorganismen zu verteidigen, sich zu ernähren und sich im Pansen zu vermehren (Clancy et al., 2025).

3. Transkriptomik

3.1. Die Ribonukleinsäure und das Transkriptom

Die Ribonukleinsäure, kurz RNA, spielt eine zentrale Rolle in der Zellphysiologie und in jedem lebenden Organismus. Wie schon Francis Crick in seinem „zentralem Dogma der Biologie“ schreibt, fungiert die RNA als Bote, der die genomische Information der DNA für die Proteinsynthese überbringt (Crick, 1970; Crick, 1958). Ein solch kodierendes RNA-Molekül wird als Messenger-RNA (mRNA) bezeichnet. Die Transkription und die endgültige Ausprägung einzelner Geninformationen, welche beispielsweise durch Umweltfaktoren, Entwicklungsvorgänge und Krankheit verändert werden können, beeinflusst letztendlich die Regulation der biologischen Aktivität und die Identität einer jeden Zelle (Kukurba und Montgomery, 2015).

Heute weiß man, dass die Bedeutung der RNA weit über die reine Botenfunktion hinaus reicht und insbesondere bei Eukaryonten deutlich mehr nicht-codierende (ncRNAs), aber funktionelle RNA-Moleküle existieren, welche beispielsweise biochemische Reaktionen katalysieren und grundlegende, zelluläre Funktionen übernehmen (Mattick und Makunin, 2006). Die transfer RNA (tRNA), als Verbindung zwischen der DNA-Information und der Primärstruktur von Proteinen und die ribosomale RNA (rRNA), als essentielle Komponente des Ribosoms, wurden schon früh beschrieben (Davies, 1984). Darüber hinaus sind mittlerweile zahlreiche weitere RNA-Typen bekannt (Abb. 5), wie z. B. long-non-coding RNAs (lncRNAs), micro RNAs (miRNAs), small nucleolar RNAs (snoRNAs) und short interfering RNAs (siRNAs), wobei jede Klasse seine eigenen Charakteristiken, sowie strukturellen, epigenetischen und regulatorischen Funktionen besitzt (Chen und Meister, 2005; Guo et al., 2010; Mattick und Makunin, 2005; Okazaki et al., 2002; Zhang et al., 2019a).

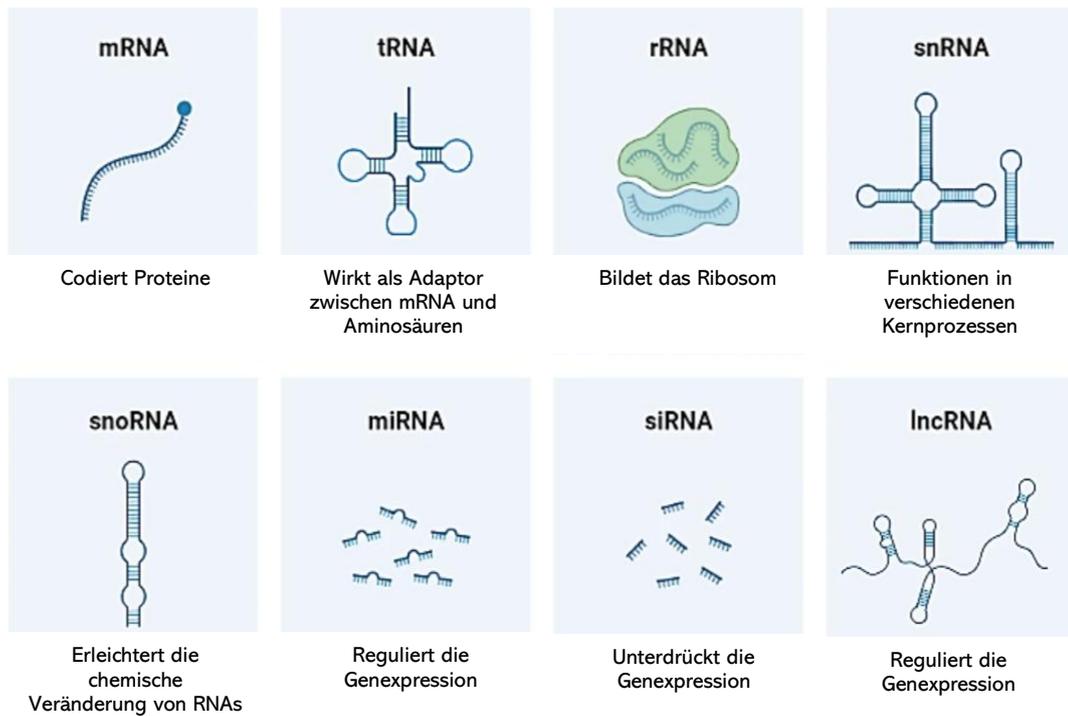


Abbildung 5: Übersicht verschiedener RNA-Typen und deren Funktionen, modifiziert nach Suleiman et. al (2024)

Der Begriff „Transkriptom“ (Abb. 6) wurde 1996 von Charles Auffray geprägt und beschreibt die Gesamtheit aller RNA (einschließlich kodierender und nichtkodierender Moleküle), welche in einem bestimmten Zelltyp, Gewebe oder Organ zu einem definierten Zeitpunkt vorhanden ist (Piétu et al., 1999; Wolf, 2013). Im Gegensatz zum Genom, das im Wesentlichen eine statische Einheit in der Zelle bildet, kann das Transkriptom durch interne und externe Faktoren angepasst werden (Velculescu et al., 1997).

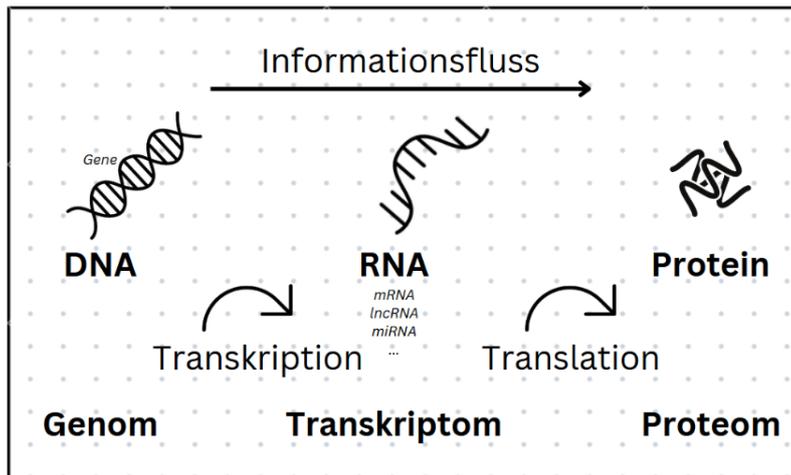


Abbildung 6: Vereinfachte grafische Darstellung des Weges vom Gen zum Protein, modifiziert nach Wolf et al. (2022): Die DNA wird mittels Transkription in RNA umgeschrieben, welche als Vorlage für die Proteinherstellung (Translation) dient oder regulatorische Funktionen während dieses Prozesses ausübt. Die Gesamtheit aller Gene, RNA und Proteine wird Genom, Transkriptom und Proteom genannt.

3.2. Einführung in die Transkriptomik

Die Transkriptomik beschäftigt sich mit der Untersuchung bzw. der Analyse des Transkriptoms und umfasst alle Aspekte, die mit der RNA in Zusammenhang stehen. Die ersten Versuche, das komplette Transkriptom zu untersuchen, begannen in den 1990er Jahren. Seither hat sich die Disziplin technisch enorm weiterentwickelt und ist mittlerweile weit verbreitet (Lowe et al., 2017). Sowohl alle Arten von RNA-Transkripten (kodierend wie nicht kodierend), als auch ihre Transkriptions- und Expressionsniveaus, Funktionen, Transport- und Abbaumechanismen, ihr Vorkommen, ihre Splicing-Muster und posttranskriptionalen Modifikationen, können dabei berücksichtigt werden (Milward et al., 2016; Wang et al., 2009). Insbesondere die Untersuchung der Genexpression unter bestimmten (pathologischen) Bedingungen oder während verschiedener Entwicklungsstufen bietet wichtige Einblicke in die Regulierung von Genen und ermöglicht ein tieferes Verständnis der Biologie eines Organismus. Die Transkriptomik kann darüber hinaus dazu beitragen, Funktionen von bisher nicht beschriebenen Genen zu bestimmen (Lowe et al., 2017).

Moderne Transkriptomstudien finden über die Identifizierung der Funktion von Genen hinaus breite Anwendung. Da der Zusammenbau von RNA-Sequenzierungsdaten nicht zwingend von einem vorhandenen Referenzgenom

abhängt, eignen sie sich ideal für Genexpressionsstudien von Nicht-Modellorganismen, über welche bisher wenig genomisches Wissen vorhanden ist (Grabherr et al., 2011). In der Biomedizin wird die Transkriptomik beispielsweise dafür genutzt, Krankheitsmechanismen besser zu verstehen, neue Virulenzfaktoren zu identifizieren, Antibiotikaresistenzen vorherzusagen und Wirts-Pathogen-Interaktionen zu untersuchen (Ozsolak und Milos, 2011; Suzuki et al., 2014; Wu et al., 2008). Des Weiteren können mit der Hilfe von RNA-Sequenzierungsstudien Maßnahmen zur Kontrolle von Infektionen und individuelle Behandlungsstrategien entwickelt werden (Byron et al., 2016).

3.3. Technologien und Methoden der Transkriptomik

Die Entdeckung der Reversen Transkriptase im Jahr 1970 war ein entscheidender Meilenstein in der Transkriptomik. Das Enzym wird u. a. von Retroviren produziert und besitzt die Fähigkeit, umgekehrt zum Transkriptionsprozess, RNA in DNA umzuschreiben. Mit der Reversen Transkriptase war es erstmalig möglich, instabile RNA-Moleküle in ihre komplementäre DNA (cDNA) mit derselben Sequenz umzuwandeln, welche deutlich einfacher zu konservieren und zu analysieren ist (Coffin und Fan, 2016).

Seither wurden zahlreiche, immer besser werdende Technologien entwickelt, mit welchen es möglich ist, Transkriptome zu analysieren, darunter Hybridisierungsbasierte (indirekte) Methoden, wie Oligonukleotid-Mikroarrays (Schena et al., 1995) und Sequenz-basierte (direkte) Methoden, wie Expressed-Sequence-Tags (Adams et al., 1991) oder die serielle Analyse der Genexpression (SAGE) (Velculescu et al., 1997). Sequenzbasierte Ansätze bestimmen direkt die komplementäre DNA, ohne dass die Nukleotidreihenfolge vorher bekannt sein muss.

3.3.1. RNA-Seq

Die Entwicklung fortschrittlicher DNA-Sequenzierungstechnologien der nächsten (zweiten) Generation (NGS) hat letztendlich die Transkriptomik revolutioniert, in dem sie eine gleichzeitige Analyse etlicher Sequenzen ermöglicht. Diese Methode, die als RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) oder auch als Whole-Transcriptome-Shotgun-Sequencing bezeichnet wird, hat klare Vorteile gegenüber den vorherigen Ansätzen und veränderte die Sichtweise auf eukaryontische Transkriptome (Wang et al., 2009). Die Untersuchung neuer Transkripte, die Analyse der differentiellen

Genexpression und die Charakterisierung alternativer Spleißvarianten ist damit beispielsweise möglich (Kukurba und Montgomery, 2015).

Seither hat sich die RNA-Seq-Methode rasch durchgesetzt. Sie ist eine Kombination aus einer Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode wie dem Next-Generation-Sequencing und rechnergestützten Methoden für die Erfassung und Quantifizierung von Transkripten einer RNA-Probe (Ozsolak und Milos, 2011). Ein typisches RNA-Seq-Experiment umfasst die Extraktion von RNA, ihre Umwandlung in komplementäre DNA, die Vorbereitung einer Sequenzierungsbibliothek und die Sequenzierung auf einer Hochdurchsatz-Sequenzierungsplattform (Lowe et al., 2017). RNA-Proben hoher Qualität sind essentiell für ein erfolgreiches RNA-Seq Experiment (Kukurba und Montgomery, 2015). Um die Genauigkeit des Experiments zu erhöhen, können die relevanten RNA-Klassen nach ihrer Extraktion angereichert werden, indem beispielsweise proteincodierende mRNA separiert oder ribosomale RNA spezifisch entfernt wird (Lowe et al., 2017).

Die gesamte oder fraktionierte RNA wird anschließend in eine Bibliothek aus cDNA-Fragmenten umgewandelt und an einem oder beiden Enden mit Sequenzierungsadaptern versehen. Jedes Molekül wird anschließend im Hochdurchsatzverfahren sequenziert, um kurze Sequenzen vom einen Ende aus (Single-End-Sequenzierung) oder von beiden Enden aus (Pair-End-Sequenzierung) zu erhalten. Je nach verwendeter DNA-Sequenzierungstechnologie, variieren die typischen Read-Längen zwischen 30 - 400 bp (Wang et al., 2009).

Liegen zuvor keine oder wenige Genom- oder Transkriptom-Informationen der untersuchten Spezies vor, müssen die Transkripte zunächst aus diesen Reads rekonstruiert werden, was als De-Novo-Assembly bezeichnet wird. Sind Transkript- oder Genominformationen ohne Weiteres verfügbar, können die Reads direkt anhand der Referenz ausgerichtet werden (Wolf, 2013). Mittels rechnergestützter Analysemethoden kann schlussendlich auf Genomebene eine Transkriptionskarte erstellt werden, welche die Transkriptionsstruktur und das Expressionsniveau jedes Gens enthält (Wang et al., 2009).

Die Anwendung von RNA-Seq ist mittlerweile ein gängiges „Omic“-Werkzeug und wird stetig weiterentwickelt und modifiziert. Dazu gehören neue Ansätze zur Beantwortung immer spezifischerer Fragen bis auf Zellebene, wie beispielsweise

Single-Cell-RNA-Seq, wobei spezifische Transkriptomcharakteristiken aus Subpopulationen von Zellen bestimmt werden können (Haque et al., 2017), oder Single-Cell-Ribo-Seq, wo das mRNA Translationsprofil auf Ribosomebene einzelner Zellen abhängig vom Zellzyklus untersucht und die Vielfalt scheinbar identischer Zellen charakterisiert werden kann (VanInsberghe et al., 2021). Jede (neue) RNA-Seq-Methode bringt Vor- und Nachteile mit sich und muss individuell passend zu den Studienzielen eingesetzt werden, um letztendlich den größtmöglichen Nutzen zu bringen (McClure et al., 2023).

3.3.2. Bioinformatische Analysen

Um Sequenzierungsdaten eines RNA-Seq-Experiments tatsächlich verwerten zu können, sind komplexe computergestützte, bioinformatische und statistische Analysen notwendig, welche in der Regel durch eine Kombination frei zugänglicher Bioinformatik-Softwaretools durchgeführt werden können. Auch schon wenige Sequenzierungsdurchgänge produzieren eine beachtliche Menge an Rohdaten von mehreren Gigabyte (Wolf, 2013).

Der Analyseprozess kann im Wesentlichen in die vier Phasen Qualitätskontrolle, Alignment oder De-Novo-Assembly, Quantifizierung und Differentielle Expression unterteilt werden (Lowe et al., 2017). Bei der Qualitätskontrolle der Rohdaten werden z. B. die Sequenzqualität, der GC-Gehalt und das Vorhandensein von Adaptoren analysiert. Hierdurch sollen Sequenzierungsfehler, Artefakte oder Kontamination erkannt werden (Conesa et al., 2016). Das Alignment, also die Zuordnung der Transkripte, kann idealerweise auf ein schon vorhandenes Genom oder Transkriptom derselben oder behelfsweise einer nah verwandten Spezies geschehen (Wolf, 2013). Ist beides nicht vorhanden, ist eine Neuassemblierung notwendig, was höhere Anforderungen an die Bioinformatik mitbringt (Lowe et al., 2017).

Die häufigste Anwendung von RNA-Seq ist die Schätzung und Quantifizierung der Gen- und Transkriptexpression. Diese Anwendung basiert in erster Linie auf der Anzahl der Reads, die jeder Transkriptsequenz zugeordnet werden (Conesa et al., 2016). Beim Vergleich verschiedener Proben und einer Analyse der differentiellen Expression, führen beispielsweise Unterschiede der Lesetiefe dazu, dass die Proben unterschiedlichere Expressionsmuster zu haben scheinen, als es tatsächlich der Fall ist. Um das zu korrigieren, ist es vorteilhaft die Datenwerte zu normalisieren

(gängige Metriken sind z. B. Fragment Per Kilobase Million (FPKM) oder Read Per Kilobase Million (RPKM)), um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen (Kukurba und Montgomery, 2015).

3.4. Überblick über die aktuelle Forschungslage der Egeltranskriptomik

Auch die Trematodenforschung profitiert immer mehr von den Möglichkeiten der Transkriptomik und ermöglicht beispielsweise mittels differentieller Genexpressionsstudien vergleichende Analysen zwischen unterschiedlichen Arten und Lebenszyklusstadien. Während Arten wie *F. hepatica* in dieser Hinsicht deutlich mehr Beachtung geschenkt wurde, blieb *C. daubneyi* in diesem Punkt bisher allerdings deutlich unterrepräsentiert (Huson et al., 2017).

Interdisziplinäre Transkriptom-Proteom-Studien an adulten *F. hepatica* Stadien enthüllten z. B. sekretorische Proteine und Enzyme und deren Auf- und Abregulation während verschiedener Entwicklungsstadien, der Parasitenwanderung durch den Endwirt oder der Interaktion mit dem Wirtsgewebe bzw. dem Immunsystem (Cwiklinski et al., 2021; Robinson et al., 2009). Ein anderer Ansatz brachte zahlreiche relevante Moleküle *F. hepaticas* zum Vorschein, die in ausschlaggebenden biologischen Prozessen involviert sind und als potentielle Ziele neuer Medikamente oder Impfungen dienen könnten (Young et al., 2010b). Auch ein Zusammenhang von *F. hepatica* Genen mit Virulenzfaktoren oder der Immunmodulation konnte schon mittels vergleichender Transkriptomanalysen erstellt werden (Haçarız et al., 2015).

Es bietet sich an, während der Analyse des Transkriptoms die erhaltenen Sequenzen auf ein zuvor veröffentlichtes Genom zu annotieren bzw. im selben Ansatz zuvor eine Genomsequenzierung zu veranlassen (Biswal et al., 2018; Huang et al., 2013). Da die Möglichkeit besteht, mittels De-Novo-Sequenzrekonstruktion Transkriptomstudien auch ohne vorhandene Genomdaten durchzuführen, können aber auch bereits erste Analysen durchgeführt werden, ehe ein Referenzgenom vorliegt (Haas et al., 2013). Die Methode der De-Novo-Assemblierung wird folglich insbesondere bei bisher weniger erforschten (Trematoden-) Spezies angewandt. So beispielsweise für verschiedene Entwicklungsstadien des Riesenleberegels *F. gigantica* (Zhang et al., 2017), bei adulten Pansenegeln der Spezies *P. cervi* (Choudhary et al., 2015), dem Pankreasegel *Eurytrema pancreaticum* (Liu et al., 2016a) oder dem Pärchenegel *Schistosoma turkestanicum*

(Liu et al., 2016b) geschehen.

Bislang konzentrierten sich Transkriptomstudien an Trematoden überwiegend auf adulte Egelstadien bzw. solche, die sich im Säugetier-Endwirt befinden. Auch die bisherigen Transkriptomstudien *C. daubneyi* fokussierten sich durchgehend auf dessen Stadien im Endwirt. Das erste veröffentlichte *C. daubneyi* Transkriptom wurde mittels De-Novo-Assemblierung erstellt und berücksichtigt ausschließlich adulte Egelstadien (Huson et al., 2018). Es konnten hierbei eine Reihe von Genen identifiziert werden, die möglicherweise bei *C. daubneyi* einzigartig sind (Huson et al., 2018).

Huson et. al (2021b) führten drei Jahre später, mit Hilfe von De-Novo-Assemblierung generierten Sequenzdaten, eine differenzielle Genexpressionsanalyse verschiedener Entwicklungsstadien *C. daubneyi* im Endwirt durch (frisch exzystierte Jungegel des Duodenums (NEJ), unreife Darmegel eingebettet in die Mukosa, neu in den Pansen migrierte Egel, ausgereifte adulte Egel). Je nach Entwicklungsstadium konnten deutliche Expressionsunterschiede individueller Enzyme, Proteine, metabolischer Regulationswege oder immunmodulatorischer Moleküle identifiziert werden. Unter anderem wurde gezeigt, dass in *C. daubneyi* Transkripte, die für die Schlüsselenzyme der Glykolyse/Glukoneogenese, des Tricarbonsäurezyklus und des Malat-Dismutations-Weges kodieren, konserviert sind, wobei insbesondere Enzyme der Glykolyse/Glukoneogenese in adulten Egel die stärkste Expression zeigten (Huson et al., 2021b).

Über Transkriptome freilebender Trematodenstadien oder deren Stadien im Zwischenwirt existieren bislang nur wenige Daten. Die De-Novo-Assemblierung Andersons und Beteiligter (2016) inkludierte in ihre Genexpressionsuntersuchungen neben adulten *S. mansoni* Stadien auch Eier. Im Vergleich zu den adulten Stadien wurden in Eiern Gene für einige Proteine, wie das Glykolipid-Transfer-Protein, Tubulin, oder auch Stress- und Transkriptionsgene deutlich hochreguliert, was mit dem Energietransport innerhalb des Eis bzw. dessen Wachstum und Reifung in Verbindung gebracht wurde (Anderson et al., 2016).

Eine weitere Studie aus dem Jahr 2022 beschäftigte sich ausschließlich mit *F. hepatica* Eiern und deren Transkriptom und Proteom während der Entwicklung bei vorgegebenen Inkubationstemperaturen in vitro (Ilgová et al.). Die Genexpression

der Eier war über den beobachteten Zeitraum nur subtilen Veränderungen unterworfen, während das Peptidaseprofil erheblich modifiziert wurde. Auffällig war darüber hinaus, dass einige proteinkodierende Gene ausschließlich während der sehr frühen Phase der Eientwicklung transkribiert wurden (Ilgová et al., 2022).

Allein Zhang et. al (2019b) untersuchten mehrere Schnecken-Zwischenwirtsstadien *F. giganticas* auf differentielle Genexpression hin. Ein Großteil zeigte stadienspezifische Expressionsmuster. Mirazidien beispielsweise, erwiesen sich als hoch transkriptionsaktiv und exprimierten eine Vielzahl von Genen, die an der Pheromon- und Metallopeptidasenaktivität beteiligt sind, was mit der Zwischenwirtsfindung und der Invasion in diesen zusammenpasst. Die vermehrte Verbreitung von Redien in der Schnecke ging mit einer erhöhten Aktivität von Genen einher, die mit der Regulation der Transkription, Translation und der DNA-Reparatur in Verbindung stehen. Zerkarien blieben auch außerhalb des Zwischenwirts metabolisch aktiv und sichern vermutlich so ihre Langlebigkeit in der Umwelt. Insgesamt erforderten alle untersuchten Stadien reichlich Cathepsin-L-Peptidasen für ihre Migration und Ernährung und exprimierten Gene, die bei der Manipulation der Immunantwort der Schnecke unterstützen könnten (Zhang et al., 2019b).

Betrachtet man die vorhandene Literatur, zeigt sich nicht nur ein großes Defizit an transkriptomischen Daten *C. daubneyis*, insbesondere von Stadien in der Umwelt oder im Zwischenwirt, sondern auch das große wissenschaftliche Potenzial, welche solche hervorbringen könnten. Um ein umfassendes und grundlegendes Verständnis dieses Parasiten zu erlangen, ist zukünftig die Erstellung weiterer „Omic“-Datensätze, neben Genomik und Transkriptomik auch Proteomik, inklusive Sekretomik, Epigenomik oder Mikrobiomik, deshalb dringend notwendig (Huson et al., 2017). Dies führt idealerweise hin zur sogenannten funktionellen Genomik, welche Genexpression, oben genannte und andere Disziplinen miteinander kombiniert, so eine systematische Analyse des Pathogens erstellt und die verschiedensten Gesichtspunkte zu einer zusammenhängenden Einheit fügt. Diese hat letztendlich nicht nur das Potenzial, ein umfassendes Verständnis des Parasiten zu erlangen, sondern auch mittel- bis langfristig die Entwicklung und Umsetzung neuer Bekämpfungsstrategien, wie beispielsweise die Genmanipulation gefährlicher Parasitenstämme, zu ermöglichen. So ließen sich wichtige Zusammenhänge zwischen unterschiedlichsten Pathogenarten, deren (Zwischen-)

Wirte, sich verändernde Umweltfaktoren oder Medikamenteninteraktionen herstellen, welche die Wissenschaft für die Herausforderungen der nächsten Jahrzehnte wappnet (Field, 2022).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewinnung der *C. daubneyi* Probenmaterialien

1.1. Examination infizierter Rinder und Sammlung adulter Pansenegel

Um an frische Proben adulter Pansenegel zu gelangen, wurde in Kooperation mit einem lokalen Haus- und Gewerbeschachter (Rohrer, Schwabmünchen, Deutschland) der Schlachtung infizierter Rinder beigewohnt. Die Rinder der Rasse *Galloway* mit einem Alter von zwei bis drei Jahren stammten vorberichtlich aus einem mit Pansenegel infizierten Mutterkuhbetrieb, auf welchem die Tiere im ersten Lebensjahr ausschließlich auf der Weide gehalten und nur sporadisch entwurmt werden (Anthelmintikum nicht bekannt).



Abbildung 7: Adulte, lebende Pansenegel in NaCl 0,9 %

Bei der Zerlegung der Schlachtkörper wurde der Magen-Darm-Trakt inklusive Pansen, Haube und Blättermagen herausgelöst und für die Examination eröffnet. Die adulten, rosafarbenen Pansenegel mit einer Länge von etwa 0,5 - 1 cm befanden sich an der Schleimhaut anhaftend überwiegend im Pansenvorhof und am Übergang zum Blättermagen. Hiervon wurden sie mit Hilfe anatomischer Pinzetten vorsichtig abgesammelt, mehrmals in vorgewärmter, ca. 38 °C warmer, physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 % B. Braun, Melsungen, Deutschland) gewaschen (Abb. 7) und in vorgewärmte Sammelbehältnisse (Dose mit Schraubverschluss, 500 ml, Kartell Labware, Noviglio, Italien) mit selbiger Lösung für den Transport umgesetzt (Temperaturschwankungen von mehr als +/- 2 °C wurden zu jeder Zeit

vermieden). Zu diesem Zeitpunkt waren alle 1146 gesammelten Egel optisch vital und zeigten deutliche Motilität.

Darüber hinaus wurden mehrere Hundert Egel für spätere Zwecke konserviert. Diese wurden hierfür nach dem Absammeln mehrmals in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Bio&SELL, Nürnberg, Deutschland) gewaschen, je zu fünf in ein 5 ml Tube (5 ml Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gesetzt, unmittelbar auf Trockeneis für den Transport gefroren und anschließend bei - 80 °C gelagert.

1.2. Eiausscheidung adulter Panseneigel

Nach dem Transport ins Labor wurden die Egel in einer frischen NaCl-Lösung bei 38 °C inkubiert (Inkubator Heracell™ VIOS 160i, Thermo Fisher Scientific™, Schwerte, Deutschland). Alle ein bis zwei Stunden wurde die NaCl-Lösung erneuert, indem der Überstand vorsichtig abgekippt und das Gefäß mit neuer vorgewärmter Lösung aufgefüllt wurde. Die Egel wurden dabei visuell auf Vitalität und Motilität hin überprüft. Augenscheinlich verendete Individuen (Farbe wechselte von rosa/blassrosa zu fleischfarben/weißlich, keine Motilität mehr sichtbar) wurden herausgesammelt und für die langfristige Lagerung in 70 %-iges Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) oder PBS verbracht. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis alle Egel verendet waren. Der aufgefangene NaCl-Überstand beinhaltete die frisch ausgeschiedenen, unembryonierten Eier der adulten Egel. Um diese erneut zu waschen, wurde der Überstand in 50 ml Tubes (50 ml CELLSTAR® Tubes, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) überführt und in mehreren Zyklen bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland), um das Absetzen der Eier auf dem Gefäßboden zu erzwingen. Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Tube mit frischem NaCl aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt. Schlussendlich wurde der Überstand bis auf 5 ml abpipettiert, um eine Vergleichbarkeit und die Möglichkeit zur Zählung zu gewährleisten. Um die Anzahl der gewonnenen Eier jeder Ausscheidungs-Runde einschätzen zu können, wurde drei Mal je 1 µl aus der homogenisierten Eier-Lösung heraus pipettiert und die Eieranzahl mithilfe eines Inversmikroskops (LEICA DFC 320) gezählt und hochgerechnet. Je nach Verwendungszweck wurden die Eier in Gruppen aufgeteilt oder bei 6 °C in NaCl für spätere Untersuchungen gelagert.

1.2.1. Gruppe Eier T0: Unentwickelte Eier

Die erste Untersuchungsgruppe „Gruppe Eier T0“ bestand aus frisch von adulten Pansenegeeln ausgeschiedenen, unentwickelten Eiern. Die für diese Gruppe verwendeten Eier stammten ausschließlich aus dem ersten Überstand, welcher unmittelbar nach dem ersten Lösungswechsel aufgereinigt wurde. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Adulte noch lebendig und die Eier maximal drei Stunden alt. Es wurden insgesamt drei T0-Gruppen gebildet, welche für eine RNA-Extraktion am selben Tag vorgesehen waren. Aus Voruntersuchungen ergab sich eine benötigte Mindestzahl von 10.000 Eiern pro Gruppe, welche nicht unterschritten wurde. Eine weitere Gruppe diente zur mikroskopischen Kontrolle (Abb. 8).



Abbildung 8: Mikroskopische Kontrolle frisch ausgeschiedener Pansenegeleier in NaCl 0,9 %

1.2.2. Gruppe Eier T7: Eier zu Beginn der Entwicklung

Die zweite Untersuchungsgruppe „Gruppe Eier T7“ bestand aus Eiern in einem sehr frühen Entwicklungsstadium am Beginn der Zellteilungsphase. Hierfür wurden drei Gruppen mit je ca. 10.000 frisch ausgeschiedenen, gewaschenen Eiern (wie aus Abschnitt III.1.2.1) in ein mit 2000 µl destilliertem Wasser gefülltes 5 ml Tube (5 ml Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und stehend für sieben Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert (Inkubator Heracell™ VIOS 160i, Thermo Fisher Scientific™, Schwerte, Deutschland). Mit einer weiteren Gruppe wurde gleich verfahren und diente als Kontrolle.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Tubes in mehrere Wells einer 6-Well-Platte (TPP-Zellkulturtestplatte 6, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) überführt, um die nun einzeln liegenden Eier unter dem Mikroskop zu kontrollieren und offensichtlich tote bzw. veränderte Eier heraus zu

pipettieren. Anschließend wurden die übrigen Eier einer Gruppe wieder in ein 5 ml Tube zusammengeführt und erneut gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für eine Minute konnte der Überstand abpipettiert und auf das entstandene Eierpellet 450 µl des für die folgende RNA-Extraktion benötigten Puffers (siehe Abschnitt III.3.1) zugegeben werden. Unmittelbar im Anschluss wurde die RNA-Extraktion der drei Proben durchgeführt.

1.2.3. Gruppe Eier T14: Vollständig embryonierte Eier

Die dritte Untersuchungsgruppe „Gruppe Eier T14“ bestand aus vollständig embryonierten Eiern, welche unmittelbar vor dem Mirazidienschlupf standen. Um dieses Entwicklungsstadium zu erreichen, wurden je ca. 10.000 frisch ausgeschiedene, gewaschene Eier (wie aus Abschnitt III.1.2.1) in ein mit 2000 µl destilliertem Wasser gefülltes Well einer 6-Well Platte (TPP-Zellkulturtestplatte 6, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) pipettiert. Eine gleichmäßige Verteilung der Eier auf dem Wellboden wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend wurde die 6-Well-Platte für 14 Tage bei 27 °C im Dunkeln, angelehnt an bestehendes Protokoll aus Elbert (2024), inkubiert (Inkubator Heracell™ VIOS 160i, Thermo Fisher Scientific™, Schwerte, Deutschland). Ein weiterer Ansatz unter gleichen Bedingungen diente als Kontrollgruppe.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden alle weiteren Schritte in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um Lichtreize zu vermeiden und einen vorzeitigen Mirazidienschlupf bestmöglich zu verhindern. Die Eier dreier Wells wurden mikroskopisch auf ihren Entwicklungsstand hin untersucht. Unvollständig entwickelte (d. h. nicht im Embryonalstadium befindliche) und tote Eier wurden heraus pipettiert. Die Eiersuspensionen wurden in 5 ml Tubes (5 ml Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umpipettiert, erneut gewaschen und der Überstand abzentrifugiert (1000 rpm, 1 min). Zum Eierpellet wurden 450 µl des für die spätere RNA-Extraktion benötigten Puffers (siehe Abschnitt III.3.1) dazugegeben. In dieser Form wurden die Tubes bei - 80 °C bis zur RNA-Extraktion konserviert.

1.3. Produktion von *C. daubneyi* Mirazidien und Infektion von *G. truncatula*

Für die Sammlung von *C. daubneyi*-Entwicklungsstadien im Zwischenwirt ist zuerst dessen erfolgreiche Infektion unter Laborbedingungen notwendig. Die Gewinnung der hierfür benötigten Mirazidien und die darauffolgende Infektion der *G. truncatula* Schnecken erfolgte nach dem Protokoll aus Elbert (2024). Hierbei wurden kurzgefasst folgende Schritte durchlaufen:

- 1) Untersuchung von Kotproben mit *C. daubneyi* infizierter Rinder mittels Sedimentationsverfahren
- 2) Identifikation und Sammlung der *C. daubneyi*-Eier mittels Koproskopie
- 3) Inkubation der Eier bei 27 °C für 12 - 15 Tage
- 4) Stimulation des Mirazidienschlupfes mittels Lichtreiz und mikroskopische Kontrolle des Schlupfvorgangs
- 5) Sammlung der schwimmfähigen Mirazidien
- 6) Infektion mehrerer *G. truncatula* Schnecken mit je fünf *C. daubneyi* Mirazidien

Die Infektion der Zwischenwirte wurde in Kollaboration mit Dr. Antonio A. Vázquez und Dr. Annia Alba an der Universität Perpignan durchgeführt.

1.4. Schneckensektion

Die infizierten Schnecken wurden für mehrere Wochen im Labor gehalten und gepflegt (siehe auch Elbert (2024)). Für die Sektion wurden die Weichtiere aus ihrem Habitat entfernt, mit destilliertem Wasser gewaschen und einzeln in eine sterile Petrischale (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit destilliertem Wasser umgesetzt. Durch eine Fixation des Schneckenhauses mit einer Pinzette, konnte der Schneckenkörper mit einer raschen Bewegung aus dem Gehäuse vorverlagert und herausgezogen werden. Die Tiere waren durch diesen Vorgang unmittelbar tot und bewegungslos. Der Körper konnte anschließend bei 100-facher Vergrößerung unter dem inversen Mikroskop untersucht werden.

1.4.1. Gewinnung von *C. daubneyi* Redien

Für die Gewinnung von *C. daubneyi* Redien wurden die infizierten Schnecken ab Tag 21 p. i. seziiert. Schon beim Herausziehen des Schneckenkörpers aus dem Schneckenhaus traten Redien aus dem Körper und Schneckenschleim aus, sie

waren durch den leicht transparenten Schneckenkörper leicht zu identifizieren. Zusätzlich befanden sich etliche Exemplare im Schneckendarm. Die Sammlung und Zählung der Stadien erfolgte mittels einer 10 - 100 µl Pipette (Transferpette® S, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland). Die Redien wurden makroskopisch nicht nach Generation unterschieden. Alle Redien wurden mehrfach in destilliertem Wasser aufgereinigt ehe sie in Gruppen von je 50 Stück in 1,5 ml Tubes (Rotilabo®-Reaktionsgefäße, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) mit 450 µl des für die RNA-Extraktion verwendeten Lysepuffer (siehe III.3.1) gesammelt wurden. Drei Gruppen wurden für die spätere RNA-Extraktion vorgesehen.

1.4.2. Gewinnung von *C. daubneyi* Zerkarien

Um *C. daubneyi* Zerkarien gewinnen zu können, wurden die infizierten Schnecken ab Tag 55 p. i. seziiert. Das Vorgehen war identisch wie in Abschnitt III.1.4.1 beschrieben. Es wurden bei der Sammlung ausschließlich vollständig ausgereifte, schwimmfähige Zerkarien berücksichtigt, wie sie auch aus der Schnecke in die Umwelt austreten würden. Die gesammelten Exemplare wurden mehrfach in destilliertem Wasser gewaschen, in Gruppen von je 50 Stück in 1,5 ml Tubes (Rotilabo®-Reaktionsgefäße, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt und 450 µl Lysepuffer (siehe III.3.1) hinzugefügt. Drei Gruppen wurden für die spätere RNA-Extraktion vorgesehen.

1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Bestätigung der Spezies *C. daubneyi*

Um die Spezies *C. daubneyi* der gewonnenen Proben eindeutig zu identifizieren, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Das hierbei verwendete Protokoll wurde aus der Dissertation von Kückler (2021) übernommen. Analysiert wurden Pansenegeleier aus Abschnitt III.1.2.1, eine infizierte Schnecke aus Abschnitt III.1.3 sowie Redien und Zerkarien aus den Abschnitten III.1.4.1 und III.1.4.2.

1.5.1. DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus den zu untersuchenden Proben unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) extrahiert. Dabei kam eine maschinelle Zerkleinerung mittels SpeedMill PLUS (Analytik Jena GmbH & Co. KG, Deutschland), sowie eine über Nacht andauernde Inkubation (10 - 15 Stunden) zum

Einsatz. Alle weiteren Schritte wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers und den Vorgaben aus Küchler (2021) durchgeführt.

1.5.2. Primer

Für die PCR wurde der Primer Cd-Cox Neu (Primer-Sequenz forward: GTTTGTGTGGTTTGCCACGG; reverse: CTACCCCAAGCAGCCACTAC, 169 bp) verwendet (Jones et al., 2015). Die Stocklösung wurde zu einer Arbeitslösung mit einer Konzentration von 5 pmol/μl verdünnt (Verdünnungsverhältnis 1:20).

1.5.3. Positiv- und Negativkontrolle

Als Positivkontrolle diente die DNA eines zuvor verifizierten, adulten Pansenegels. Die Negativkontrolle bestand aus 5 μl nukleasefreiem, autoklaviertem Wasser.

1.5.4. Temperatur-Protokoll

Für die PCR wurde der Professional Thermocycler von Biometra Analytik Jena AG und die Software qPCRsoft 3.4 (Analytik Jena AG) verwendet. Das Temperaturprotokoll ist in Tab. 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Temperaturprotokoll der PCR

PCR-Phase	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	1	30
Primerhybridisierung	59	1	
Elongation	73	1	
Finale Elongation	73	5	1

1.5.5. Elektrophorese

Die DNA wurde mit einem automatisierten Elektrophoresesystem, dem 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), analysiert. Dabei kam das D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zum Einsatz. Das System ermöglichte eine Auftrennung im Bereich von 25 bp (Lower-Marker) bis 1500 bp (Upper-Marker). Die gesamte Analyse wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Als positiv wurden alle Proben bewertet, die um +/- 10 bp von der Positivkontrolle dieses Durchlaufs abwichen.

2. DNA-Extraktion, Vorarbeiten und Durchführung der DNA-Sequenzierung

2.1. DNA-Extraktion

Für die Extraktion der hochmolekularen ultralangen genomischen DNA wurde das Monarch® HMW DNA Extraction Kit for Tissue (NEB #T3060) verwendet. Als gefrorenes Ausgangsmaterial des finalen Ansatzes dienten 15,9 mg eines zufällig ausgewählten, mit PBS gewaschenen, gefrorenen, adulten Pansenegels aus Abschnitt III.1.1.

Die Extraktion wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Alle verwendeten 1,5 ml Tubes waren vom Typ DNA LoBind Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Einige Schritte wurden wie folgt modifiziert: Die mechanische Homogenisierung der Probe erfolgte manuell mit Monarch Pestle Tubes auf Trockeneis. Während der Inkubation bei 56 °C für 45 min (Rotations-Inkubator ThermoMixer® C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde eine Rotationsgeschwindigkeit von 700 rpm gewählt, um möglichst lange DNA-Fragmente zu erhalten. Die Zentrifugation zur Auftrennung von DNA- und Proteinphase wurde zwei Mal für je 13 Minuten bei 14,8 Tausend rpm durchgeführt (Mikrozentrifuge Thermo Scientific™ Heraeus™ PICO21, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Um die sichtbare DNA gegen Ende gleichmäßig im Eluat zu verteilen, wurde eine 200 µl weite Pipettenspitze (200 µl UltraPoint® graduiert TipOne® Pipettenspitze, Starlab GmbH, Hamburg Deutschland) genutzt, um sieben Mal auf und ab zu pipettieren.

Um die DNA-Probe weiter zu homogenisieren, wurde sie nach Protokollende 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut sieben Mal mit einer 200 µl weiten Pipettenspitze auf und ab pipettiert, ehe die erste Kontrollmessung durchgeführt wurde. Im Anschluss wurde die Probe zur Relaxation für 24 Stunden bei Raumtemperatur belassen und am nächsten Tag der letzte Homogenisierungs- und Inkubationsvorgang (7 x Pipettieren, Inkubation 60 min bei 37 °C, 7 x Pipettieren) wiederholt und eine zweite Kontrollmessung durchgeführt. Anschließend wurde die Probe bis zur Sequenzierung mehrere Tage bei + 4 °C gelagert.

2.1.1. Bestimmung von Quantität und Qualität der DNA

Um Quantität und Qualität der extrahierten hochmolekularen ultralangen genomischen DNA zu bestimmen und auf Tauglichkeit für eine darauffolgende Genomsequenzierung zu testen, wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten (siehe Abschnitt III.2.1) mehrere photometrische Kontrollmessungen mithilfe des NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Für die Messungen wurde DNA-50 als Sample-Type und eine Wellenlänge von λ 260 nm gewählt.

2.2. DNA-Sequenzierung: Oxford Nanopore Sequencing

Die DNA-Sequenzierung als Grundlage der Genomanalyse wurde extern im Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA) des Genzentrums der LMU München (Deutschland) realisiert. Die Sequenzierung wurde mit einer PromethION 24 Plattform (Oxford Nanopore Technologies, ONT) und einer FLO-PRO114M-Fließzelle unter Verwendung der MinKNOW-Software umgesetzt. Details der Sequenzierung und der spezifischen Einstellungen bzw. Softwares sind in Tab. 2 zusammengefasst. Es wurden zwei Runs (Run01 und Run02) im Abstand von einem Tag mit identischen Plattform- und Software-Einstellungen für eine Dauer von je 72 Stunden abgewickelt.

Tabelle 2: Detailübersicht der zwei Nanopore-Sequenzierungsruns auf der PromethION 24 Plattform (ONT)

Run Setup		Software Versions	
Flow cell type	FLO-PRO114M	MinKNOW	24.02.10
Flow cell type alias	FLO-PRO114M	Bream	7.9.4
Flow cell ID	PAW44736	Configuration	5.9.12
Kit type	SQK-ULK114	Dorado	7.3.9
		MinKNOW Core	5.9.7

Run Settings		Data Output Settings	
Run limit	72 hrs	FAST5 output	Off
Active channel selection	On	FASTQ data output	One file every 10 min
Pore scan frequency	1,5 hrs	POD5 data output	One file per hour
Reserved pores	On	BAM file output	Off
Minimum read length	1000 bp	Bulk file output	Off
Basecalling	Super-accurate basecalling, 400 bps		
Modified basecalling	Off		
Minimum Q score	10		

3. RNA-Extraktion, Vorarbeiten und Durchführung der RNA-Sequenzierung

3.1. RNA-Extraktion

Für die Gesamt-RNA-Extraktionen der insgesamt 15 Proben (3 x Eier T0, 3 x Eier T7, 3 x Eier T14, 3 x Redien, 3 x Zerkarien) wurde das Bio-&SELL RNA Mini Kit (Nürnberg, Deutschland) verwendet. Den frischen Proben wurden je 450 µl des mitgelieferten Lysispuffer SM zugesetzt, ehe sie direkt weiterverarbeitet oder für eine spätere Extraktion bei - 80 °C zur Lagerung eingefroren und am Extraktionstag langsam auf Eis wieder aufgetaut wurden. Zunächst erfolgte eine Übertragung der Proben in Lysis Tubes P mit 2,4 - 2,8 mm großen Keramikkügelchen (Analytik Jena Innuscreen GmbH, Berlin, Deutschland) und die mechanische Homogenisierung mit Hilfe des Homogenisators SpeedMill PLUS (Analytik Jena GmbH & Co. KG,

Jena, Deutschland) im Continuous Mode für eine Minute. Anschließend wurden alle weiteren Schritte der RNA-Extraktion gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zusätzlich wurde ein DNase-Inaktivierungsschritt mit dem DNase I Column Digestion Kit (Bio&SELL, Nürnberg, Deutschland) in das Protokoll eingebaut. Die gereinigte RNA wurde am Protokollende mit je 30 µl nukleasefreiem, autoklavierten Wasser eluiert und bei - 80 °C bis zur weiteren Prozessierung gelagert.

3.1.1. Ermittlung von RNA Quantität und Qualität mittels 4150 TapeStation

Sowohl eine hohe RNA Qualität, als auch eine ausreichende RNA Menge ist für die Durchführung einer Transkriptomanalyse entscheidend. Aus diesem Grund wurden die ausgewählten Proben vor der Weiterverarbeitung dahingehend mit Hilfe des automatisierten Elektrophoresesystems 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) unter Verwendung der High Sensitivity RNA ScreenTapes® und der TapeStation Analysis Software 4.1.1 ausgewertet. Das System ermöglichte eine Auftrennung von 25 nt (Lower-Marker) bis 6000 nt (Upper-Marker). Bei der Analysevorbereitung der Proben (nicht der Leiter) wurde grundsätzlich gemäß Herstellerangaben gearbeitet, allerdings der vorgesehene Hitzedenaturierungsschritt ausgelassen. Vorarbeiten und Literatur gaben Hinweise darauf, dass die 28S RNA von *C. daubneyi* durch die Hitze degradiert und die Analyseergebnisse dadurch verfälscht werden (siehe Abschnitt V.3.2).

3.1.2. Ermittlung von RNA Quantität und Qualität mittels 2100 Bioanalyser

Die Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken, wie auch die RNA-Sequenzierung selbst, wurde vom externen Dienstleister IMG/M Laboratories (Medicover Integrated Clinical Services, Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Der Prozess erfolgte in zwei Chargen (Run01 Pilot Batch und Run02 Batch 2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Nach Probeneingang wurde eine erneute Qualitäts- und Quantitätskontrolle (nachdem die Proben für mehrere Wochen durchgehend bei - 80 °C gelagert wurden) durchgeführt. Dafür wurde das automatisierte Elektrophoresesystem 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. Hierbei wurde, wie in Abschnitt III.3.1.1 erläutert, ebenfalls keine Hitzedenaturierung durchgeführt, um eine Degradation der RNA zu vermeiden.

3.2. Erstellung der RNA-Seq-Bibliotheken

Die Weiterarbeit erfolgte mit je 15 ng jeder RNA-Probe. Zunächst wurde ein Poly(A)-RNA-Selektionsschritt mit dem NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) durchgeführt. Aus dem angereicherten Material wurden mit dem NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) gemäß Herstellerangaben RNA-Seq-Bibliotheken (cDNA) erstellt. Eine Übersicht der verwendeten Adaptersequenzen ist in Tab. 7 dargestellt. Die Adapter-ligierten Fragmente wurden in einer PCR-Reaktion von 15 Zyklen amplifiziert.

3.2.1. Qualitätskontrolle der RNA-Seq-Bibliotheken

Alle Bibliotheken wurde mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) und einem High Sensitivity DNA Assay qualitätsgeprüft. Mit dem Qubit® ds DNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) wurde außerdem deren dsDNA-Konzentration bestimmt.

3.2.2. Library-Pooling und Finalisierung

Alle Einzelbibliotheken wurden zu einem Pool mit ähnlicher DNA-Menge je Probe zusammengefasst. Zur Entfernung von Primer-Dimeren und Adapter-Fragmenten wurde der Pool mit der paramagnetischen Technologie auf Basis von Festphasen-Immobilisierung (SPRI) (AMPure XP Beads, Beckman Coulter) gereinigt. Anschließend wurden die Bibliotheken mit denen aus anderen Projekten gepoolt und mit NaOH denaturiert. Dadurch wird das Vorhandensein von ssDNA-Fragmenten für die Clustergenerierung sichergestellt. Der finale Bibliothek-Pool bestand aus ssDNA-Fragmenten mit Sequenzieradaptern, Sequenzierprimer-Bindungsstellen und Indizes.

3.3. RNA-Sequenzierung: Illumina Sequencing by Synthesis

Die Sequenzierung wurde gemäß des Standardarbeitsablaufes auf einer Illumina NovaSeq® 6000 Hochdurchsatz-Sequenzierungsplattform der nächsten Generation unter Verwendung der Sequencing by Synthesis Technologie und unter Kontrolle der NovaSeq Control Software (NCS) V.1.8.1 durchgeführt. Von uns angefragt wurde eine Single-End-Sequenzierung mit 75 bp. Dies wurde für Run01 Pilot Batch umgesetzt. Für Run02 Batch 2 wurde eine Paired-End-Sequenzierung mit 150 bp beim Dienstleister durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit mit Run01 zu gewährleisten und der ursprünglichen Anfrage nachzukommen, wurden nur die

dabei erstellten forward-Reads für die Weiterarbeit genutzt und auf 75 bp Länge getrimmt (siehe Abschnitt III.3.3.2).

3.3.1. Datenprozessierung und Qualitätskontrolle

Die Bildverarbeitung wurde auf dem Illumina NovaSeq® 6000 Gerät mit der Real Time Analysis 3.4.4 Software (RTA) durchgeführt. Der Illumina Sequence Analysis Viewer (SAV) 2.4.7 wurde für die Bildgebung und die Bewertung der Leistung des Sequenzierungsverlaufs verwendet.

Die primäre Analyse der Illumina-Rohdaten, einschließlich der Signalverarbeitung zu FASTQ-Dateien und der Demultiplexierung indizierter Reads, wurde mit dem Software-Tool bcl2fastq durchgeführt. Die FASTQ-Dateien wurden mit dem QC-Report-Tool CLC Genomics Workbench 23.0.4 (Qiagen) einer Qualitätskontrolle unterzogen.

3.3.2. Trimming

Adapter-Sequenzen, Sequenzen von geringer Qualität (Qualitätsgrenze = 0,05) und mehrdeutige Nukleotide (maximale Anzahl von Mehrdeutigkeiten = 2) wurden entfernt. Alle Sequenzen beider Chargen wurden auf 75 bp vom 3'-Ende aus getrimmt, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten (beides unter Benutzung der CLC Genomics Workbench).

4. Genomanalyse: Bioinformatische Auswertung

Alle bioinformatischen Genomanalysen wurden mit Hilfe der Expertise von Dr. Markus Schmidt des Biomedizinischen Zentrums für physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der LMU München (Planegg-Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

4.1. Read-Assembly

Die Read-Assembly, also das erste Zusammenfügen und Sortieren der Reads (kurze Genomsequenzen) zu längeren Sequenzen (Contigs), erfolgte mit Hilfe des Programms *NextDenovo* Version 2.5.2 unter Standardeinstellungen (Hu et al., 2024). *NextDenovo* ist ein Tool für die De-Novo-Assemblierung von Genomen, das sich auf die Verarbeitung und Fehlerkorrektur langer Sequenzierreads konzentriert, die durch Technologien wie Oxford Nanopore erzeugt werden. Die Software

umfasst mehrere Schritte, darunter die Qualitätsoptimierung der Rohdaten, die Auswahl geeigneter Reads, die Berechnung von Sequenzüberlappungen, Konsensbildung und die abschließende Assemblierung zu Contigs (Hu et al., 2024).

4.2. Assembly Statistiken

Die Assembly-Statistiken (Anzahl und Länge der Contigs bzw. der Assembly, Qualitätskontrolle) wurde mit *QUAST* Version 5.2.0 (Quality Assessment Tool für Genome Assemblies) ermittelt (Gurevich et al., 2013). Dies wurde sowohl vor, als auch nach dem Scaffolding-Prozess separat durchgeführt.

4.3. Scaffolding

Scaffolding ist die Ordnung der Contigs in größere, sinnreihige Strukturen (Scaffolds). Dieser Prozess wird häufig mithilfe zusätzlicher Daten, wie beispielsweise Hi-C, durchgeführt (Müller et al., 2018). In diesem Fall existierte durch den schon veröffentlichten nordirischen Genomentwurf *C. daubneyis* ein extrem ähnlicher Genomansatz, welcher als Vorlage verwendet werden konnte und somit zusätzliche Kosten und Aufwand einsparte (Clancy et al., 2025). Der nordirische Genomentwurf ist unter der ENA (The European Nucleotide Archive) Accession Number GCA_964186725 und dem Assembly Name CDAUBV1_v7 abzurufen.

Im ersten Schritt wurde das Programm *Minimap2* Version 2.17-r941 (Voreinstellung: asm10) verwendet (Li, 2018), um deutsche Contigs mit nordirischen Contigs zu alignen (gegeneinander auszurichten) und hierdurch Ähnlichkeiten zu identifizieren. Für deutsche Contigs, welche Ähnlichkeiten zu mehreren nordirischen Contigs aufzeigten, wurden nur die primären Alignements, d. h. die größten Ähnlichkeiten, berücksichtigt. Deutsche Contigs, die im nordirischen Genom benachbart waren, wurden anhand der Alignments sortiert und zusammengefügt. Vorhandene Sequenzlücken wurden je nach Länge mit entsprechend vielen N's markiert.

4.4. Kontaminationsüberprüfung

Um den Genomentwurf auf ggf. vorhandene Genkontaminationen (beispielsweise mit Fremd-DNA von Bakterien) zu überprüfen, wurde das Programm *Kraken2* Version 2.1.3 mit der Standard-Datenbank genutzt (Wood et al., 2019).

4.5. Vergleich von deutschem und nordirischem Genom mittels Dotplots

Die erzeugten deutschen Contigs und Scaffolds wurden mit denen des nordirischen *C. daubneyi*-Genomentwurfes verglichen. Dafür wurden sie mit Hilfe zweier individueller Skripte (Dr. M. Schmidt) sortiert und ein Punktdiagramm (Dotplot) erstellt, das die Übereinstimmungen zwischen den beiden Genomen veranschaulicht.

5. Transkriptomanalyse: Bioinformatische Auswertung

Alle bioinformatischen Transkriptomanalysen wurden mit fachlicher Unterstützung von Dr. Raúl Cosentino vom Biomedizinischen Zentrum für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der LMU München (Planegg-Martinsried, Deutschland) umgesetzt.

5.1. Zuordnung (Mapping) der RNA-Seq Daten zum Genom

Für die Weiterverarbeitung der Rohdaten wurden die in Tab. 3 aufgeführten Programme verwendet.

Tabelle 3: Verwendete bioinformatische Tools zur Erstverarbeitung der RNA-Seq-Daten

Arbeitsschritt	Programm/Tool	Referenz
Mapping	<i>BWA-MEM</i> Version 0.7.18 (r1243)	(Li und Durbin, 2009)
Format-Konvertierung, Sortierung, Indexing	<i>SAMtools</i> Version 1.21	(Danecek et al., 2021)
Entfernung von PCR- Duplikaten	<i>Picard MarkDuplicates</i> Version 3.3.0	(BroadInstitute, 2019)
Erstellung von Coverage-Files entlang des Genoms	<i>DeepToolsBamCoverage</i> Version 2.2	(Ramírez et al., 2016)

5.2. De-Novo-Assembly des Transkriptoms

Für die De-Novo-Rekonstruktion des Transkriptoms wurde das Software-Tool *Trinity* Version 2.15.1 verwendet, welches insbesondere für die Assemblierung der RNA-Seq-Daten von nicht Modellorganismen oder Organismen mit unbekanntem

oder nur teilweise bekanntem Genom geeignet ist (Grabherr et al., 2011). Der vollständige Satz an RNA-Seq-Reads aus allen Lebenszyklusstadien wurde hierfür berücksichtigt. Anschließend wurde mit Hilfe des Programms *bowtie2* Version 2.4.5 ein Re-Mapping durchgeführt (Langmead und Salzberg, 2012), was bedeutet, dass die RNA-Seq-Reads jedes Replikats erneut dem De-Novo-assemblierten Transkriptom zugeordnet wurden. Das Re-Mapping dient der Überprüfung der Qualität und Sinnhaftigkeit der De-Novo-Assembly. Darüber hinaus wurde die Qualität der Assembly weitergehend mit dem Programm *BUSCO* Version 5.8.2 beurteilt (Simão et al., 2015).

5.3. Differenzielle Genexpression

Um festzustellen, inwiefern die Expression einzelner Transkripte variiert und um deren Genaktivität zu bestimmen, wurde mit Hilfe des Programms *salmon* Version 1.6.0 eine Transcript Expression Quantification durchgeführt (Patro et al., 2017). Mittels *DESeq2* Version 1.34.0 konnte anschließend eine paarweise differenzielle Genexpressionsanalyse umgesetzt werden (Love et al., 2014). Mit der Hilfe zweier Tools aus der *Trinity* Software Version 2.15.1 wurden daraufhin die differenziell exprimierten Transkripte geclustert bzw. nochmals in Subcluster unterteilt (Grabherr et al., 2011).

5.3.1. Visualisierung: MA-Plots und Vulcano-Plots

Für eine graphische Visualisierung der differenziellen Genexpression wurden verschiedene Darstellungen gewählt: Die Erstellung der MA-Plots und der Vulcano-Plots erfolgte mit Hilfe der *Trinity* Software Version 2.15.1 (Grabherr et al., 2011). Ziel war es hierbei diejenigen Gene visuell darzustellen, welche zwischen zwei definierten Bedingungen (zwischen zwei Entwicklungsstadien *C. daubneyis*) unterschiedlich exprimiert sind.

Der Cut-Off-Wert für statistisch relevante, differenziell exprimierte Gene (rote Punkte) wurde in beiden Fällen bei einem FDR-Wert von $\leq 0,05$ gesetzt.

5.3.2. Darstellung der differenziellen Genexpression im IGV-Browser

Der *Integrative Genomic Viewer* (IGV) Version 2.18.4 ist ein interaktives Tool, um genomische Daten visuell zu erkunden und ist unter anderem für FASTA und gff3-Formate geeignet (Robinson et al., 2011). IGV erlaubt die Ansicht und den Vergleich verschiedener Tracks, bezogen auf ein Referenzgenom. Als

Referenzgenom diente in diesem Fall das zuvor erstellte deutsche *C. daubneyi* Genom nach Scaffolding. Das Tool wurde in dieser Arbeit zur Visualisierung der differentiellen Genexpression auf Transkriptlevel verwendet. Hierfür wurden die Tracks aller 15 untersuchten Replikate *C. daubneyis* (je drei pro Entwicklungsstadium) in IGV übereinandergelegt.

5.3.3. Visualisierung: Heat-Maps

Mittels *Trinity* Version 2.15.1 (Grabherr et al., 2011) wurden sogenannte HeatMaps („Wärmekarten“) aus den Daten der differentiellen Genexpressionsanalyse erstellt. In der ersten Darstellung (Abb. 20) geschah dies auf Replikatebene, in der zweiten Darstellung (Abb. 21) auf Transkriptebene. In beiden HeatMaps wurden ausschließlich diejenigen 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression berücksichtigt.

5.3.4. Subcluster-Analyse

Im nächsten Analyseschritt wurden alle Transkripte geclustert, d. h. übergreifende Gruppen gebildet, welche ähnliche Expressionsmuster aufweisen. In diesem Fall wurde an Position P_30 geteilt, was 16 Cluster generierte. Das hierarchische Clustering wurde mit einem akzessorischen Skript aus dem *Trinity*-Programm Version 2.15.1 (Grabherr et al., 2011) durchgeführt und grafisch visualisiert. In das Clustering wurden aus jeder paarweisen Analyse die 1000 am stärksten differentiell exprimierten Gene miteinbezogen. Diese wiesen einen p-Wert von $< 0,001$ und einen \log_2 -Foldchange > 2 (entsprechend einer vierfachen Differenz) auf.

5.4. Funktionelle Annotation

Der nächste Analyseschritt galt dem Vorhaben, die Funktion der ermittelten Gene vorherzusagen, auch funktionelle Annotation genannt. Zuerst wurde mittels *Trinotate* ‘*TransDecoder*‘ Version 4.0.2 diejenigen Regionen identifiziert, die wahrscheinlich proteinkodierend sind (Bryant et al., 2017). Anschließend wurden die Transkriptomsequenzen mittels *blastx* Version 2.16.0 (Altschul et al., 1990) mit der *SWISSPROT* Datenbank (Bairoch und Apweiler, 2000) verglichen und nach Homologien gesucht. Mit *blastp* Version 2.16.0 (Altschul et al., 1990) wiederum, wurde die *SWISSPROT* Datenbank mit den vorhergesagten Proteinsequenzen der Transkriptome verglichen. Mittels *hmmscan* Version 2.39.0 (Potter et al., 2018) wurde zusätzlich nach konservierten Domänen in der *PFAM* Datenbank (Mistry et al., 2020) gesucht. Die daraus gesammelten Informationen wurden daraufhin

mittels *Trinotate* 'sqlite' Version 4.0.2 (Bryant et al., 2017) in eine gemeinsame Datenbank geladen um daraus einen endgültigen Bericht zu erstellen.

5.5. GO-Enrichment Analyse

Bei der GO-Enrichment-Analyse soll herausgefunden werden, welche Prozesse, Funktionen oder Zellkomponenten innerhalb einer definierten Gengruppe im Vergleich zum restlichen Genom oder Transkriptom überrepräsentiert sind (Thomas et al., 2022). Die Analyse wurde mit den Tools und Befehlen *Trinotate* 'extract_GO_assignments_from_Trinotate_xls' (Bryant et al., 2017) und *Bioconductor-goseq* Version 1.46.0 (Young et al., 2010a) durchgeführt. Der Cut-Off-Wert des p-Wertes für die *enriched/depleted* GO-Analyse wurde bei 0,05 gesetzt.

IV. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Vorarbeiten

1.1. Eigewinnung aus adulten Pansenegeeln

Durch das in Abschnitt III.1.2 beschriebene Vorgehen konnten insgesamt nach Hochrechnungen ca. 750.350 Pansenegeleier gewonnen werden (Tab. 4). Bei einer Gesamtzahl von 1.146 gesammelten Parasiten sind dies durchschnittlich rund 655 ausgeschiedene Eier pro Egel. Die ovalen, intakten Eier bildeten eine homogene Gruppe, waren einheitlich groß, hell, leicht transparent und ohne erkennbare Entwicklungsstrukturen im Inneren (Abb. 9 (2)). Nach fünf Sammlungen zu vier verschiedenen Zeitpunkten waren alle Egel nach spätestens 8,5 Stunden verendet.

Tabelle 4: Anzahl gewonnener Pansenegeleier aus adulten Egeeln zu unterschiedlichen Sammlungs-Zeitpunkten

	Ø Eizahl in 1 µl	Hochrechnung Eizahl in 5 ml Gesamtüberstand
Sammlung 1/1 (13:45 Uhr)	35,6	178.000
Sammlung 1/2 (13:45 Uhr)	22,67	113.350
Sammlung 2 (15:45 Uhr)	34,25	171.250
Sammlung 3 (16:30 Uhr)	38,3	191.500
Sammlung 4 (18:30 Uhr)	19,25	96.250

1.2. Begutachtung der Kontrollgruppen

Um unabhängig der zahlreichen Vorversuche während der Hauptprobennahme zu begutachten, wie sich die untersuchten Eigruppen verhielten, wurde jeweils eine Kontrollgruppe mitgeführt, welche unmittelbar nach erfolgter Inkubation von sieben bzw. 14 Tagen mikroskopisch überprüft wurde.

Die Eier der Kontrollgruppe T7 (Abb. 9 (3)) zeigten eine beginnende Zellorganisation im Eiinneren. Vereinzelt kamen dunkelbraune Eier (Abb. 9 (4b)) oder Eier mit Austritts des Inhalts vor (Abb. 9 (5)). Derartige Eier wurden in den Hauptproben aussortiert. Nach der Begutachtung wurden die Eier wieder zurück in ihre Tubes überführt, unter selbigen Bedingungen inkubiert und an Tag 9, 10 und 21 erneut beurteilt. Bis Tag 10 konnten kleine Entwicklungsfortschritte beobachtet

werden (Zellteilungen im Eiinneren), danach schien die Weiterentwicklung zu stagnieren (Abb. 9 (4a)). Anzumerken ist, dass bei der Inkubation in Tubes der Eier T7 eine Überlagerung der Eier stattfand und somit, anders als bei der Inkubation in Well-Platten, ein gewisser Gewichtsdruck insbesondere auf unten liegende Eier ausgeübt wurde. Dieser künstlich erzeugte Stress schien die Weiterentwicklung ab einem gewissen Zeitpunkt zu hemmen.

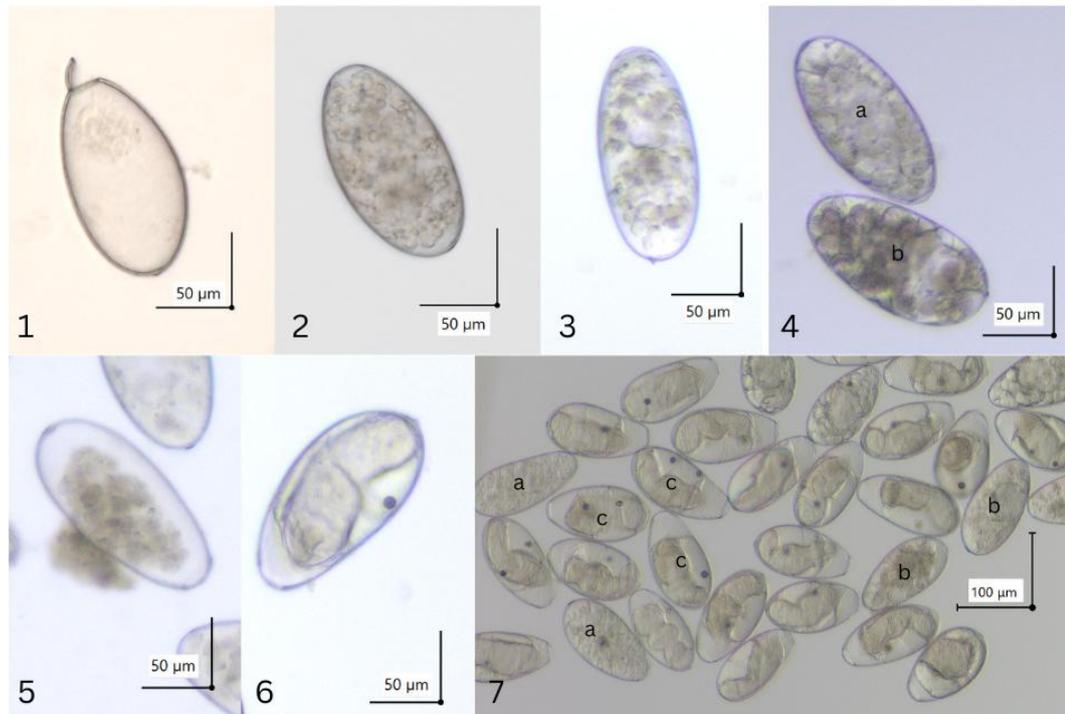


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Eistadien *C. daubneyis*:

Leer nach Mirazidienschlupf (1), frisch ausgeschieden, unembryoniert (2), aus Gruppe T7, beginnende Zellorganisation (3), aus T7 Kontrollgruppe an Tag 10 (4a), tot (4b), tot mit ausgetretenem Inhalt (5), vollständig embryoniert, Eye-Spot-Stadium (6), unentwickelt (7a), unvollständig entwickelt (7b), vollständig embryoniert, Eye-Spot-Stadium (7c)

Etwa 63 % der Eier aus Kontrollgruppe T14 befanden sich nach der Inkubationszeit eindeutig im embryonierten Stadium, d. h. die Zellorganisation im Eiinneren war so weit fortgeschritten, dass die Form eines Mirazidiums erkannt werden konnte bzw. schon das sogenannte Eye-Spot-Stadium erreicht war (Abb. 9 (6 und 7c)). Etwa weitere 20 % der Eier zeigten mindestens eindeutige Zellteilungsvorgänge (Abb. 9 (7b)). Eine darauffolgende Lichtexposition veranlasste geschätzte 80 % der vollständig entwickelten Mirazidien zum Schlupf. Die restlichen Eier waren entweder unentwickelt (Abb. 9 (7a)), deren Schale defekt, tot, oder die Mirazidien

bereits geschlüpft. Alle Eier, die sich nicht im Embryonalstadium befanden, wurden in den Hauptproben heraus pipettiert.

1.3. Sammlung der verschiedenen Entwicklungsstadien *C. daubneyi* im Zwischenwirt

Für die spätere Transkriptomanalyse wurden Redien und ausgereifte Zerkarien *C. daubneyi* mittels Sektion des infizierten Schnecken-Zwischenwirts gewonnen. Hierfür war es notwendig, die Stadien visuell voneinander zu unterscheiden. Abb. 10 zeigt mikroskopische Aufnahmen (Mikroskop BZ-X800 KEYENCE) verschiedenster aufgefundener Pansenebelstadien in der Zwischenwirtsschnecke während der Sektion.

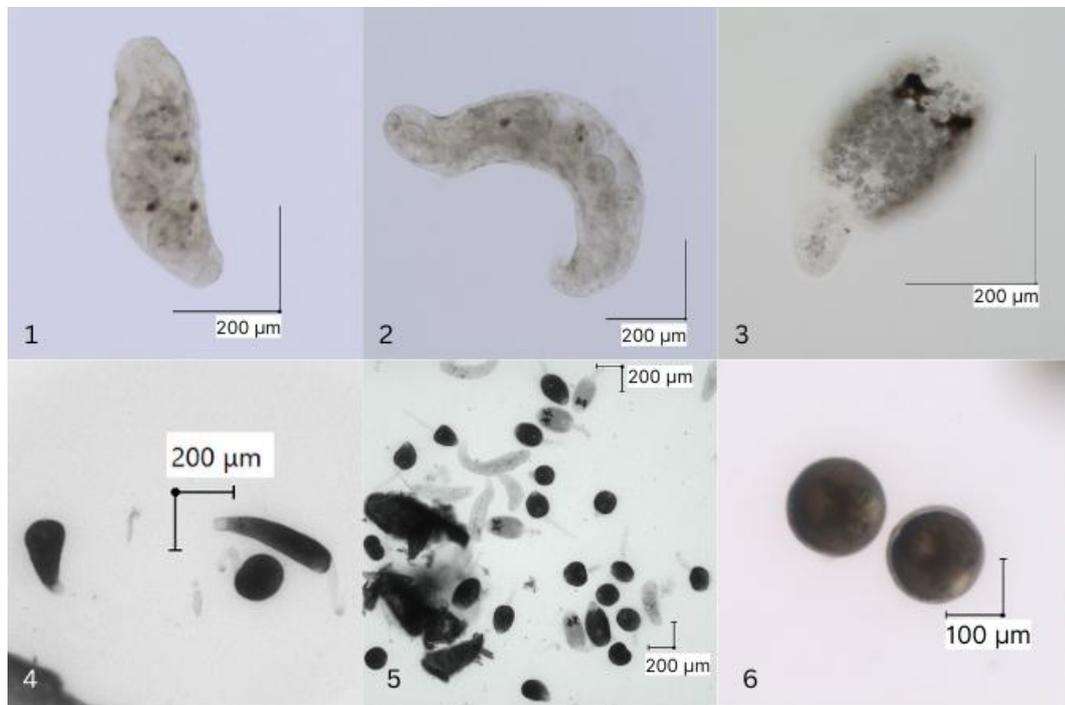


Abbildung 10: Stadien *C. daubneyi* im Zwischenwirt während der Sektion: Redie (1, 2), unreife Zerkarie (3), ausgereifte, schwimmfähige Zerkarien (4), Stadien (aus 1 - 4) durchmischt unmittelbar nach Eröffnung der Schnecke nach Tag 55 p. i. (5), vollständig enzystierte Metazerkarien (6)

1.4. Speziesidentifikation mittels PCR

Um zu bestätigen, dass es sich bei den gewonnenen Proben für die Transkriptomanalyse eindeutig um die Spezies *C. daubneyi* handelt, wurde eine PCR durchgeführt, welche anschließend mit einem virtuellen Elektrophoresegel ausgewertet wurde (Abb. 11).

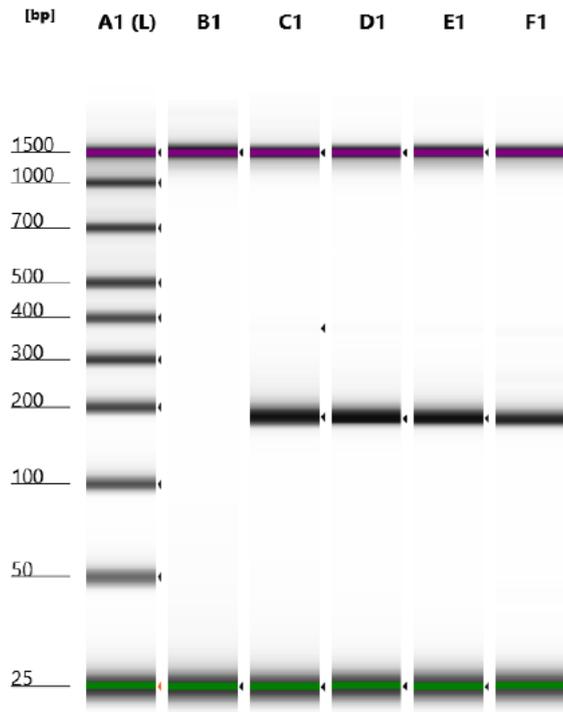


Abbildung 11: Virtuelles Elektrophoresegel der PCR zur Speziesbestätigung der untersuchten Proben: Bande A1 (L): Leiter, Bande B1: Negativkontrolle ohne Signal, Banden C1 (Positivkontrolle), D1 (Pansenegeleier), E1 (Redien und Zerkarien) und F1 (mit Pansenegelmirazidien infizierte Schnecke) mit positivem Signal für *C. daubneyi*-DNA

Als positiv wurden alle Proben bewertet, die maximal +/- 10 bp von der Positivkontrolle (adulter Pansenegel, Bande C1 in Abb. 11) abwichen, deren Signalpeak bei 188 bp lag. Die Signalpeaks der Proben wichen um maximal - 4 bp ab. Die Analyse bestätigte somit die Spezies *C. daubneyi* für alle untersuchten Proben.

1.5. Vorarbeiten zur Genomanalyse

1.5.1. Nanodrop-Messungen zur Bestimmung von Quantität und Qualität der extrahierten DNA

Um Quantität und Qualität der extrahierten hochmolekularen ultralangen genomischen DNA zu bestimmen, wurden mehrere Messungen wie in Abschnitt III.2.1.1. beschrieben durchgeführt (Tab. 5). Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm dient als Maß für die Reinheit von DNA, wobei ein Wert von etwa 1,8 im Allgemeinen als Indikator für reine DNA angesehen wird. Ist das Verhältnis deutlich niedriger ($\leq 1,6$), kann dies auf das Vorhandensein von Proteinen, Phenol

oder anderen Verunreinigungen hindeuten (Lucena-Aguilar et al., 2016). Das 260/230-Verhältnis kann als ergänzender Indikator zur Beurteilung der DNA-Reinheit herangezogen werden. Für reine DNA liegen die typischen 260/230-Werte zwischen 2,0 und 2,2. Niedrigere Verhältnisse können auf Verunreinigungen hinweisen. Allerdings gilt das 260/230-Verhältnis als weniger zuverlässiger Indikator für die DNA-Qualität, da es instabil sein kann, wenn die DNA z. B. in einem salzhaltigen Elutionspuffer gelöst wurde (Lucena-Aguilar et al., 2016).

Tabelle 5: Ergebnisse der Nanodrop-Kontrollmessungen bei λ 260 nm; Messungen 1 - 3 erfolgten nach erster 60-minütigen Inkubation bei 37 °C, Messungen 4 - 6 erfolgten nach weiterer Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur und erneuter 60-minütiger Inkubation bei 37 °C.

	Messung Nr.	DNA in ng/ μ l	260/280 Ratio	260/230 Ratio
Ansatz mit 15,9 mg	1	96,8	1,86	1,22
	2	93,2	1,86	1,22
	3	92,7	1,87	1,22
	4	93,4	1,88	1,22
	5	93,5	1,91	1,24
	6	91,5	1,82	1,28
	$\bar{}$ 1-6	93,52	1,87	1,23

Die 260/280 Ratio erbrachte äußerst zufriedenstellende Ergebnisse um 1,85 (+0,06/-0,03). Der niedrigen 260/230 Ratio (Werte um 1,2) wurde in diesem Fall nur untergeordnete Bedeutung zugesprochen, da der bei der DNA-Extraktion verwendete Elutionspuffer EDTA enthielt, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ratio aufgrund dessen Absorptionsverhalten bei 230 nm negativ beeinflusste (Lucena-Aguilar et al., 2016). Die Probe wurde somit als tauglich bewertet.

1.6. Vorarbeiten zur Transkriptomanalyse

1.6.1. Automatisierte Elektrophorese zur Bestimmung von Quantität und Qualität der extrahierten RNA

Um sicherzustellen, dass sowohl RNA-Menge, als auch RNA-Qualität für eine Transkriptomstudie angemessen sind, wurden die Proben vor Übergabe an den externen Dienstleister (IMG M Laboratories, Martinsried) mittels eines automatisierten Elektrophoresesystems wie in III.3.1.1 beschrieben überprüft. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: RINe-Werte und RNA-Konzentrationen der extrahierten *C. daubneyi* RNA (Tape Station 4150, High Sensitivity RNA ScreenTape®)

Probenbezeichnung	RINe	Konzentration (in pg/µl)	Konzentration (in ng/µl)	Gesamtmenge RNA in 30 µl Eluat (in ng)
Eier Gruppe T0 (1)	9,8	13900	13,90	417,00
Eier Gruppe T0 (2)	9,7	27800	27,80	834,00
Eier Gruppe T0 (3)	9,6	26500	26,50	795,00
Eier Gruppe T 7 (1)	9,1	42700	42,70	1281,00
Eier Gruppe T 7 (2)	9,3	4510	4,51	135,30
Eier Gruppe T 7 (3)	9,3	5340	5,34	160,2
Eier Gruppe T 14 (1)	9,0	850	0,85	25,50
Eier Gruppe T 14 (2)	8,8	10300	10,30	309,00
Eier Gruppe T 14 (3)	9,3	6880	6,88	206,40
Redien (1)	8,0	17800	17,80	534,00
Redien (2)	8,4	28500	28,50	855,00
Redien (3)	9,3	11200	11,20	336,00
Zerkarien (1)	9,1	1010	1,01	30,30
Zerkarien (2)	8,6	1040	1,04	31,20
Zerkarien (3)	9,2	955	0,96	28,65

Bei der Analyse werden sogenannte RINe-Nummern (RNA-Integrity-Number) mit Werten von 1 - 10 ermittelt. Ein RINe-Wert von 10 beschreibt intakte RNA mit hoher Qualität, dahingegen ein Wert von 1 hochgradig degradierte RNA von niedriger Qualität (Schroeder et al., 2006). Angestrebt wurden RINe-Werte von mindestens 7 und eine RNA-Gesamtmenge von mindestens 1 ng pro Probe (Mindestanforderungen nach Erfahrungen des Dienstleisters).

Alle RNA-Proben wurden den Anforderungen gerecht und waren von sehr hoher Qualität.

1.6.2. 2100 Bioanalyzer Kontrollmessung, Erstellung der RNA-Seq Library und RNA-Sequenzierung

Eine erneute Kontrolle von RNA Qualität und Quantität, sowie der gesamte Prozess von der Erstellung der cDNA-Bibliotheken bis hin zur Sequenzierung, wurde detailliert in den Abschnitten III.3.1.2 bis III.3.3.2 beschrieben. Tab. 7 stellt eine Übersicht über die Messergebnisse der Quantitäts- und Qualitätskontrolle, die verwendeten Adaptersequenzen, die Konzentrationen der cDNA-Bibliotheken und die erstellten Sequenzierungsdaten dar.

Die Kontrolle der RNA und entsprechende RINe-Werte waren auch nach der Lagerung und dem Transport zum Dienstleister für eine Sequenzierung ausreichend. Der Sequenzierungsprozess wurde auch mit der Probe Eier Gruppe T14 (1) nach sorgfältiger Abwägung durchgeführt, obwohl der angestrebte RINe-Wert von 7 nach der Lagerung mit einem Wert von 6,80 knapp unterschritten wurde.

Insgesamt wurden **523.227.236 High-Quality-Reads** (Rohsequenzen, Raw Reads) produziert. Die Anzahl der Sequenzen nach dem Trimming-Prozess (Clean Reads) belief sich schlussendlich auf **518.479.102**.

Tabelle 7: Übersicht über Kontrollwerte, verwendete Adaptersequenzen und Sequenzierungsergebnisse während der Erstellung der Sequenzierungsbibliotheken und der RNA-Sequenzierung (Fortsetzung auf nächster Seite)

Probeninformation		2100 Bioanalyzer Messung		RNA-Seq-Library, Quantitätskontrolle, Sequenzierung				
Proben- name	Charge	RNA Konzentration [ng/μl]	RINe- Wert	i7/adapter 1 Index Sequenz	i5/adapter 2 Index Sequenz	Qubit: cDNA- Library Konz. [ng/μl]	Totalanzahl: Roh- sequenzen	Totalanzahl: Sequenzen auf 75 bp getrimmt
Eier Gruppe T0 (1)	Run01	22,70	9,70	TCTAGGAG	AGGTCACT	0,97	20.359.644	17.797.030
Eier Gruppe T0 (2)	Run02	55,80	9,80	AGGTAGGA	GGCGAACA	2,19	47.455.415	45.856.799
Eier Gruppe T0 (3)	Run02	54,08	9,90	TCGCGCAA	TGCCTTGT	1,98	58.010.659	56.091.837
Eier Gruppe T7 (1)	Run02	9,28	9,30	CTCGAAAT	CTTACCTG	0,90	36.637.392	35.275.959
Eier Gruppe T7 (2)	Run01	7,50	8,70	TGCGTAAC	GATAGGCT	1,18	27.324.757	20.973.405
Eier Gruppe T7 (3)	Run02	26,36	9,30	CTCACAAC	GTCTCCTT	1,07	37.552.460	36.168.226
Eier Gruppe T14 (1)	Run02	3,02	6,80	GTAACCAC	ACCTGACT	1,29	38.033.786	36.688.610
Eier Gruppe T14 (2)	Run02	13,37	7,00	CATATCCA	CTTACGGT	2,13	39.026.740	37.676.352
Eier Gruppe T14 (3)	Run01	11,14	7,30	CTTGCTAG	GGAGATGA	1,93	19.730.530	17.212.173

(Fortsetzung Tabelle 7)

Probeninformation		2100 Bioanalyzer Messung		RNA-Seq-Library, Quantitätskontrolle, Sequenzierung				
Proben- name	Charge	RNA Konzentration [ng/μl]	RINe- Wert	i7/adapter 1 Index Sequenz	i5/adapter 2 Index Sequenz	Qubit: cDNA- Library Konz. [ng/μl]	Totalanzahl: Roh- sequenzen	Totalanzahl: Sequenzen auf 75 bp getrimmt
Redien (1)	Run01	19,62	9,30	AGCGAGAT	GATACTGG	1,97	22.146.066	19.294.338
Redien (2)	Run02	37,02	9,70	CGCTAATC	ACGTCATA	3,86	50.234.810	48.527.423
Redien (3)	Run02	8,09	10,00	CTTCCAAC	GTACCCAA	3,24	46.867.451	45.232.284
Zerkarien (1)	Run01	0,82	8,60	TATGGCAC	TCTCGCAA	1,71	19.701.716	17.210.663
Zerkarien (2)	Run02	1,35	7,50	AAGGAAGG	ACTCCGGT	1,79	44.084.412	42.572.682
Zerkarien (3)	Run02	1,22	8,60	GCACACAA	TCGTCAAG	2,43	43.436.055	41.901.321

2. Genomanalyse

2.1. Genomassemblierung und Statistik

Durch die bioinformatische Verarbeitung und Assemblierung der Genomdaten aus den Nanopore-Sequencing Runs konnte erstmalig ein Genomentwurf eines aus Deutschland stammenden, adulten Pansenegels der Spezies *C. daubneyi* erstellt werden. Dieser ist zum jetzigen Zeitpunkt noch lückenhaft und unvollständig, bietet aber für zukünftige detailliertere Sequenzierungsarbeiten eine wichtige Grundlage. Darüber hinaus konnte mit schon vorhandenen *C. daubneyi* Genomdaten aus Nordirland ein erster Vergleich angestellt werden. Nähere Angaben zum Genomentwurf selbst und dessen Assemblierungsstatistiken sind in Tab. 8 und 9 zusammengefasst.

Von den insgesamt 175.670 assemblierten Transkripten, konnten 121.299, also 69 % davon, annotiert werden. Für die übrigen 54.371 Transkripte wurden keine schon bekannten Ähnlichkeiten gefunden, weswegen sie als „de-novo“-Transkripte angesehen werden können.

Es konnte keine signifikante Kontamination mit Fremdgenom festgestellt werden.

Die hier erstellte Erstsequenzierung enthält noch etliche Sequenzlücken, welche mit entsprechend vielen „N’s“ markiert wurden. Berücksichtigt man ausschließlich die tatsächlich sequenzierten Abschnitte (ohne „N“s), so stimmen 78,1 % des deutschen Genomentwurfes mit dem der Nordiren überein.

Tabelle 8: Allgemeine Angaben zum ersten deutschen Genomentwurf *C. daubneyi*

Anzahl vorhergesagter Gene	103.689
Anzahl assemblierter Transkripte	175.670
Anzahl Exons	204.421
Durchschnittliche Exon Länge	12.028 bp
Durchschnittliche Protein Länge	4.009 aa
Anzahl Introns	100.727
Durchschnittliche Intron Länge	12.382 bp

Tabelle 9: Assemblierungs-Statistiken des ersten deutschen Genomentwurfes *C. daubneyi* vor und nach dem Scaffolding im Vergleich zum nordirischen Genomentwurf (Clancy et al., 2025)

	Vor Scaffolding (Contigs)	Nach Scaffolding (Scaffolds)	Nordirischer Genomentwurf (Clancy et al., 2025)
Gesamtanzahl	1591	207	1047 (Contigs)
Anzahl \geq 50.000 bp Länge	1591	207	-
Gesamtlänge	416.429.310 bp (416,43 Mb)	417.813.310 bp (417,81 Mb)	1,761 Gb
Längste Sequenz	1.448.603 bp (1,45 Mb)	18.016.631 bp (18,01 Mb)	-
GC Prozentsatz¹	42,75 %	42,75 %	43,14 %
N50²	277.292 bp (0,28 Mb)	3.762.355 bp (3,76 Mb)	14.590.010 bp (14,56 Mb)
N90	161.250 bp	958.986 bp	2.346.151 bp
L50³	506	30	34
L90	1290	108	145
Anzahl N's pro 100 kb	0,00	331,25	-

2.2. Visueller Vergleich von deutschem und nordirischem Genomentwurf

Nach der Read-Assembly wurden sowohl die generierten Contigs, als auch die Scaffolds mit denen des schon vorhandenen nordirischen *C. daubneyi* Genoms verglichen. Auf dem hierfür erstellten Punktediagramm (Dotplot, Abb. 12 und 13 und digitales Zusatzmaterial, siehe X.4, 1) befinden sich die Sequenzen des nordirischen Genoms auf der X-Achse, die des deutschen Genomentwurfes auf der Y-Achse. Graue Linien zeigen jeweils die Grenzen der einzelnen Contigs an.

¹ Anteil der Nukleotidbasen Guanin (G) und Cytosin (C) im Verhältnis der Gesamtbasen innerhalb einer Sequenz.

² N50/N90-Werte beziehen sich auf die Länge (in bp) des kürzesten Contigs/Scaffolds, welcher mit längeren und gleich langen Sequenzen zusammen mindestens 50 % bzw. 90 % der gesamten Assemblierungslänge abdeckt.

³ L50/L90-Werte beziehen sich auf die Anzahl der längsten Contigs/Scaffolds, welche zusammen mindestens 50 % bzw. 90 % der Gesamtassemblierungslänge entsprechen.

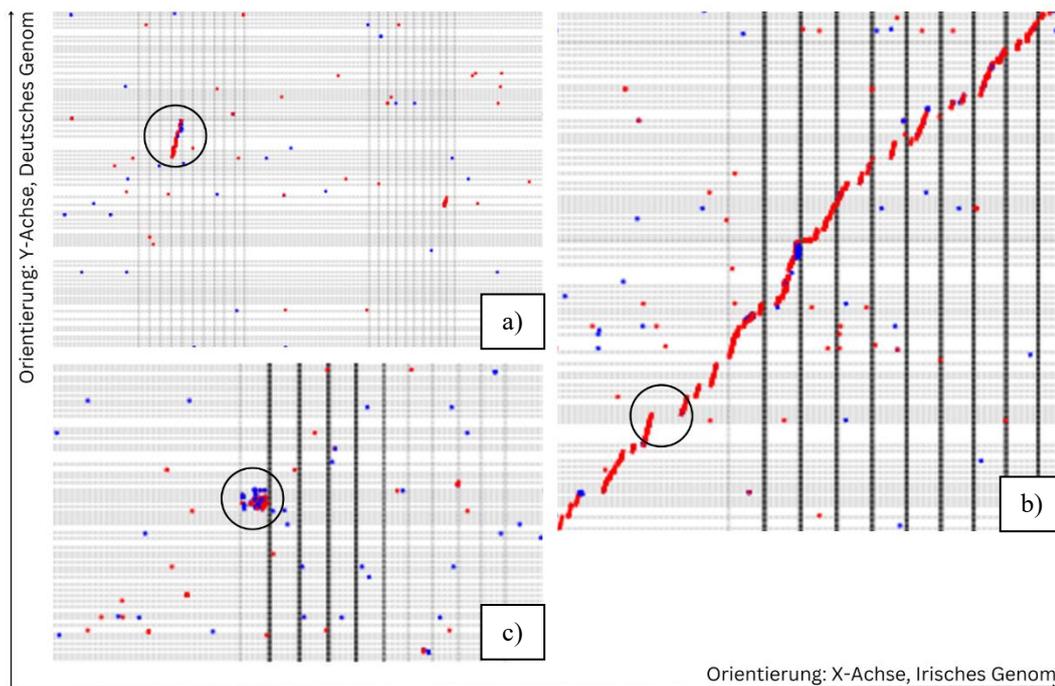


Abbildung 12: Ausgewählte Bildausschnitte des Dotplots (erstellt von Dr. M. Schmidt) zum Vergleich des nordirischen (Clancy et. al, 2025) und deutschen Genomentwurfes; a) parallele Linie zur Diagonalen, b) obere rechte Ecke der Diagonalen mit Unterbrechung dieser, c) Punktgruppe außerhalb der Diagonalen

Jeder individuelle Punkt im Dotplot repräsentiert eine Übereinstimmung zwischen den beiden Sequenzen an der jeweiligen Position. Die ununterbrochene diagonale Linie, die von der unteren linken Ecke zur oberen rechten Ecke verläuft, weist auf eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Genomen hin und ist eindeutig zu erkennen. Das bedeutet, dass die Sequenzen in diesen Abschnitten ähnlich oder identisch sind. Je länger diese durchgehende Linie ist, desto mehr ähnelt sich ein längerer Abschnitt der Sequenz, weswegen im durchgeführten Vergleich somit eine hohe Homologie beider Genomentwürfe ersichtlich ist (Abb. 13). Unterbrechungen in der Diagonalen weisen auf fehlende Genomabschnitte hin (Abb. 12 b). Parallele Linien zur Diagonalen selbst zeigen Duplikationen an, bei denen eine Region innerhalb des Genoms mehrfach vorkommt (Abb. 12 a). Einzelne Punkte oder Gruppen von Punkten außerhalb der Diagonalen zeigen kurze Abschnitte auf, in denen sich die Sequenzen gleichen, sie jedoch nicht zu einem größeren, durchgehenden Bereich gehören. Mehrere Punkte an ein und derselben Stelle weisen darüber hinaus auf Sequenzrepetitionen hin (Abb. 12 c).

Darüber hinaus, wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Genomanalysen durchgeführt.

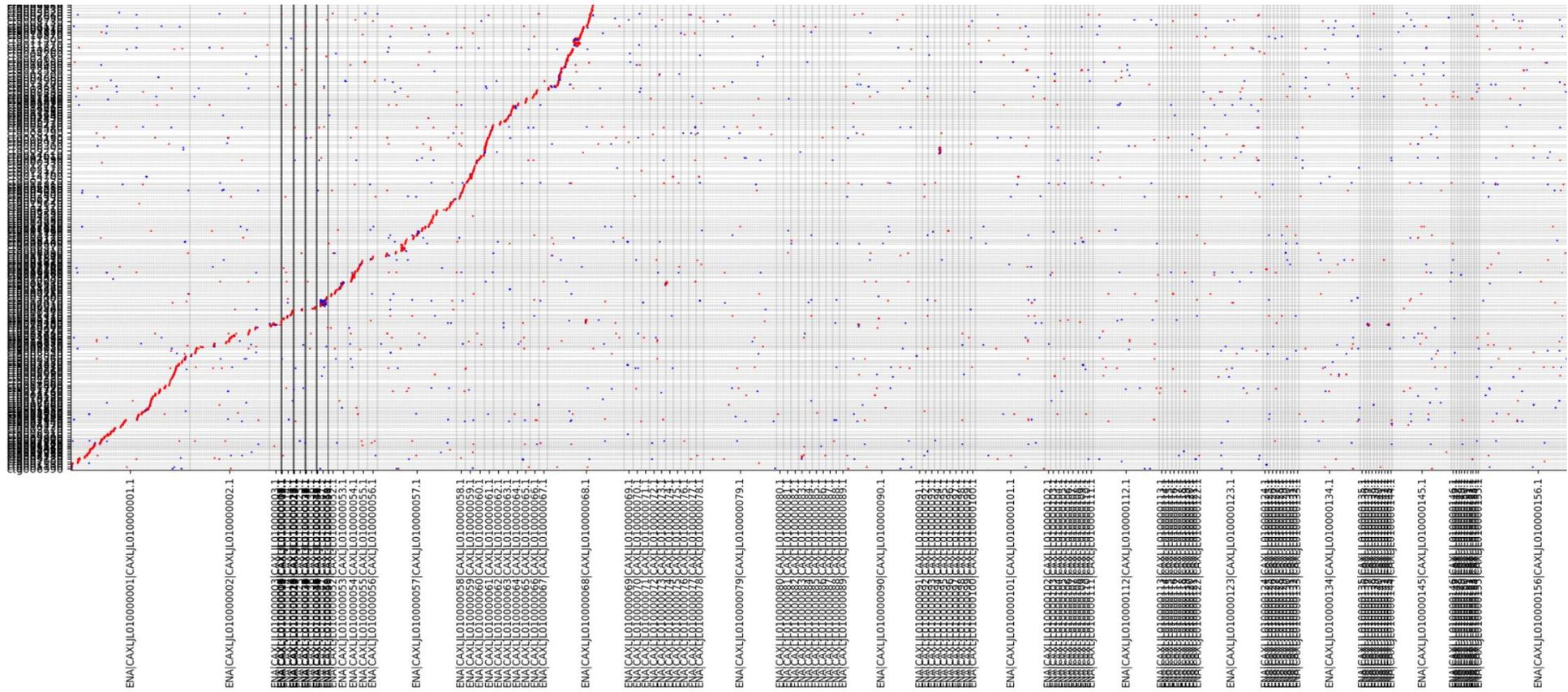


Abbildung 13: Übersichtsbildausschnitt des Punktediagramms (Dotplot, linke untere Ecke) zum Vergleich des deutschen (links, Y-Achse) und nordirischen (unten, X-Achse; Clancy et. al, 2025) Genoms mit Darstellung der Diagonalen (erstellt von Dr. M. Schmidt)

3. Transkriptomanalyse

Das übergreifende Ziel der Transkriptomanalyse war es herauszuarbeiten, ob und in welchem Umfang die Transkripte der verschiedenen Entwicklungsstadien *C. daubneyis* in den untersuchten Replikaten variierten und inwieweit differenzielle Genexpression stattfand. Darüber hinaus wurde von ausgewählten Transkripten eine funktionelle Annotation und GO-Enrichment-Analyse durchgeführt.

3.1. Differenzielle Genexpressionsanalyse

Zu Beginn wurden die untersuchten Entwicklungsstadien dahingehend miteinander verglichen, ob und in welcher Menge stadienspezifische Transkripte existierten. Dafür wurde ein Plot erstellt, welcher quantitativ „stadienspezifische“ Transkripte mit solchen, die „über alle Stadien hinweg“ exprimiert werden, vergleichend analysiert und darstellt (Abb. 14). Als Basis wurde hierfür die Einheit Transcripts Per Million (TPM) gewählt. Die X-Achse zeigt die untersuchten Entwicklungsgruppen, die Y-Achse repräsentiert die absolute Anzahl der Transkripte bei einer Skalierung von 0 – 9000. Als „stadienspezifisch“ wurden alle Transkripte angesehen, welche in allen drei biologischen Replikaten einer untersuchten Gruppe Werte über > 1 TPM erreichten. Als „über alle Phasen des Lebenszyklus hinweg“ exprimierte Transkripte wurden diejenigen bezeichnet, welche in allen drei biologischen Replikaten aller untersuchten Gruppen Werte > 1 TPM erreichten.

In etwa 2600 Transkripte wurden von allen Entwicklungsstadien hinweg geteilt, während gleichzeitig zu jedem Entwicklungszeitpunkt eine stadienspezifische Expression beobachtet werden konnte. Stadienspezifische Transkripte machten bei den Gruppen Eier T0 und Eier T7 nur einen kleinen Anteil aus. Mit einem Wert von über 8000, war die höchste Gesamtzahl an Transkripten bei den Eiern T14 zu finden, wobei hier insbesondere stadienspezifische Transkripte stark überwogen. Allein bei den Eiern T14, war die Gesamtanzahl stadienspezifischer Transkripte größer, als die der gemeinsam exprimierten Transkripte. Zerkarien zeigten ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen stadienspezifischen und geteilten Transkripten. Redien hatten im Vergleich hierzu eine leicht erhöhte Anzahl an stadienspezifischen Einheiten, die Gesamtzahl der Transkripte lag dennoch unter 5000.

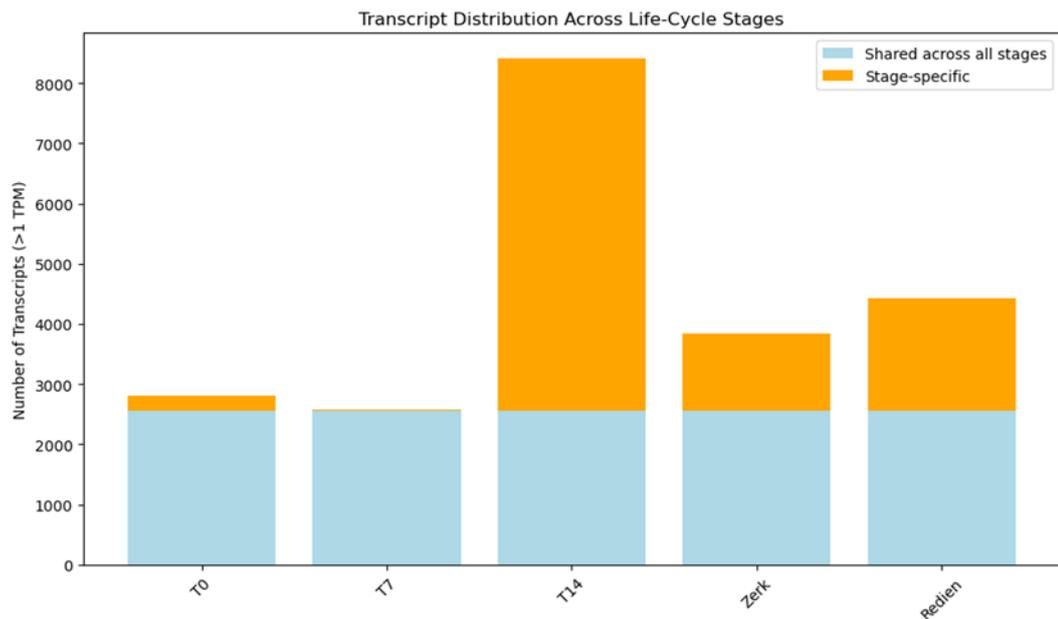


Abbildung 14: Quantitative Transkriptverteilung der untersuchten *C. daubneyi* Entwicklungsstadien, unterteilt in „stadienspezifische“ (orange) und „über alle Stadien hinweg“ exprimierte (blau) Transkripte (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)

3.1.1. Vergleich der differentiellen Genexpression mittels MA-Plots

Um die Änderung der Genexpression zwischen einer Kontrollbedingung und einer experimentellen Bedingung zu visualisieren, ist die Erstellung von MA-Plots gängig. Es wurden insgesamt zehn MA-Plots (Mean-Average-Streudiagramme) erstellt (Abb. 15). Hierbei wurde die differentielle Genexpression der fünf unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Eier T0, Eier T7, Eier T14, Redien und Zerkarien) miteinander verglichen. Die X-Achse zeigt die logCounts an (M-Wert), während die Y-Achse die logFC-Werte darstellt (A-Wert).

Jeder Punkt steht für ein Gen. Rote Punkte gelten als statistisch signifikant, schwarze Punkte hingegen sind statistisch nicht signifikant und vernachlässigbar (basierend auf dem festgelegten FDR-Schwellenwert von $\leq 0,05$). Die logCount-Werte der X-Achse stellen die durchschnittliche Genexpression über beide Bedingungen hinweg als logarithmiertes Mittel dar. Grundsätzlich erscheinen Gene auf dem MA-Plot, welche ähnlich stark in der Vergleichs- wie in der Ausgangsprobe exprimiert wurden, nahe der 0-Linie der X-Achse ($M = 0$). Gene mit höheren X-Werten weiter rechts, zeigen eine höhere durchschnittliche Expression, Gene mit niedrigen X-Werten weiter links, zeigen eine niedrigere durchschnittliche Expression. Die logFC-Werte auf der Y-Achse geben die logarithmische Expressionsänderung zwischen den zwei untersuchten

Bedingungen an. Ein positiver logFC-Wert beschreibt dabei eine stärkere Expression des Gens unter der experimentellen Bedingungen, während ein negativer logFC-Wert den Hinweis auf eine stärkere Expression des Gens unter Kontrollbedingungen aufzeigt.

Untersucht wurden zehn verschiedene Bedingungen, in welchen jede der untersuchten fünf Entwicklungsstadien mit der jeweils anderen miteinander verglichen wurde. Der geringste Expressionsunterschied bestand zwischen Eiern der Gruppe T0 und T7 (Abb. 15 a). Nur wenige Gene wurden zwischen diesen beiden Untersuchungsgruppen hoch oder runter reguliert. Auch die Betrachtung der Vergleiche T0 vs. Zerkarien (Abb. 15 c) und T7 vs. Zerkarien (Abb. 15 d) bzw. Redien vs. T0 (Abb. 15 g) und Redien vs. T7 (Abb. 15 h) zeigt beim Vergleich untereinander, dass verhältnismäßig wenig differenzielle Genexpression zwischen den frisch ausgeschiedenen Eiern und den Eiern am Beginn der Entwicklungsphase stattfand. Dies änderte sich mit der Weiterentwicklung bis zum Eye-Spot-Stadium (Eier T14) signifikant: Im Vergleich T0 vs. T14 (Abb. 15 b) wurden etliche Gene herunter- und auch hinaufreguliert. Generell war eine deutlich höhere Genaktivität zu verzeichnen und die mittlere Genexpression einiger Gene stieg an.

Auch im Vergleich aller untersuchten Gruppen zu Redien waren immer deutliche Aktivitäten in der Genregulation auszumachen (Abb. 15 g - j). Am deutlichsten war die differenzielle Genexpression zwischen Redien und den verschiedenen Eistadien (Abb. 15 g - i).

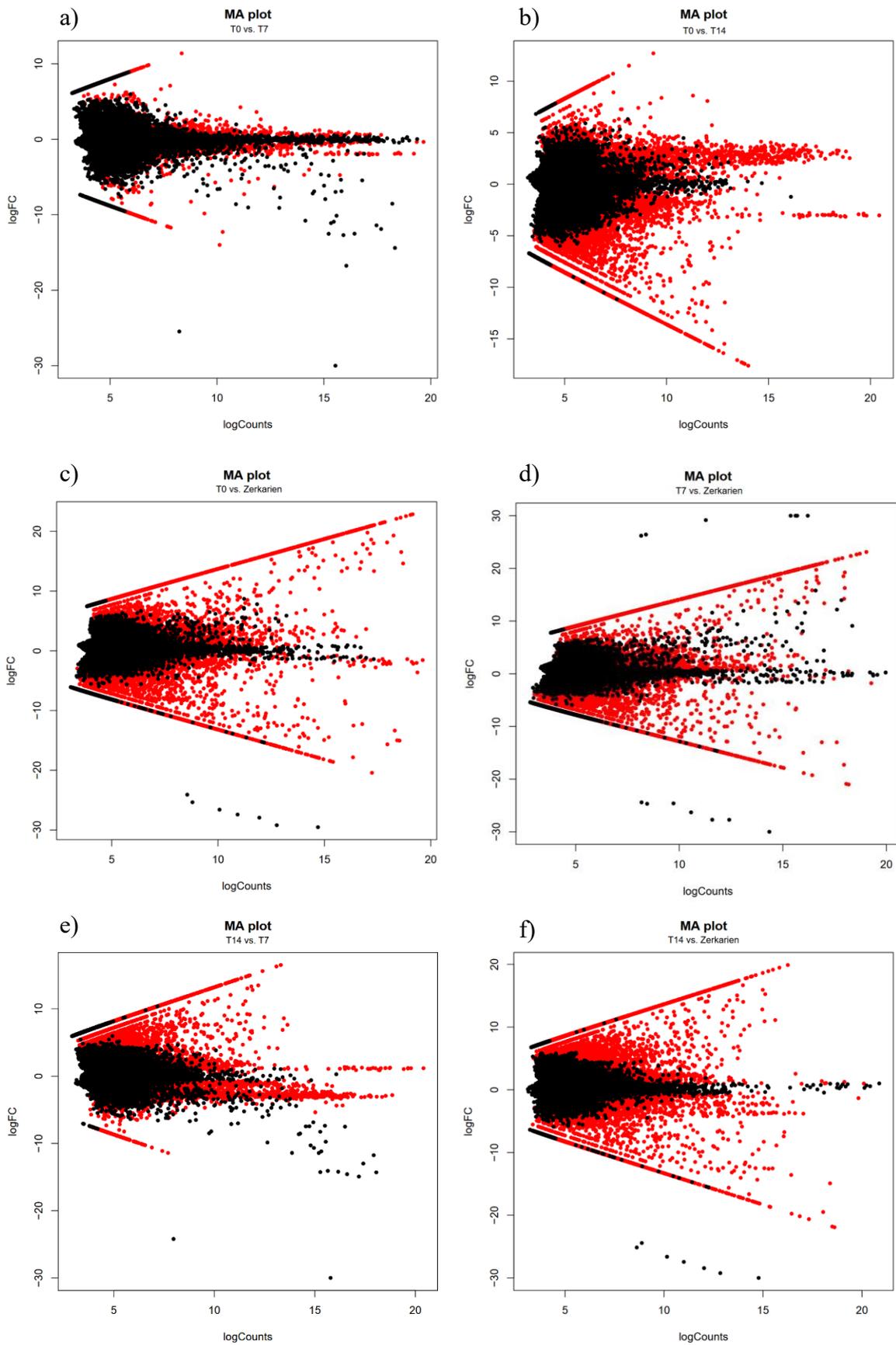


Abbildung 15: Fortsetzung auf nächster Seite

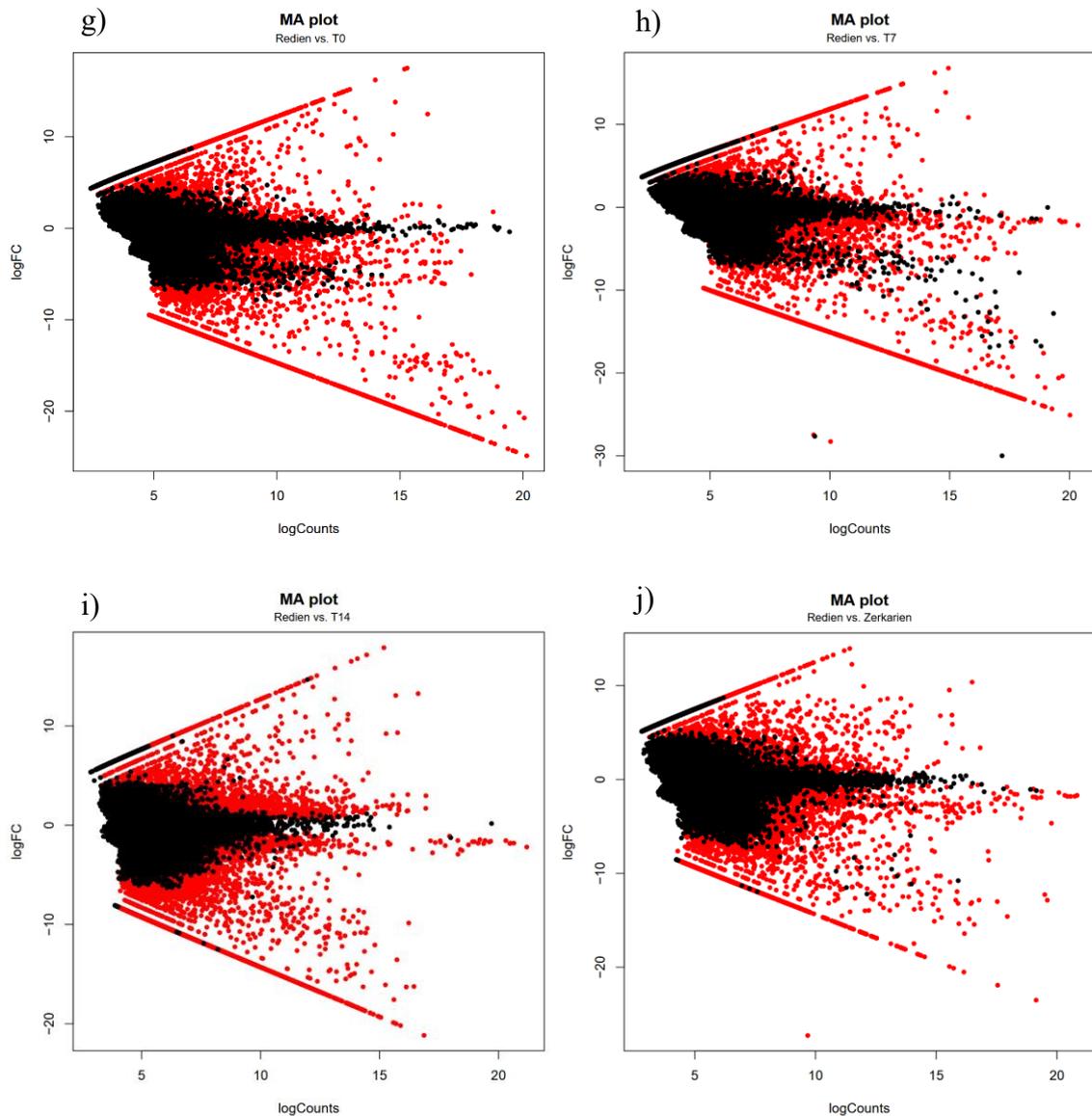


Abbildung 15: (fortgesetzt): MA-Plots zur vergleichenden Darstellung der differentiellen Genexpression, $FDR \leq 0,05$; a) T0 vs. T7, b) T0 vs. T14, c) T0 vs. Zerkarien, d) T7 vs. Zerkarien, e) T14 vs. T7, f) T14 vs. Zerkarien, g) Redien vs. T0, h) Redien vs. T7, i) Redien vs. T14, j) Redien vs. Zerkarien (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)

3.1.2. Vergleich der differentiellen Genexpression mittels Volcano-Plots

Die Erstellung von Vulkan-Diagrammen diente zur Veranschaulichung unterschiedlich exprimierter Gene zwischen zwei definierten Bedingungen, in diesem Fall zwischen zwei untersuchten Entwicklungsstadien (Abb. 16). Im Gegensatz zu MA-Plots, wurde hierbei die statistische Signifikanz stärker berücksichtigt. Es wurden insgesamt zehn Volcano-Plots erstellt. Die X-Achse

zeigt hierbei den logFC-Wert (log-fold-Change), die Y-Achse den $-1 \cdot \log_{10}(\text{FDR})$ -Wert (False Discovery Rate) an.

Jeder Punkt steht für ein Gen. Schwarze Punkte gelten als nicht statistisch signifikant und vernachlässigbar, rote Punkte hingegen sind statistisch relevant (bei einem FDR-Schwellenwert von $\leq 0,05$). Der logFC-Wert der X-Achse beschreibt das Ausmaß der Expressionsänderung zwischen zwei Bedingungen. Ein hoher positiver bzw. negativer Wert gibt die Hoch- bzw. Herunterregulation eines Gens an. Der negativ logarithmierte FDR-Wert der Y-Achse beschreibt die Signifikanz der Expressionsänderung. Umso höher der FDR-Wert, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die zu beobachtende Expressionsänderung des entsprechenden Gens zufällig beobachtet wurde. Das heißt, umso größer der FDR-Wert, desto statistisch signifikanter ist die differenzielle Genexpression an dieser Stelle. Grundsätzlich sind entsprechend diejenigen Punkte von besonderem Interesse, welche weiter vom $X = 0$ Wert abweichen und zeitgleich weit oben auf der Y-Achse stehen.

Die Darstellung im Volcano-Plot Format machte deutlich, dass ausnahmslos innerhalb jeder der untersuchten Entwicklungsstadien differenzielle Genexpression in statistisch relevantem Maße stattfand. Grundsätzlich galt: umso näher sich die Entwicklungsstadien zeitlich gesehen standen, desto weniger Gene betraf eine Expressionsänderung und/oder desto weniger signifikant fiel diese aus. Weiterhin war zu bemerken, dass insbesondere die Gruppen T0 und T7 vergleichsweise ähnliche Expressionsprofile aufwiesen und zwischen diesen beiden Stadien verhältnismäßig wenig Änderung stattfand (Abb. 16 a). Umso weiter voneinander entfernt die miteinander verglichenen Gruppen auf der Entwicklungslinie waren, desto signifikanter und umfangreicher zeigten sich auch deren Genexpressionsänderungen, so beispielsweise bei T14 vs. Zerkarien (Abb. 16 b).

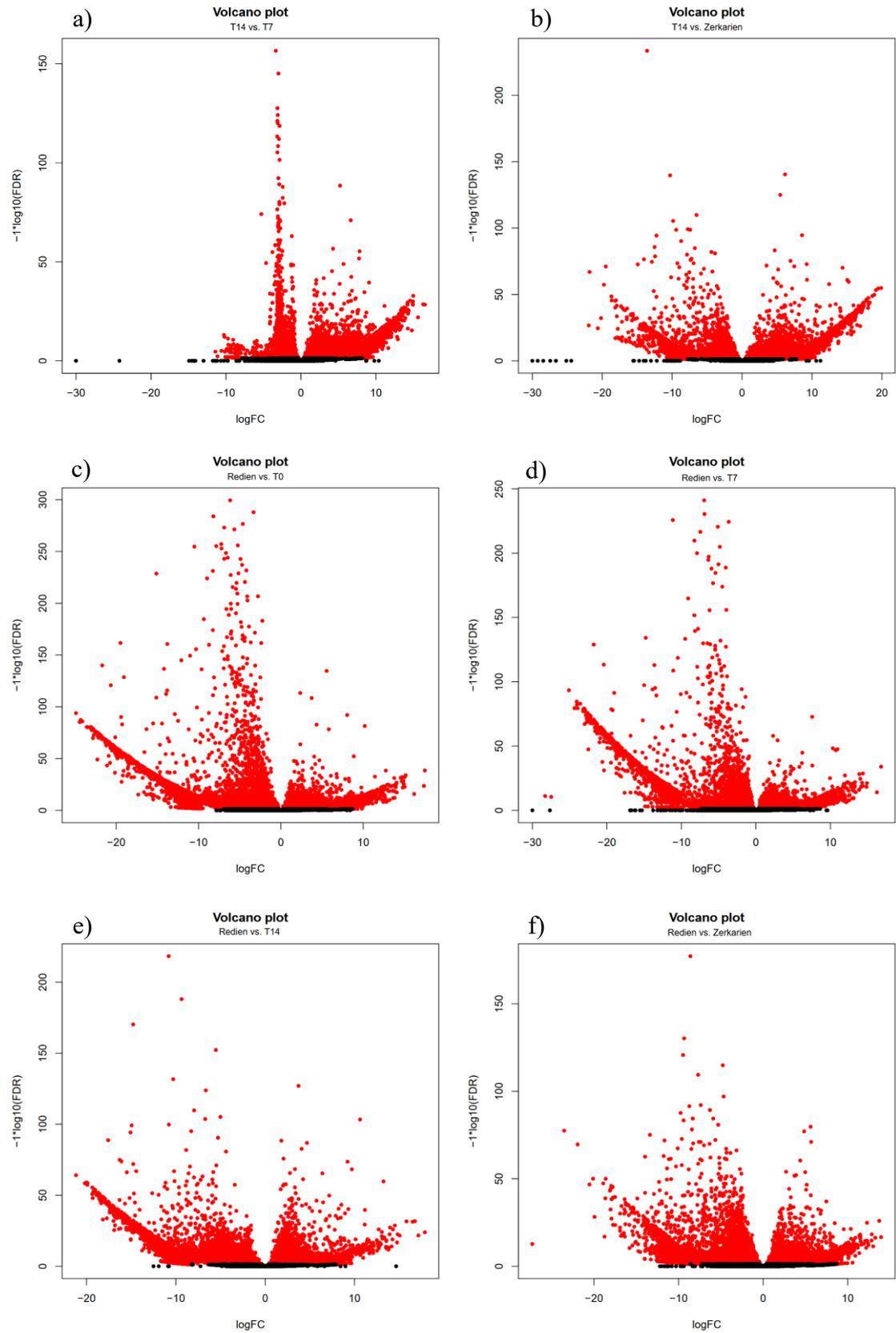


Abbildung 16: Fortsetzung auf nächster Seite

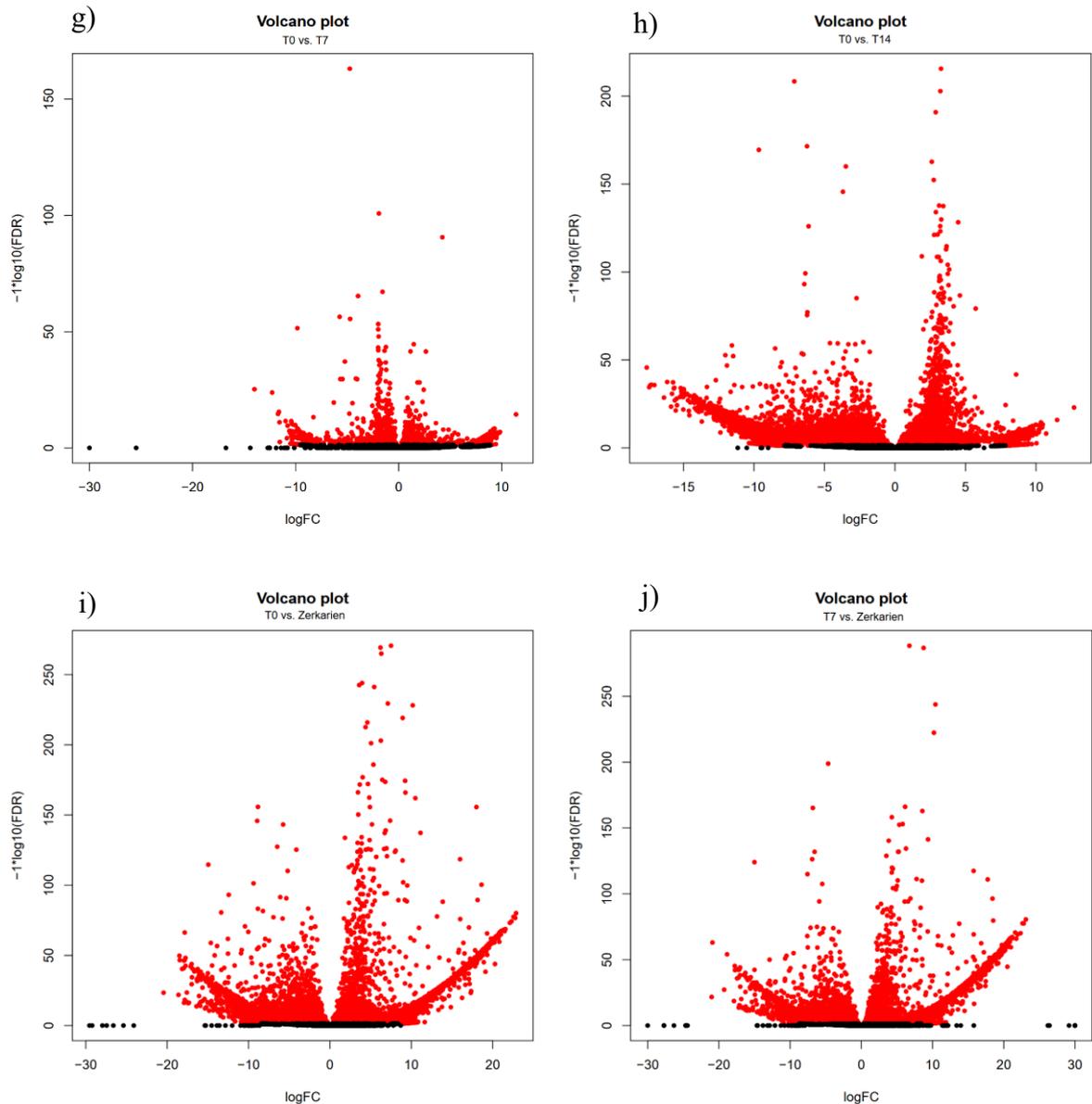


Abbildung 16: (fortgesetzt): Volcano-Plots zur Visualisierung der vergleichenden differentiellen Genexpression, $FDR \leq 0,05$; a) T14 vs. T7, b) T14 vs. Zerkarien, c) Redien vs. T0, d) Redien vs. T7, e) Redien vs. T14 und f) Redien vs. Zerkarien, g) T0 vs. T7, h) T0 vs. T14, i) T0 vs. Zerkarien und j) T7 vs. Zerkarien (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)

3.1.3. Darstellung der unterschiedlichen Transkriptlevel in IGV

Die Darstellung in IGV diente dem direkten visuellen Vergleich der untersuchten Proben hinsichtlich der Veränderungen auf Transkriptebene (mittels sogenannter Coverage Tracks). Durch das Alignment an die *C. daubneyi* Genomreferenz, ließ sich darüber hinaus die Genlokalisierung (in kb) genauer eingrenzen. Auf diese Weise konnten alle Scaffolds und jede Genlokalisierung separat betrachtet werden.

Umso höher die Expressionsaktivität in den verschiedenen Regionen, desto höher

der angezeigte, hier blau dargestellte, Signalausschlag. Regionen ohne Peak könnten potentiell Introns oder Deletionen, überwiegend aber nicht sequenzierte Bereiche darstellen. Die Abb. 17 bis 19 zeigen beispielhaft Screenshots der Coverage Tracks aus IGV des Scaffold 1. Vergleichbare Beobachtungen konnten ebenso bei allen anderen Scaffolds gemacht werden. Die obige Skala zeigt die Position in kb an. Jeder Track repräsentiert eine spezifische *C. daubneyi* Probe (je drei Replikate zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten).

Als erstes Beispiel dient der Screenshot in Abb. 17: Die Tracks der T0-Proben wiesen hier breite, konsistente Ausschläge auf. Dies sprach für eine hohe Genaktivität in der Region zwischen 8,700 kb und 8,710 kb bzw. bei 8,720 kb. Im Vergleich dazu, war die Aktivität, abgelesen an niedrigeren, weniger konsistenten Peaks, in den T7-Proben, noch deutlicher in den T14-Proben reduziert bzw. anders verteilt. Die Tracks der Redien und Zerkarien zeigten noch geringere und unregelmäßigere Ausschläge. Dies wies auf eindeutige Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien hin. Darüber hinaus zeigten die Replikate innerhalb derselben Bedingung sehr ähnliche Reaktionsmuster, was für eine sehr gute Reproduzierbarkeit der drei Replikate einer Untersuchungsgruppe sprach.

Ein weiteres Beispiel repräsentiert Abb. 18: Alle Replikate der T0- und T7-Proben zeigten in dieser Region konsistente, breite Peaks, was für eine hohes Transkriptlevel sprach. Innerhalb der Replikate waren die Peaks gleichmäßig verteilt und wiesen ähnliche Signalintensitäten auf, was erneut eine gute Reproduzierbarkeit in beiden Entwicklungsstadien bedeutete. Sowohl die T14-Proben, als auch die Zerkarien zeigten im Vergleich dazu eine deutlich geringere Aktivität in diesem Bereich. Die dargestellte Region spielte darüber hinaus bei Redien keine signifikante Rolle, da nur sehr geringe bis nahezu nicht vorhandene Signale erkannt werden konnten.

Des Weiteren existierte ebenso Regionen, in denen sich die Genaktivität über alle Entwicklungsstadien hinweg überwiegend ähnelte und konstante, sich kaum ändernde Signalausschläge identifiziert werden konnten (Abb. 19). In diesen Regionen waren zwar Transkripte aktiv, aber nicht maßgeblich differenziell exprimiert.

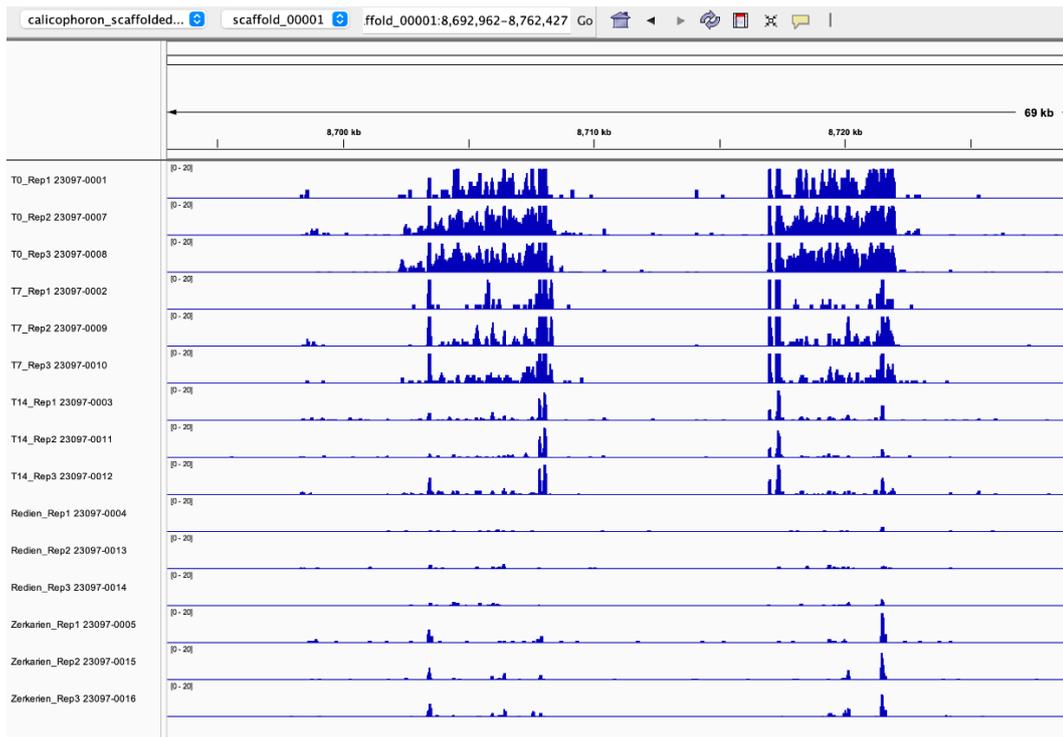


Abbildung 17: IGV-Screenshot der *C. daubneyi* Coverage-Tracks, Scaffold 1, in der Region um 8.700 kb bis 8.720 kb

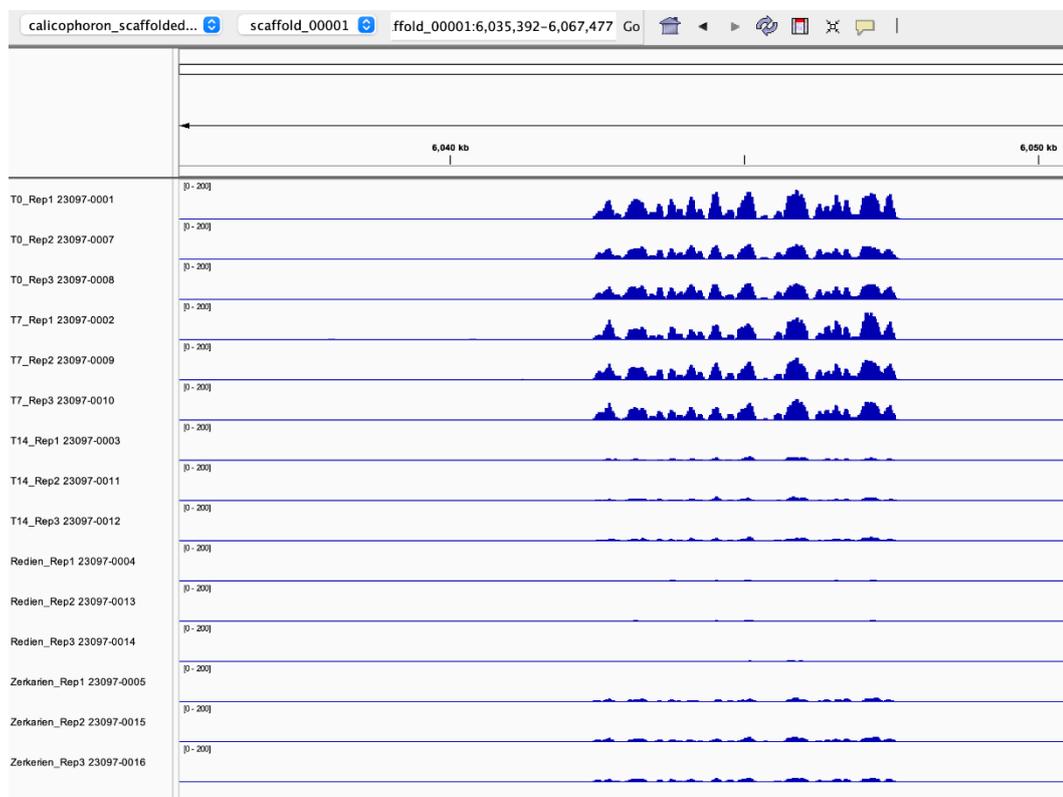


Abbildung 18: IGV-Screenshot der *C. daubneyi* Coverage-Tracks, Scaffold 1, in der Region um 6.040 kb bis 6.050 kb

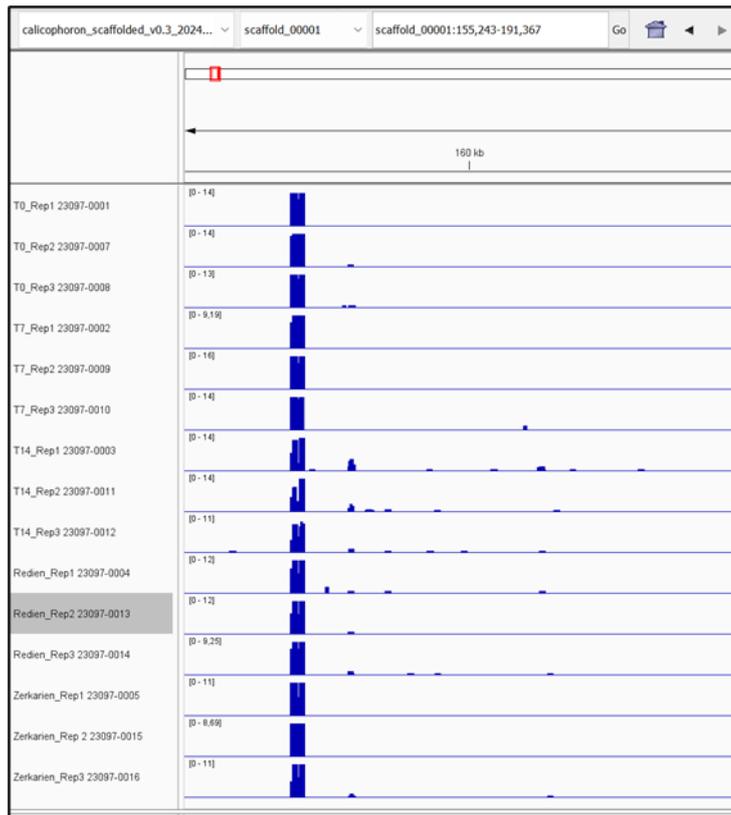


Abbildung 19: IGV-Screenshot der *C. daubneyi* Coverage-Tracks, Scaffold 1, in der Region um 160 kb

3.1.4. Heat-Maps

HeatMaps dienen grundsätzlich der Datenvisualisierung komplexer Beziehungen in einer leicht interpretierbaren, visuellen Form. Die angefertigten HeatMaps (Abb. 20 und 21) zeigen die Korrelation der untersuchten *C. daubneyi* Transkriptomreplikate basierend auf deren Expressionsdaten. Die Farbe Gelb beschreibt dabei eine hohe positive Korrelation (Werte nahe 1 bzw. 10), die Farbe Violett eine negative Korrelation bzw. geringe Ähnlichkeit (Werte nahe - 0,5 bzw. - 10). Zusätzlich wurde eine hierarchische Clusteranalyse miteinbezogen, welche durch die Dendrogramme außerhalb der Matrix erkennbar sind. Näherliegende Äste bedeuten eine höhere Ähnlichkeit der Proben zueinander.

Der Farbvergleich der Replikate untereinander in Abb. 20 zeigt, dass Proben des selben Entwicklungsstadiums (z. B. T0_Rep1, T0_Rep2, T0_Rep3) eine hohe Korrelation aufwiesen. Dies bestätigte die Beobachtungen aus der IGV-Analyse (Abschnitt IV.3.1.3) und sprach für eine hohe Konsistenz bzw. Reproduzierbarkeit innerhalb einer Replikatgruppe. Darüber hinaus waren deutliche Unterschiede

zwischen einigen Stadien abzulesen, so beispielsweise zwischen T0-, T7-, und T14-Eistadien verglichen mit Redien oder Zerkarien. Dies bestätigte, dass die Expression zwischen diesen Stadien extrem variierte.

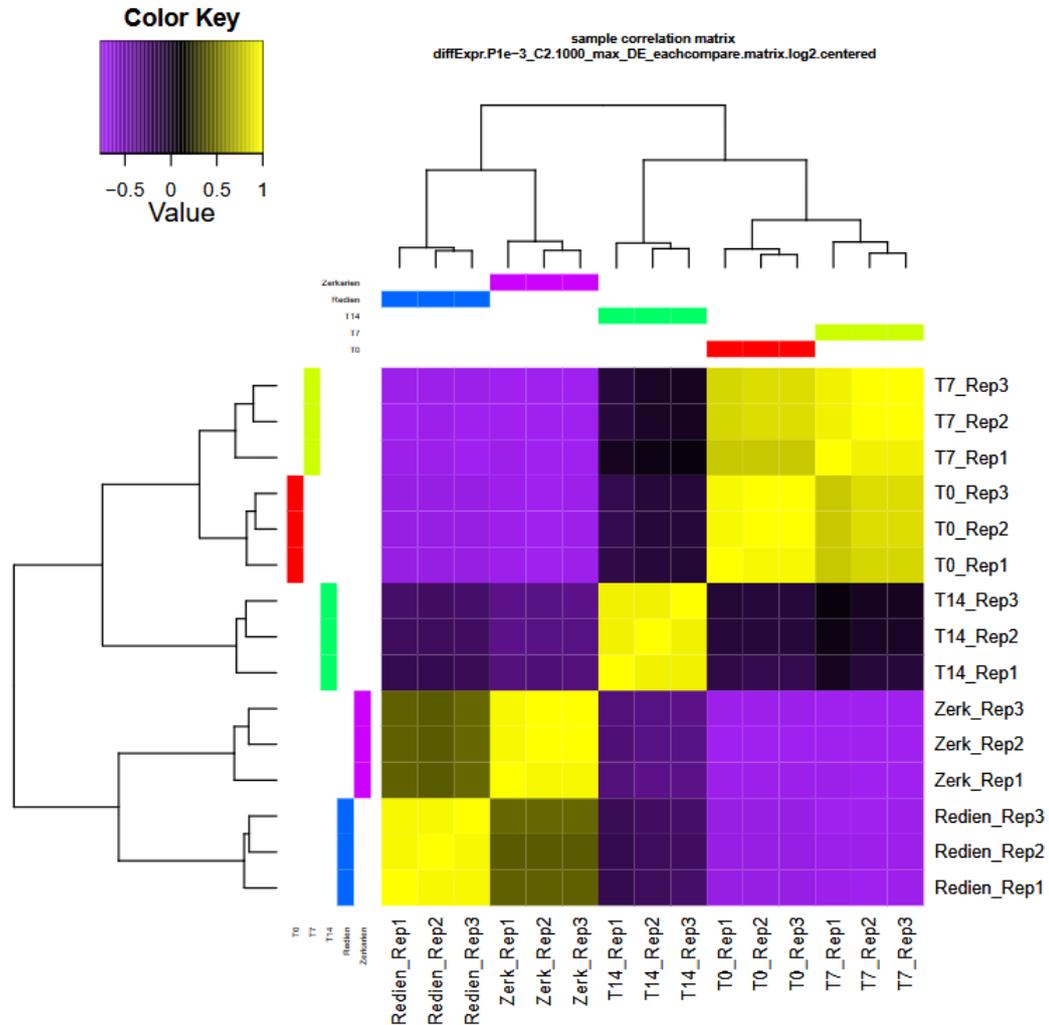


Abbildung 20: HeatMap zur Visualisierung der Korrelation der untersuchten *C. daubneyi* Replikate auf Basis der 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)

In der HeatMap aus Abb. 21 wurden die einzelnen Scaffolds und die dazugehörige Genexpression jeder Bedingung dargestellt. Berücksichtigt wurden erneut die 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression. Auch hier eindeutig zu erkennen, waren die Expressionsähnlichkeiten innerhalb eines Entwicklungsstadiums, während sich die Genaktivität zwischen verschiedenen Entwicklungsstufen mehr, weniger oder nicht voneinander unterschieden.

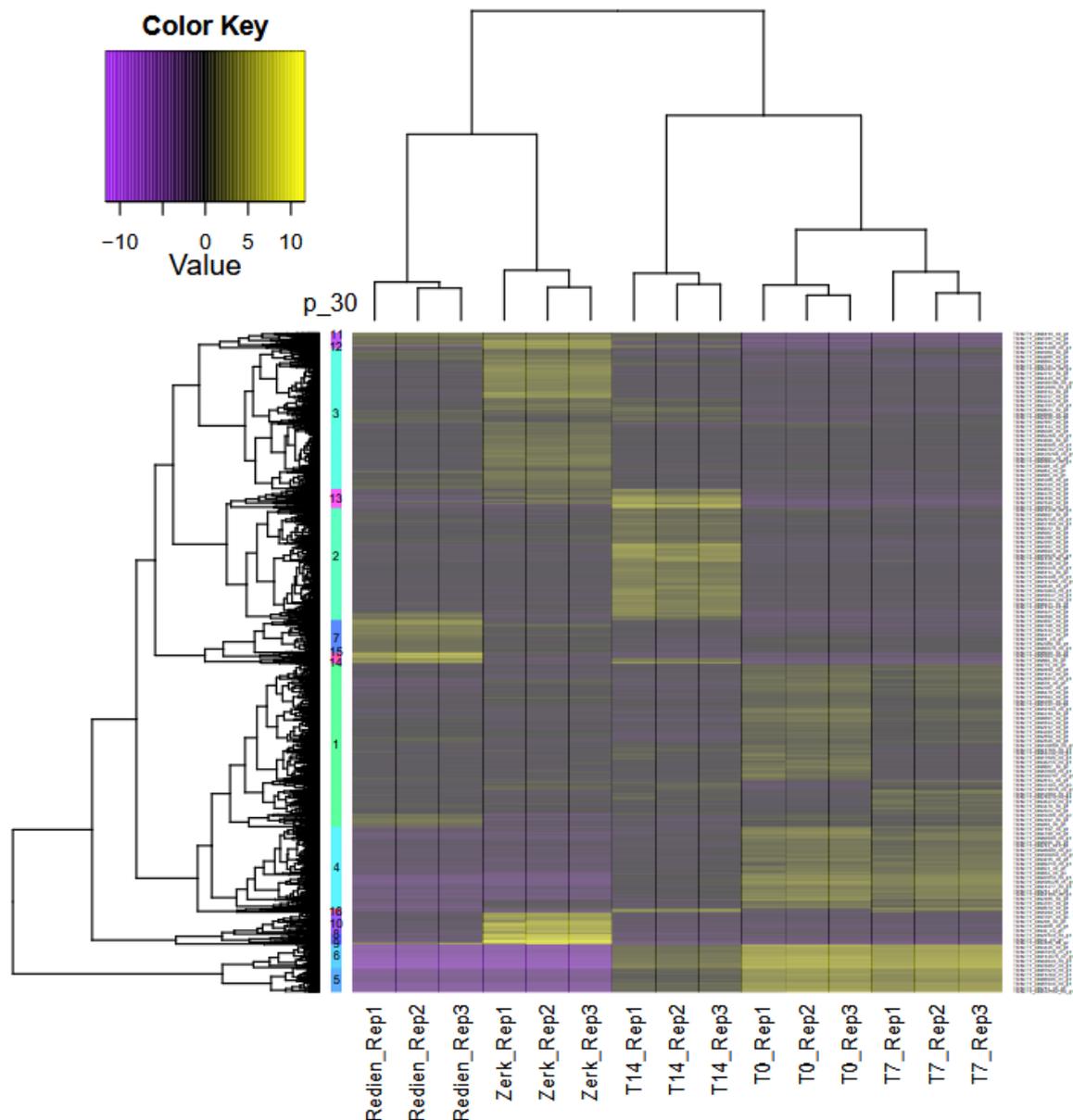


Abbildung 21: HeatMap zur Visualisierung der Korrelation der untersuchten *C. daubneyi* Transkripte auf Basis der 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)

3.1.5. Subcluster-Analyse

Basierend auf der Position, an welcher der Clusterbaum geteilt wird, werden mehr oder weniger Einzelcluster generiert. Die Skala reicht von 100 bis 0, wobei 100 bedeutet, dass an der Wurzel geschnitten wird (man erhält ein Cluster mit allen Transkripten). Die Zahl 0 bedeutet, dass am Ende geteilt wird (man erhält ein Cluster pro Transkript). Durch das Clustering der Transkripte der jeweils 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression in Punkt P_30, wurden insgesamt 16 verschieden große Subcluster generiert. Subcluster 1 - 3, 5 - 8, 10 und 15 zeigten

für nur jeweils eine der untersuchten Entwicklungsgruppen *C. daubneyi* speziell angereicherte Bereiche auf. Abb. 22 stellt jeweils grafisch die logarithmierten und zentralisierten Expressionsniveaus der betreffenden Gene dieser Subcluster dar. Im Anhang sind ergänzend die übrigen Grafiken der Subcluster 4, 9 und 11 - 14 und 16 zu finden.

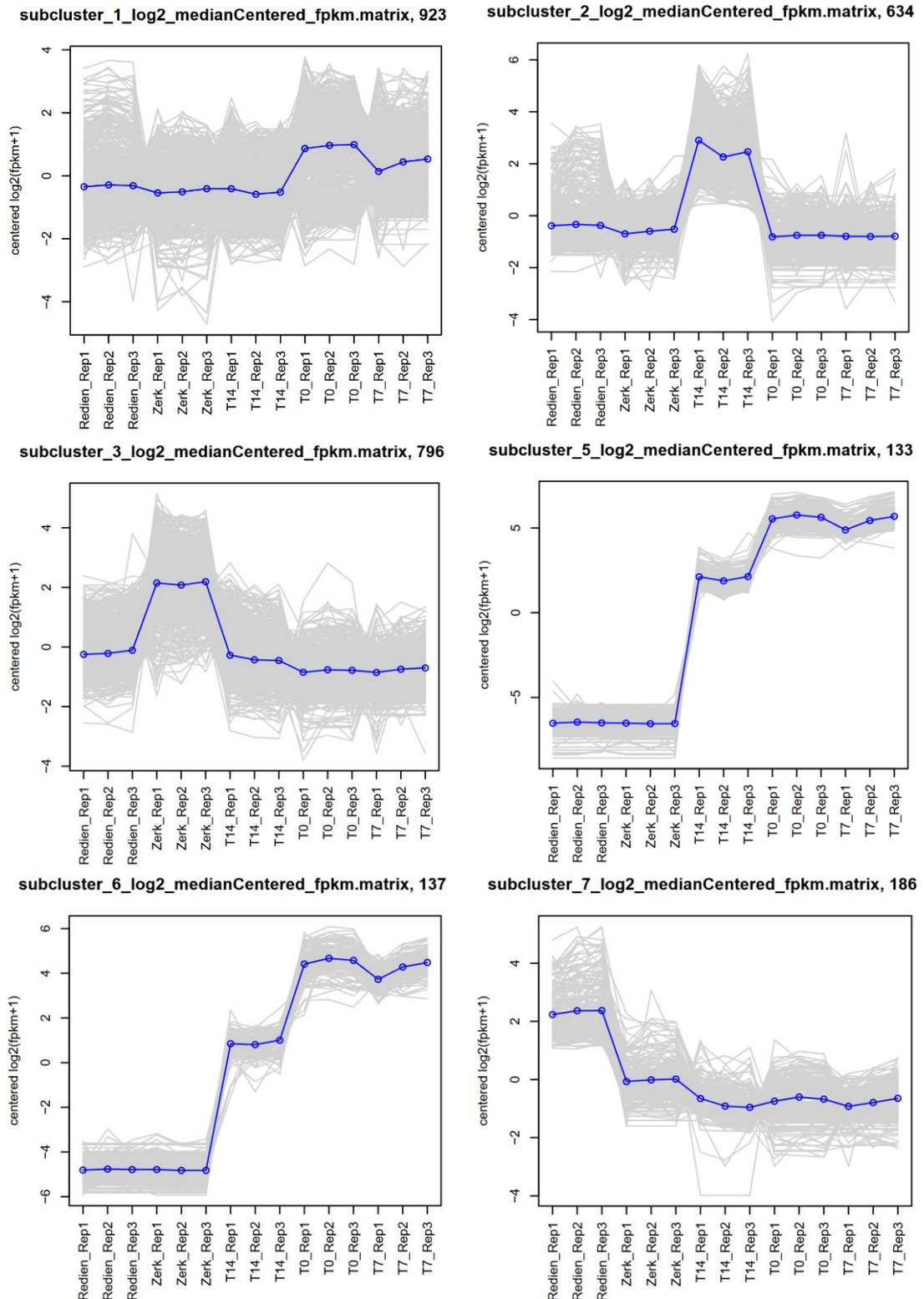


Abbildung 22: Fortsetzung auf nächster Seite

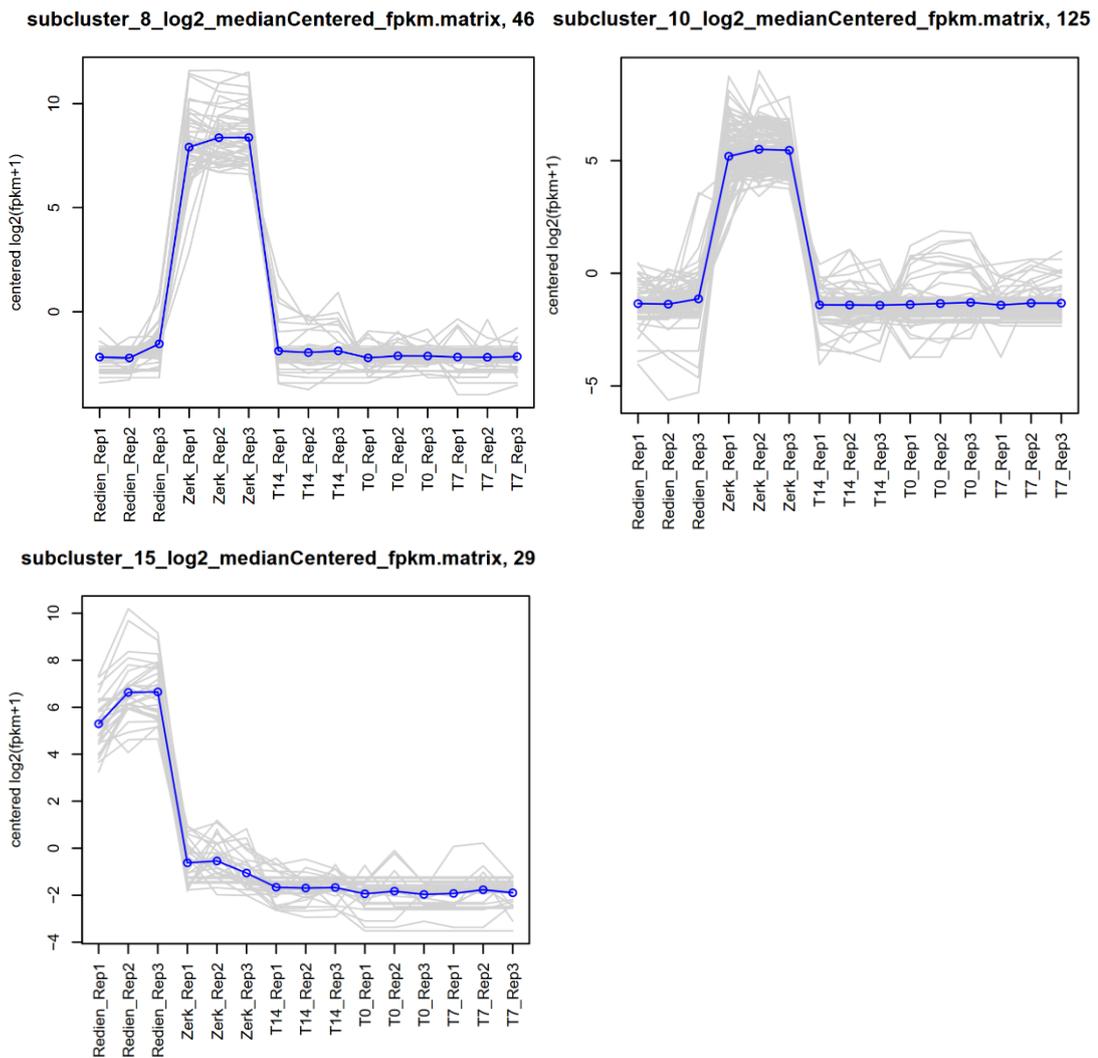


Abbildung 22 (fortgesetzt): Grafische Darstellung der Subcluster 1 - 3, 5 - 8, 10 und 15 (erstellt von Dr. Raúl Cosentino). X-Achse: logarithmierter, medianzentrierter FPKM-Wert, entspricht der Änderung der Genexpression. Y-Achse: Replikate der untersuchten Gruppen (Redien, Zerkarien, Eier Gruppe T14, T0, T7).

3.2. Funktionelle Annotation und GO-Enrichment Analyse

Eine funktionelle Annotation ermöglichte es, alle erhaltenen Transkriptome mit mehreren Datenbanken hinsichtlich Homologien zu untersuchen und auszuwerten. Die Tabelle wurde darüber hinaus nur hinsichtlich der GO-Term-Analyse ausgewertet.

GO-Terms beschreiben spezifische Eigenschaften oder Funktionen von Genen oder Proteinen innerhalb eines kontrollierten Verzeichnisses (Ashburner et al., 2000; The Gene Ontology Consortium et al., 2023). Jeder GO-Term besitzt eine eindeutige Kennung (in der Art GO:0000000). Die dabei beschriebenen

Eigenschaften werden in drei Hauptkategorien (Biologische Prozesse, Molekulare Funktionen, Zelluläre Komponenten) und weitere Unterkategorien hierarchisch geordnet und Beziehungen untereinander dargestellt. GO-Terms ermöglichen damit, Gen- und Proteinfunktionen, deren Lokalisation oder deren Aktivität übergreifend zu definieren und zu vergleichen.

Die Transkripte aller Subcluster aus Abschnitt IV.3.1.5 wurden hinsichtlich ihrer funktionellen Annotation weiter untersucht und eine GO-Enrichment-Analyse durchgeführt. Ziel der GO-Enrichment-Analyse war es herauszufinden, welche Prozesse, Funktionen oder Zellkomponenten in den untersuchten Entwicklungsstadien im Vergleich zum übrigen Transkriptom überrepräsentiert waren. Weiter ausgewertet wurden insbesondere diejenigen Gene, die vergleichsweise vermehrt exprimiert (angereichert, *enriched*) waren.

In den im digitalen Zusatzmaterial bereitgestellten Tabellen ersichtlich, sind neben den GO-Terms, deren Bedeutung, die dazugehörigen Gen-IDs und ebenso deren statistische Signifikanzen (siehe X.4, 3). Der überrepräsentierte p-Wert (over-represented p-value) gab in diesem Zusammenhang an, ob ein GO-Term häufiger vorkam, als das im direkten Vergleich zu den restlichen Daten zu erwarten gewesen wäre. Ein überrepräsentierter p-Wert $\leq 0,01$ zeigte demnach an, dass eine Wahrscheinlichkeit von kleiner 1 % bestand, dass die entsprechende GO-Term Anreicherung zufällig beobachtet wurde und somit eine mögliche biologische Relevanz besaß. Aufgrund der Tatsache, dass während der GO-Enrichment Analyse sehr viele GO-Terms gleichzeitig getestet wurden, erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse. Um dies zu bereinigen, wurde zusätzlich der überrepräsentierte FDR-Wert (over-represented False-Discovery-Rate) berücksichtigt und somit die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse minimiert und korrigiert. Ein FDR-Wert $\leq 0,01$ sagte demnach aus, dass die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses in diesem Fall bei weniger als 1 % lag und der entsprechende GO-Term tatsächlich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine biologische Relevanz besaß.

Vorrangig berücksichtigt wurden demnach diejenigen *enriched* GO-Terms der jeweiligen Subcluster, welche einen überrepräsentierten p-Wert $\leq 0,05$ und einen überrepräsentierten FDR-Wert $\leq 0,05$ aufwiesen. Diese GO-Terms hatten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sowohl statistische, als auch biologische Relevanz (Tab. 10).

Des Weiteren wurden ausgewählte GO-Terms berücksichtigt, deren überrepräsentierter p-Wert $\leq 0,05$ aufwies, der FDR-Wert aber bei $> 0,05$ lag. Dies war insbesondere bei Subclustern mit sehr wenigen Transkripten (also einer kleinen Testmenge) zu beobachten. Die Ergebnisse waren dennoch statistisch und wahrscheinlich biologisch relevant, die tatsächliche biologische Relevanz konnte durch den hohen FDR-Wert in diesen Fällen allerdings nicht sicher bestätigt werden.

Tabelle 10: Subcluster P_30: Übersicht Anzahl zugehöriger Transkripte und identifizierter *enriched/depleted* GO-Terms

Subcluster	Anzahl zugehöriger Transkripte	Anzahl identifizierter <i>enriched</i> GO-Terms	Anzahl identifizierter <i>depleted</i> GO-Terms
1	923	604	24
2	634	111	347
3	796	582	45
4	462	227	102
5	133	11	197
6	137	46	177
7	186	1351	1
8	46	35	30
9	12	0	5
10	125	88	74
11	73	80	19
12	17	57	0
13	107	52	66
14	33	2	18
15	29	59	14
16	22	88	7

Diejenigen Transkripte, die im Vergleich überdurchschnittlich herunterreguliert (*depleted*) wurden, sind dem digitalen Zusatzmaterial darüber hinaus ergänzend zu entnehmen (siehe X.4, 3 bzw. auch Tab. 10). Sie wurden zum jetzigen Zeitpunkt nicht näher analysiert. Die obigen Ausführungen gelten umgekehrt gleichermaßen für die unterrepräsentierten p-Werte (under-represented-p-value) und die unterrepräsentierten FDR-Werte (under-represented-FDR) der *depleted* GO-Terms.

Abb. 23 zeigt die Gesamtanzahl der vertretenen *enriched* GO-Terms pro Subcluster und deren Verteilung in Molecular Funktion (MF), Biological Process (BP) und Cellular Component (CC). In allen Fällen gehörte der größte Teil der Gruppe BP an.

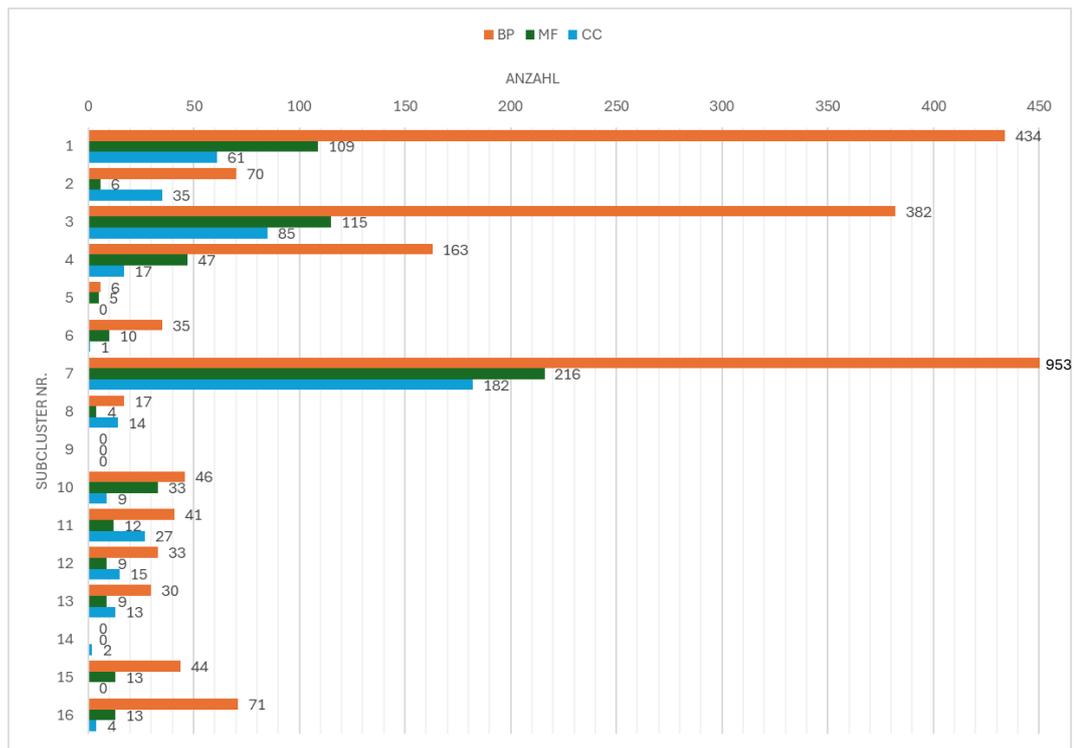


Abbildung 23: Anzahl und funktionelle Verteilung in Biological Process (BP), Molecular Function (MF) und Cellular Component (CC) der *enriched* GO-Terms aller 16 Subcluster (P_30)

3.2.1. GO-Enrichment: Gruppe Eier T0 und Eier T7

Subcluster 1 beinhaltete GO-Terms in signifikantem und biologisch relevantem Maße (p -Wert und FDR-Wert $< 0,05$), welche exklusiv bei den Gruppen Eier T0 und T7 angereichert waren. Es stellte dabei mit 923 berücksichtigten Transkripten das umfangreichste Cluster dar und beinhaltete 132 GO-Terms, die den obigen Kriterien entsprachen. Die Verteilung dieser wird in Abb. 24 dargestellt. Der Größte Anteil an GO-Terms stellte die Regulation biologischer, zellulärer und metabolischer Stoffwechselprozesse im allgemeinen Sinne dar (z. B. GO:0065007, GO:0009987, GO:0008152). Eine weiterer Anteil beschrieb Vorgänge, welche in Verbindung mit der Translation, Transkription und Proteinverarbeitung gebracht werden (z. B. GO:0006275, GO:0016070, GO:0036211). Darüber hinaus umfasste über ein Viertel an GO-Terms Prozesse rund um die Zellgenese- und Organisation (z. B. GO:0071103, GO:0006275, GO:0006259). Ein sehr kleiner Teil an GO-Terms stand des Weiteren in Zusammenhang mit der Bindung verschiedener Moleküle (z. B. Ionen, GO:0043167, oder Phospholipide, GO:0005543).

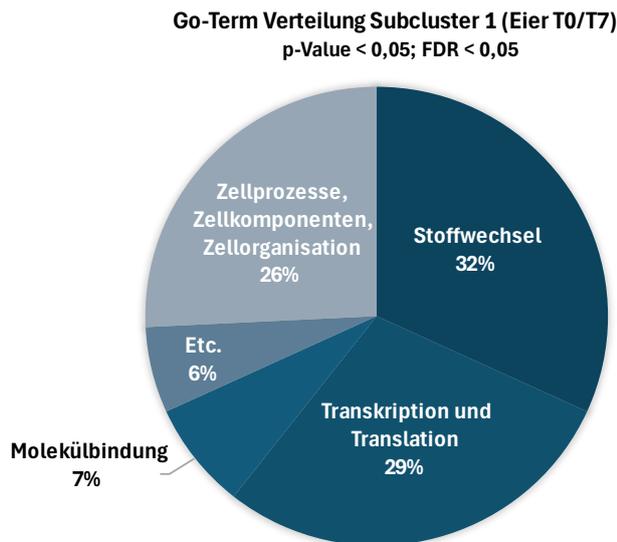


Abbildung 24: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 1 (Eier T0/T7), p-Wert < 0,05; FDR-Wert < 0,05

3.2.2. GO-Enrichment: Gruppe Eier T14

Subcluster 2 zeigte ausschließlich ein GO-Enrichment bei Replikaten der Gruppe Eier T14. Die zugehörigen GO-Terms beschrieben demnach mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Prozesse, welche zu dem untersuchten Zeitpunkt ausschließlich bei dieser Gruppe vermehrt exprimiert wurden. Insgesamt 31 GO-Terms besaßen p-Werte und FDR-Werte $\leq 0,05$. Alle weiteren 80 GO-Terms wiesen signifikante p-Werte < 0,038 in Kombination mit FDR-Werte > 0,05 auf. Abb. 25 umfasst die prozentuale Verteilung aller 111 GO-Terms des Subclusters 2. Fast die Hälfte davon stand in Zusammenhang mit beweglichen Zilien, axonemalen Mikrotubuli und Dynein-Armen, sowie deren Beweglichkeit und Organisation (z. B. GO:0005929, GO:0031514, GO:0003341, GO:0005879, GO:0035082, GO:0036158, GO:0070286). Über ein Viertel der GO-Terms beschrieben Inhalte zum Ribosom, dessen Untereinheiten und dem Prozess der Translation bzw. der Peptidbiosynthese (z. B. GO:0003735, GO:0044391, GO:0005840, GO:0006412, GO:0043043). Kleinere Gruppen konnten darüber hinaus entweder mit der Bewegung von Spermien (z. B. GO:0007288, GO:0120316) oder der Antwort auf Licht bzw. UV-Stimuli (GO:0071482, GO:0034644) in Verbindung gebracht werden.

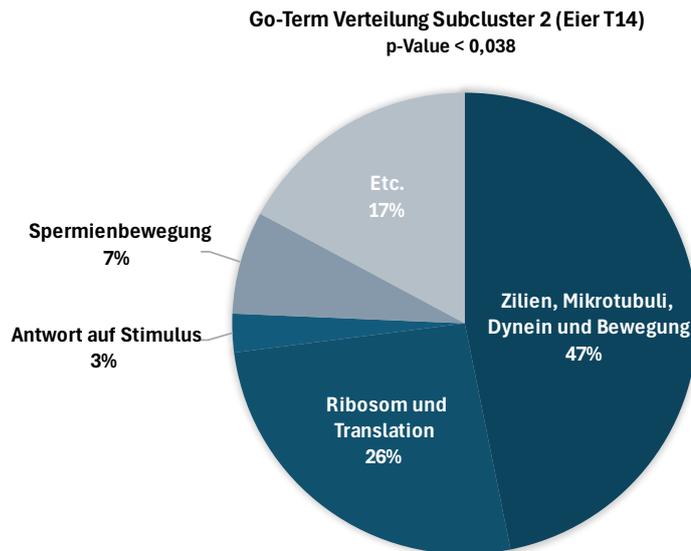


Abbildung 25: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 2 (Eier T14), p-Wert < 0,038; FDR-Wert < 0,99

3.2.3. GO-Enrichment: Eier gesamt

Subcluster 5 und 6 beinhalteten beide *enriched* GO-Terms, welche ausschließlich, aber übergreifend für alle Eistadien überrepräsentiert waren. Keine der GO-Terms erreichten FDR-Werte < 0,05, aber alle p-Values entsprachen signifikanten Werten < 0,05. Abb. 26 stellt eine Übersicht der GO-Term-Verteilung beider Subcluster dar. Die 11 GO-Terms aus Subcluster 5 beschrieben dabei überwiegend Vorgänge in Zusammenhang mit der Eisenbindung, der Eisenhomöostase und dem Eisentransport, sowie der Aktivität des Enzyms Ferroxidase (z. B. GO:0008199, GO:0005506, GO:0006879, GO:0046916, GO:0055072, GO:0055076, GO:0004322). Die 46 GO-Terms aus Subcluster 6 beschäftigten sich überwiegend mit der Regulation von Aktinfilamenten (z. B. GO:0030834, GO:0051693, GO:0030832), der Regulierung und Organisation der Zelle (z. B. GO:0008361, GO:0032535, GO:0032956) oder der Regulation der Proteinverarbeitung (z. B. GO:0032272, GO:0043254).

Go-Term Verteilung Subcluster 5 & 6 (Eier gesamt)
p-Value < 0,05

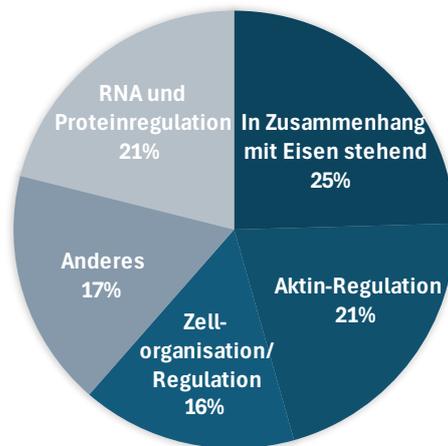


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung aller GO-Terms aus Subcluster 5 und 6 (Eier gesamt), p-Wert < 0,05; FDR-Wert < 0,99

3.2.4. GO-Enrichment: Redien

Die zu Subcluster 7 gehörenden GO-Terms waren zum untersuchten Zeitpunkt ausschließlich in Redien angereichert. Insgesamt 413 GO-Terms besaßen p-Werte und FDR-Werte < 0,05, deren prozentuale Verteilung in Abb. 27 dargestellt wird. Der größte Anteil der GO-Terms stand in Zusammenhang mit dem Zellmetabolismus, der Zellorganisation und der Zellentwicklung. Darunter befanden sich ebenso Begriffe zu sämtlichen allgemeinen zelluläre Komponenten, wie z. B. die Membran, den Zellkern, das Zytoplasma oder das Zytosol (z. B. GO:0016020, GO:0005634, GO:0005737, GO:0005829). Ein Viertel an GO-Terms beschrieb zusammengefasst Prozesse rund um die Transkription, Translation und die Proteinbiosynthese. Sowohl DNA-bezogene Prozesse, wie die Chromatin-Organisation (z. B. GO:0003700, GO:1990837, GO:0006338, GO:0000785), die RNA und deren Bearbeitung, wie beispielsweise das Splicing (z. B. GO:0003729, GO:0036002, GO:0051252, GO:0000375) und der Proteinmetabolismus (z. B. GO:0006486, GO:1900101, GO:1900182) wurden dabei berücksichtigt. Des Weiteren waren GO-Terms sämtlicher metabolischer Prozesse vertreten, insbesondere solche, die dem Nucleosidmetabolismus angehören (z. B. GO:0006244, GO:0009129, GO:0009119, GO:0043174). Zusätzlich gab es zwei kleinere Gruppen an GO-Terms, welche zum einen mit der Reaktion auf externe Stimuli und Stress assoziiert werden (z. B. GO:0050896, GO:0042221,

GO:0051716, GO:0010033), zum anderen die Bindung verschiedener Moleküle beschreiben (z. B. GO:0043167, GO:0036094, GO:0070279).

Die restlichen, in Subcluster 7, angereicherten GO-Terms erreichten signifikante p-Werte $< 0,05$ mit FDR-Werten $> 0,05$. Dies galt genauso für alle GO-Terms des Subcluster 15, deren zugehörigen Transkripte ebenso ausschließlich bei Redien hochreguliert waren. Einige GO-Terms des Subclusters 7 und insbesondere die GO-Terms des Subclusters 15 beschäftigten sich mit biologischen Prozessen und molekularen Funktionen der Detektion externer biotischer Stimuli, der Antwort auf diese und der Auf- und Abregulation sämtlicher Abwehr- und Immunmechanismen. Angefangen mit GO-Terms, die mit der Detektion von externen Stimuli (GO:0009595, GO:0051606) wie Bakterien (GO:0016045), anderen Organismen (GO:0098543) oder biotischen Impulsen assoziiert (GO:0098581) waren, über die Regulation der Reaktion auf diese Stimuli (GO:1900426, GO:1900425), bis hin zur Immunantwort selbst (GO:0002702, GO:0038187). Die GO-Terms umfassten hierbei nicht nur die Immunregulation an sich (GO:0002921), sondern beschrieben auch damit assoziierte Prozesse wie die Bindung und den Abbau von Peptidoglykanen (z. B. GO:0009253, GO:0042834, GO:0061783, GO:0032494) oder Glykosaminoglykanen (GO:0006027, GO:0030203), sowie die Biosynthese antimikrobieller Peptide (z. B. GO:0002786, GO:0002805, GO:0002813).

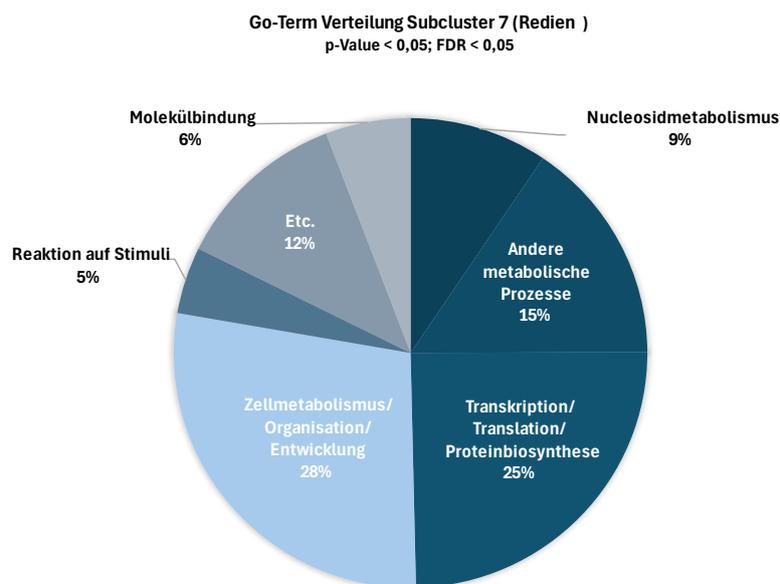


Abbildung 27: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 7 (Redien), p-Wert $< 0,05$; FDR-Wert $< 0,05$

3.2.5. GO-Enrichment: Zerkarien

Die ermittelten 582 *enriched* GO-Terms aus Subcluster 3 waren ausschließlich bei Zerkarien hochreguliert, wobei ein kleiner Teil von 26 Terms p-Werte und FDR-Werte $< 0,05$ aufwies und von besonderer Signifikanz war. Die prozentuale Verteilung dieser Terms ist in Abb. 28 dargestellt. Der größte Anteil sprach für eine vermehrte Beteiligung des Tricarbonsäurezyklus (GO:0006099), des Citratmetabolismus (GO:0006101), der Atmungskette (GO:0098803) und mitochondrialer Komplexe (GO:0098798, GO:0098800) bei Zerkarien. Auch die vergleichsweise vermehrte Aktivität in der Bindung von Metallionen, Kationen, Kalzium (z. B. GO:0046872, GO:0005509, GO:0043169), sowie deren aktiven Transport (GO:0022853), wurde durch über ein Viertel der GO-Terms angezeigt. Darüber hinaus wurden einzelne Zellkomponenten bzw. Vorgänge der Zelldifferenzierung beschrieben (z. B. GO:0007266, GO:0000139).

Alle weiteren überrepräsentierten GO-Terms des Subclusters 3, sowie alle GO-Terms der Subcluster 8 und 10, waren ebenfalls ausschließlich bei Zerkarien hochreguliert und wiesen signifikante p-Werte $< 0,05$ mit FDR-Werten $> 0,05$ auf. Hierbei befanden sich in Subcluster 8 u. a. GO-Terms für das Vorhandensein kontraktile Vakuolen (GO:0000331) oder die positive Regulation der Chemotaxis (GO:0050926, GO:0050927). Weitere GO-Terms umfassten z. B. die Myosinbindung (GO:0017024) und die Troponinbindung (GO:0031013). Subcluster 10 hingegen beinhaltete beispielsweise etliche GO-Terms, welche zur Beschreibung katabolischer Prozesse verschiedener Zucker genutzt werden (z. B. GO:0000025, GO:0005983, GO:0009313, GO:0046352, GO:1901027).

Go-Term Verteilung Subcluster 3 (Zerkarien)
p-Value $< 0,05$; FDR $< 0,05$

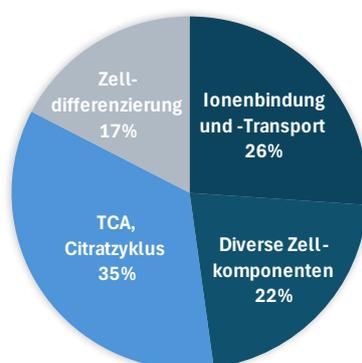


Abbildung 28: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 3 (Zerkarien), p-Wert $< 0,05$; FDR-Wert $< 0,05$

V. DISKUSSION

1. Einleitung

Die Paramphistomidose gewinnt zunehmend an Bedeutung und rückt immer mehr in den Fokus von Landwirt:innen, Tierärzt:innen und Forschenden, da seit einigen Jahren bei Wiederkäuern in Europa steigende Prävalenzen und teilweise schwere bis tödliche Krankheitsverläufe beobachtet werden (Huson et al., 2017; Mage et al., 2002; O'Shaughnessy et al., 2018). Verschiedene Nachweismethoden bestätigten wiederholend, dass hierbei aktuell insbesondere die Pansenegelspezies *C. daubneyi* in Europa und ebenso in Deutschland dominiert (Alstedt et al., 2022; Červená et al., 2022; Hecker et al., 2024).

Die Spezies der Klasse *Digenea* sind durch einen obligatorischen Wirtswechsel gekennzeichnet. So durchschreitet auch die ihr zugehörige Trematode *C. daubneyi* einen komplexen Lebenszyklus mit Phasen in der Umwelt, im mollusken Zwischenwirt und dem Säugetierendwirt. Dies erfordert ein ausgefeiltes Anpassungsvermögen an verschiedenste Lebensumstände: Der Parasit muss beispielsweise die feuchte, sauerstoffreiche Umgebung im Schneckenhabitat, genauso wie das anaerobe, leicht saure Milieu des Pansens oder die Abwehrmechanismen seiner Wirte überstehen, um seinen Zyklus erfolgreich vervollständigen und sich zunehmend ausbreiten zu können. Um derart facettenreiche Vorgänge auf molekularbiologischer Ebene verstehen zu können und um zukünftig neue Strategien zu entwickeln, die das sich ausbreitende Infektionsgeschehen eindämmen, sind „Omic“-Studien ein nützliches Werkzeug.

Die Trematodenforschung profitierte bereits, ebenso wie andere Disziplinen, in den letzten Jahren zunehmend von „Omic“-Analysen (Doyle, 2022). Verglichen zu anderen Parasitenarten, wie beispielsweise *F. hepatica*, wurde *C. daubneyi* in diesem Punkt bisher jedoch deutlich unterrepräsentiert, weswegen zum jetzigen Zeitpunkt noch äußerst wenige Datensätze vorhanden sind (Huson et al., 2017). Erst seit Kurzem existiert ein erster veröffentlichter Genomentwurf *C. daubneyis*, welcher beweist, dass genomische Daten von großer Bedeutung sind, wenn es darum geht, die Anpassungsstrategien von Parasiten zu erforschen (Clancy et al., 2025). Insbesondere grundlegende transkriptomische Studien zu Parasitenstadien *C. daubneyis* in der Umwelt und im Zwischenwirt wurden bisher dennoch gänzlich

vernachlässigt. In Anbetracht der noch vielen unklaren Parametern bezüglich Epidemiologie, molekularer Biologie und Verhalten des Parasiten im Zwischenwirt und der Umwelt, gilt es, die vorhandenen Wissenslücken aufzufüllen und den Parasiten dadurch besser zu studieren. Dies erscheint umso dringlicher vor dem Hintergrund, dass mit Oxyclozanid aktuell nur ein Wirkstoff zur Behandlung der Paramphistomidose zur Verfügung steht. Langfristig könnten mit zusätzlichen „Omic“-Daten und folglich mehr Wissen Bekämpfungsstrategien entwickelt werden, welche es ermöglichen, schon auf Umwelt- oder Zwischenwirtsebene anzusetzen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf einer vergleichenden Transkriptomstudie ausgewählter Umwelt- und Zwischenwirtsstadien *C. daubneyi*. Die Durchführung einer differenziellen Genexpressionsanalyse und der funktionellen Annotation ausgewählter Transkripte, ließ wichtige Einschätzungen über das parasitäre Verhalten in der Umwelt und im Zwischenwirt zu. In dieser Arbeit wurde zusätzlich erstmals ein grundlegender Genomentwurf eines aus Deutschland gewonnenen, adulten *C. daubneyi* Isolates erstellt, auf welchem in Folgeprojekten aufgebaut werden kann und welcher einen ersten Vergleich mit dem kürzlich erschienenen Genomentwurf aus Nordirland zuließ.

Durch diese Arbeit ist es gelungen, wichtige weitere „Omic“-Daten *C. daubneyi* bereitzustellen, die dabei helfen, das Verständnis über Verhalten und Überlebensstrategien des Parasiten zu verbessern. Die Erkenntnisse dieser Arbeit lieferten wichtige Bausteine, auf welchen zukünftig aufgebaut werden können und die langfristig dazu beizutragen werden, die Ausbreitung *C. daubneyi* einzudämmen.

2. Einordnung des deutschen Genomentwurfes *C. daubneyi* in die vorhandene Literatur

Die genomische Untersuchung, insbesondere noch wenig erforschter Parasiten, ermöglicht es, ein tieferes Verständnis ihrer molekularen Biologie, genetischen Diversität, Epidemiologie und Strategien, welche für die Verbreitung und ihr Überleben von Bedeutung sind, zu erlangen. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Ausbreitung *C. daubneyi* im Kontext des Klimawandels, welcher neue Lebensräume eröffnet und die Dynamik zwischen Parasit und Wirt in den Regionen verändert, liefern genomische Analysen wichtige Erkenntnisse (Doyle, 2022; Skuce et al., 2013). Die Identifikation zentraler Gene, die für die Lebensweise und Anpassungsfähigkeit des Parasiten verantwortlich sind, bieten langfristig Angriffspunkte für eine gezielte Bekämpfung und Eindämmung der Ausbreitung (Doyle, 2022).

Zu Beginn dieses Transkriptomprojektes existierte noch kein Genomentwurf innerhalb der Familie der *Paramphistomidae*. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Erstsequenzierung eines deutschen Isolates angestrebt, insbesondere vor dem Hintergrund, die im Fokus stehende Transkriptomanalysen damit zu unterstützen. Während der Projektlaufzeit wurde allerdings ein erster Genomentwurf eines nordirischen *C. daubneyi* Isolates veröffentlicht, weswegen die Genomauswertung dieses Projektes letztlich nicht tiefergehend verfolgt wurde. Bereits wenige Monate zuvor lagen die dem nordirischen Genom zugehörigen Sequenzierungsdaten über das European Nucleotide Archive der Öffentlichkeit vor, welche bei der Datenauswertung dieses Projektes unterstützend zur Hilfe standen. Die Sequenzierung des deutschen Isolates ist deshalb dennoch von Bedeutung, da ein erster Vergleich mit dem nordirischen Isolat möglich war und auf dieser Datengrundlage in Folgeprojekten aufgebaut werden kann.

Das nordirische *C. daubneyi* Genom enthüllte wichtige Erkenntnisse über die Adaptation des Parasiten an seinen Endwirt und unterstreicht die Wichtigkeit, den Parasiten und generell *Paramphistomidae* auch auf Genomebene zu untersuchen (Clancy et al., 2025). Mit einer gemessenen Genomvollständigkeit von insgesamt 78,1 %, stellt das nordirische Genom den bisher vollständigsten Genomentwurf innerhalb verwandter Spezies dar (Clancy et al., 2025). Die Assemblierungsgröße überschritt mit 1,761 Gb die des deutschen Erstentwurfes um ein Vielfaches,

welcher lediglich 417,81 Mb umfasste und auch das von *F. hepatica*, das mit 1,275 Gb bisher das größte Trematodengenom darstellte (Clancy et al., 2025; Cwiklinski et al., 2015). Das Genom *F. gigantica* überschritt mit 1,04 Gb ebenfalls knapp die 1 Gb Grenze (Pandey et al., 2020) und war dennoch kleiner als das *C. daubneyi* aus Nordirland.

Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion war in diesem und dem nordirischen Projekt dasselbe - es wurden aus dem Pansen abgesammelte, in PBS-gewaschene und gefrorene adulte Panseneigel verwendet. Während in dieser Arbeit für die DNA-Sequenzierung eine PrometION 24 Plattform von ONT zur Verfügung stand, bediente sich die nordirische Forschungsgruppe der PacBio Sequel 2e Plattform (Clancy et al., 2025). Das verwendete PacBio Verfahren generiert sogenannte high-fidelity reads (Hifi), welche eine Lesegenauigkeit von über 99 % besitzen, während die Reads, die mit einer ONT Plattform generiert werden, zur Zeit noch leicht höhere Fehlerraten aufweisen (Mahmoud et al., 2024). Hu et. al (2024) fassen zusammen, dass die Hifi Reads von PacBio eine bessere Leistung bei der Erstellung von neuen Assemblierungen abliefern, während ONT Sequenzierungen besser dafür genutzt werden können, letzte Assemblierungslücken zu schließen. In dieser Arbeit wurde die NextDenovo Pipeline für die Fehlerkorrektur der langen ONT generierten Sequenzierreads umgesetzt (Bentley et al., 2008).

Die Prüfung auf mögliche Kontamination des deutschen Entwurfes mit Fremdgenomen ergab keine Treffer. Die DNA-Extraktion und auch die daraus resultierenden Daten repräsentieren somit nachweislich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit allein Gene, welche tatsächlich *C. daubneyi* angehören.

Der GC-Prozentsatz lag beim deutschen Genomentwurf bei 42,75 % und stimmte damit den Untersuchungen der Nordiren, welche einen GC-Wert von 43,14 % ermittelten, fast überein (Clancy et al., 2025). Die GC-Gehalte nahe verwandter parasitischer Egel lagen bei 43,76 % (*F. gigantica*, (Pandey et al., 2020)), 44 % (*F. hepatica* (McNulty et al., 2017)), 43,7 % (*O. viverrini* (Young et al., 2014)) und 43 % (*C. sinensis* (Huang et al., 2013)) und kamen damit dem Wert von *C. daubneyi* ebenfalls sehr nahe. Es ist bekannt, dass der GC-Wert zwischen den Arten verschiedener Taxa zum Teil stark variiert, es innerhalb einer Art oder Gattung meist aber nur minimale Abweichungen gibt (Mooers und Holmes, 2000).

Der direkte visuelle Vergleich mittels der angefertigten Dotplot-Darstellung machte deutlich, dass etliche Homologien zwischen deutschem und nordirischem Genom vorliegen. Clancy et. al (2025) registrierten in ihrem Genomentwurf insgesamt 36,3 % an repetitivem Sequenzinhalt. Auch durch den Dotplot-Vergleich gab es wiederholt Hinweise auf vorhandene Sequenzrepetitionen im deutschen Genomentwurf, die aber bisher nicht näher definiert wurden.

Rechnete man vorhandene Sequenzlücken heraus, so ergab sich eine Ähnlichkeit des deutschen Entwurfes mit dem der Nordiren von 78 %. Das Vorhandensein zu kleiner DNA-Fragmente nach der Isolierung oder Sequenzierungsfehler im deutschen Entwurf, können trotz striktem Befolgen der Protokolle, der Assemblierungspipeline und der Ausrichtung am nordirischen Genom nicht gänzlich ausgeschlossen werden und bedürfen einer Nachsequenzierung. Zudem fehlen dem Nordirischen Genom selbst noch geschätzte 21,9 % zur Vollständigkeit (Clancy et al., 2025). Es besteht die Möglichkeit, dass in dieser Arbeit Sequenzen abgedeckt wurden, die vorhandene Lücken des nordirischen Entwurfes schließen würden und demnach eine geringere Ähnlichkeit bedingen. Darüber hinaus ist bereits von *C. daubneyi* bekannt, dass verschiedene Parasitenpopulationen aus unterschiedlichen Regionen hohe Level an genetischer Diversität aufweisen (Sargison et al., 2019). Es liegt die Vermutung nahe, dass *C. daubneyi* Isolate aus noch weiter entfernten geographischen Gebieten, die mit anderen Umwelt- und Zwischenwirtsbedingungen einhergehen, noch größere genetische Unterschiede aufweisen könnten. Dies hätte nicht nur Auswirkungen auf die Anpassungsfähigkeit von Umwelt- und Zwischenwirtsstadien des Parasiten an sich ändernde klimatische Bedingungen, sondern auch auf dessen Reaktion auf beispielsweise wechselnde Tierhaltungsbedingungen oder auf die Exposition mit Anthelminthika (Sargison et al., 2019).

Zusammenfassend ist deutlich erkennbar, dass der deutsche Genomentwurf, insbesondere im Vergleich zum Nordirischen, noch etliche Lücken aufweist, die es zukünftig gilt, mit Hilfe weiterer Sequenzierungsdaten zu schließen. Durch die zwischenzeitliche Veröffentlichung eines Genomentwurfes derselben Spezies wurde die Arbeit in diesem Punkt nicht intensiver fortgeführt. Ein vollständigeres deutsches Genom ließe zukünftig aber bessere Gegenüberstellungen von *C. daubneyi* Isolaten aus unterschiedlichen Regionen zu und könnte wichtige Erkenntnisse über Anpassungsmechanismen des Parasiten enthüllen, welche bereits

auf Genomebene verankert sind. Ergänzende Arbeiten auf dem Gebiet der Genomik sind deswegen dringend nötig.

3. Auswahl der Parasitenstadien für die vergleichende Transkriptomanalyse und Gewinnung des parasitären Probenmaterials

3.1. Relevanz und Auswahl der untersuchten Parasitenstadien

Der heteroxene Lebenszyklus *C. daubneyi* ist äußerst komplex und beinhaltet viele unterschiedliche Entwicklungsstufen mit teilweise fließenden Übergängen. In der Vergangenheit galt die alleinige Aufmerksamkeit bisher vor allem denjenigen Stadien im Endwirt, welche von klinischer Bedeutung sind. Von frisch exzystierten Jungegeln des Duodenums (NEJ), unreifen Darmegeln eingebettet in die Mukosa, neu in den Pansen migrierten Egel und von ausgereiften, adulten Pansenegele wurden bereits Transkriptomstudien erfolgreich durchgeführt (Huson et al., 2021b; Huson et al., 2018). Hinsichtlich der epidemiologischen Fragestellung, wie sich der Parasit in der Umwelt und im Zwischenwirt verhält, sind aber insbesondere die übrigen Entwicklungsstufen außerhalb des Endwirts von Bedeutung. Während von anderen Trematoden Transkriptomstudien von Zwischenwirts- und Umweltstadien schon zielführend durchgeführt wurden (Anderson et al., 2016; Ilgová et al., 2022; Zhang et al., 2017), fehlten dagegen derartige Daten von *C. daubneyi* bisher komplett.

Ein möglicher Grund, weshalb bisher Zwischenwirtstadien *C. daubneyi* noch nicht transkriptomisch untersucht wurden, könnte darin gelegen haben, dass der Zugang zu diesen Stadien in ausreichenden, vergleichbaren Mengen bisher sehr beschränkt bzw. nicht vorhanden war (Atcheson et al., 2020). Während beispielsweise für *F. hepatica* Metazerkarien schon seit einiger Zeit käuflich erworben werden können (z. B. bei Ridgeway Research Ltd., St. Briavels, UK (Cwiklinski et al., 2021) oder Baldwin Aquatics Inc., Monmouth, Oregon, United States (McNulty et al., 2017)), ist dies für *C. daubneyi* nicht immer gegeben und zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht möglich gewesen (Atcheson et al., 2020). Elbert (2024) ist es im Rahmen unserer Forschungsgruppe gelungen, eine zuverlässige Zucht des Zwischenwirts *G. truncatula* aufzubauen und den Lebenszyklus *C. daubneyi* unter

Laborbedingungen zu etablieren. Nicht zuletzt auch durch die erfolgreiche Kooperation mit Forschenden aus Frankreich war es möglich, eigenständig und unabhängig an Zwischenwirtstadien wie Redien und Zerkarien in ausreichender Anzahl und zu einem definierten Zeitpunkt zu gelangen und diese Stadien für eine erste Transkriptomstudie zu nutzen.

3.1.1. Eistadien repräsentieren die Entwicklung in der Umwelt

In dieser Arbeit wurden, repräsentativ für Entwicklungsstadien in der Umwelt, *C. daubneyi*-Eier zu drei verschiedenen Entwicklungszeitpunkten berücksichtigt. Um eine ausreichende Menge an RNA extrahieren zu können, wurden pro Replikat mindestens 10.000 Eier benötigt. Um Eizahlen in dieser Höhe ohne enormen Arbeitsaufwand zu erhalten, wurde die Eigewinnung aus adulten Pansenegeln gegenüber der Gewinnung aus Kot infizierter Wiederkäuer, wie beispielsweise in Elbert (2024) durchgeführt, bevorzugt und das Protokoll von Chryssafidis et. al (2015) herangezogen bzw. leicht abgeändert. Mit dieser Methode konnten ca. 750.000 Eier erfolgreich gewonnen werden.

Die Entscheidung, in welcher Form und Länge die Ei-Inkubation letztendlich stattfinden sollte und welche Entwicklungszeitpunkte in einer ersten Analyse betrachtet werden, wurde durch etliche Vorversuche getroffen und an die untersuchten Eistadien aus der Studie von Ilgová et. al (2022) angelehnt. Die Eier der Gruppe T14 wurden nach dem von Elbert (2024) etablierten Protokoll bei einer Temperatur von 27 °C und ohne Lichtquelle in 6-Well-Platten für 14 Tage inkubiert. Obwohl anders als bei Elbert (2024) hierfür keine Eier aus Kotproben verwendet wurden und dadurch die Darmpassage der Eier im Endwirt fehlte, lag die Entwicklungsrate zum schlupfreifen Mirazidium bei 63 %. Chryssafidis et. al (2015) erzielten mit dieser Methode dagegen nur eine Schlupf- bzw. Entwicklungsrate von insgesamt 2,7 %. Dies könnte an der Art der Aufbewahrung während der Inkubation gelegen haben, welche bei Chryssafidis et. al (2015) in 50 ml Tubes erfolgte und vermutlich eine Überlagerung der Eier zufolge hatte.

Aus diesen Beobachtungen heraus entstand die Hypothese, dass Stress in Form von Gewichtsdruck, auf vor allem weiter untenliegende Eier, die Entwicklung hemmen könnte. Diese Annahme wurde ebenso in Vorversuchen getestet und bestätigt: Die Eier der Gruppe T7 wurden demzufolge, anders als die Eier der Gruppe T14, während der Inkubation in *stehenden* 5 ml Tubes inkubiert. Die Eier zeigten

daraufhin eine übliche beginnende Zellorganisation im Inneren, darüber hinaus stagnierte die Entwicklung aber. Auch eine Inkubation von bis zu 21 Tagen brachte keine weiteren Entwicklungsfortschritte und die Schlupfrate lag bei 0 %. Chryssafidis et. al (2015) erzielte nach einer Inkubation von 21 Tagen geringe Schlupfraten von 7 %, was wiederum an der besseren Eiverteilung in 50 ml Tubes gelegen haben könnte. Alle Eier dieser Arbeit der Gruppe T7 befanden sich demnach wie angestrebt in einem ähnlichen, sehr frühen Entwicklungsstadium zu Beginn der Zellteilungsphase, lagen aber vermutlich unter dem zu erwartenden Entwicklungsstand 7-tägiger Eier, was bei den folgenden Ergebnissen nicht missinterpretiert werden darf.

Bei der Gewinnung aller Proben wurde auf den Zusatz antimikrobieller Wirkstoffe verzichtet, um möglichst wenig externen Einfluss auf die Entwicklung auszuüben. Vorherige Studien verfahren entweder ähnlich (Choudhary et al., 2015; Huson et al., 2018; Zhang et al., 2017) oder aber fügten in verschiedenen Arbeitsschritten Antibiotika hinzu (Ilgová et al., 2022; Martínez-Ibeas et al., 2013). Zur Beseitigung jeglicher bakterieller- oder Wirtskontamination wurde das Augenmerk auf sehr gründliche Waschungen gelegt. Zusätzlich wurde bei der Vorbereitung der Sequenzierbibliotheken ein Poly-A-Anreicherungsschritt durchgeführt, welcher zusätzlich bakterielle RNA weitgehend eliminiert haben sollte: Eukaryontische mRNA ist für eine bessere Stabilität polyadenyliert, während dies für Prokaryonten wie Bakterien nur in geringfügigem Maße der Fall ist und die mRNA dieser deswegen schneller degradiert (Dreyfus und Régnier, 2002). Dennoch kann eine geringe Restkontamination nicht gänzlich ausgeschlossen werden und muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

3.1.2. Redien und Zerkarien repräsentieren Stadien im Zwischenwirt

Allein Zhang et. al (2019b) untersuchten bisher Redien und Zerkarien von *F. gigantica* im Rahmen einer transkriptomischen Studie. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen somit erst die zweite Untersuchung dieser Parasitenstadien von Trematoden dar.

Redien repräsentieren ein Entwicklungsstadium *C. daubneyis* im Schnecken-Zwischenwirt und wurden deswegen für die Studie ausgewählt, da sie mikroskopisch eindeutig von unreifen Zwischenstadien wie Prozerkarien unterschieden werden können. Es wurde dabei nicht zwischen Redien erster und

zweiter Generation differenziert, da dies mit bloßem Auge nicht sicher durchzuführen war (Abrous et al., 1996; Kumar, 1999).

Die hier gesammelten Zerkarien können sowohl als Zwischenwirts-, als auch als Umweltstadium angesehen werden. Zum Zeitpunkt der Sammlung waren die Zerkarien zwar noch nicht selbstständig aus der Schnecke ausgetreten, allerdings waren sie allesamt beweglich und nachweislich zur Enzystierung zur Metazerkarie fähig, wie dies nach dem Austritt in die Umwelt der Fall wäre (Dinnik, 1962; Sey, 1977). Sowohl Redien, als auch Zerkarien wurden in bisherigen Trematodenstudien kaum berücksichtigt.

3.2. Besondere Hitzelabilität von *C. daubneyi*-RNA

Naturgemäß ist RNA aufgrund der Omnipräsenz von Ribonukleasen, sowohl in der Umwelt, als auch in den Proben selbst, sehr instabil und neigt zur schnellen Degradation. Um eine hohe RNA-Integrität für ein qualitativ hochwertiges RNA-Seq Experiment zu gewährleisten, ist es daher notwendig, die Extraktion zügig und mit Schutzmaßnahmen durchzuführen. Darüber hinaus ist es üblich, die Qualität der extrahierten RNA im Anschluss mittels einer Gelelektrophorese zu testen. Analysiert werden hierbei auffällige Banden häufig vorkommender rRNAs, insbesondere die 18S und die 28S Bande bei Eukaryonten bzw. die 16S und 23S Bande bei Prokaryonten. Eine RNA-Probe wird im Allgemeinen dann als intakt angesehen, wenn beide Banden klar, deutlich und abgegrenzt in der Gelelektrophorese als Peaks erscheinen (Winnebeck et al., 2010). Dies wurde in dieser Arbeit in einem ersten Schritt mit dem automatisierten Elektrophoresesystems 4150 TapeStation unmittelbar nach der Extraktion durchgeführt und nach Probenlagerung und Transport mit dem automatisierten Elektrophoresesystem 2100 Bioanalyser wiederholt. Beide Systeme entsprechen zurzeit dem Goldstandard und sehen zur Analysevorbereitung eine Hitze-Denaturierung der Proben bei $> 70^{\circ}\text{C}$ vor.

Bei der gelelektrophoretischen Überprüfung der RNA-Integrität mit obengenanntem TapeStation-System (nach standardisierter Vorbereitung der Proben inklusive Hitzedenaturierung bei 72°C für 3 min), fiel bei allen untersuchten *C. daubneyi* RNA-Extrakten wiederholend auf, dass die üblicherweise zu erwartenden 28S Banden gänzlich fehlten, die Peaks unverhältnismäßig klein waren oder nur unklar abgegrenzt erschienen. Sobald dieselben Proben zur

Analysevorbereitung keiner Hitzedenaturierung mehr ausgesetzt und lediglich bei Raumtemperatur (zwischen ca. 20 - 24 °C) bearbeitet wurden, waren übliche 18S und 28S Banden in der Elektrophorese ersichtlich, was wiederum den zu erwartenden Ergebnissen von Eukaryonten-RNA entsprach. Aus diesem Grund wurde letztlich die Hitzedenaturierung für alle Hauptproben ausgelassen und ausschließlich bei Raumtemperatur gearbeitet.

Winnebeck et. al (2010) beschrieben bereits genau dieses Phänomen ausführlich bei der Untersuchung extrahierter RNA der Honigbiene *Apis mellifera*. Die Gruppe nutzte den Agilent 2100 Bioanalyser und eine Hitzedenaturierung von 70 °C für 2 min. Unüblicherweise zeigten die rRNA-Profile des Insekts ausschließlich einen einzigen Peak bei der 18S Bande, während die 28S Bande gänzlich fehlte. Sobald die Hitzedenaturierung bei der Probenvorbereitung ausgelassen wurde, traten wieder die zu erwartenden zwei 18S und 28S Banden auf. Dabei schien ein Teil der 28S rRNA durch die Hitze in Fragmente aufgeteilt worden zu sein, welche zumindest teilweise in der 18S rRNA-Fraktion wiederauftraten. Die Recherche Winnebecks et. al (2010) gab Hinweise darauf, dass Thermolabilität in Insekten-rRNA unterschiedlicher Gattungen schon seit Jahrzehnten beobachtet wurde. Und nannte darüber hinaus einige Arbeiten, in der diese Beobachtungen bei Protostomiern, wozu z. B. Weichtiere, Gliederfüßler und Plattwürmer zählen und auch bei wenigen Säugetieren gemacht wurden. Als mögliche Erklärung führten Winnebeck et. al (2010) die Präsenz von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der 28S rRNA auf, welche durch die Hitze gespalten werden. Deren Lokalisation, der genaue Mechanismus des Einbaus dieser Bindungen während der RNA-Prozessierung, deren biologische Bedeutung oder mögliche andere Ursachen sind noch nicht vollständig erforscht.

Die Beobachtungen während der Analyse hitzedenaturierter *C. daubneyi*-RNA legen nahe, dass der Parasit ebenfalls bei der Prozessierung seiner unreifen RNA hin zur reifen rRNA bisher noch unbekannte Schritte durchläuft, die etwaige Wasserstoffbrücken innerhalb der 28S RNA einbauen, was die besondere Hitzelabilität der 28S rRNA während einer Integritätsanalyse erklären könnte. Um dieses Phänomen besser einordnen und für *C. daubneyi* verstehen zu können, wären weiterführende rRNA-Analysen dieser spezifischen Region, wie z. B. die Testung unterschiedlicher Temperaturschwellen während der Hitzedenaturierung, von Interesse. Vorherige Transkriptomstudien anderer, als die in dieser Arbeit

untersuchten Entwicklungsstadien *C. daubneyi*, beschrieben derartige Beobachtungen bisher nicht (Huson et al., 2021b; Huson et al., 2018). Das Wissen und Teilen dieser Erkenntnisse ist aber insbesondere dann von Bedeutung, wenn zukünftig weitere RNA-Seq Experimente unterschiedlicher Entwicklungsstadien *C. daubneyi* durchgeführt werden sollen. So kann ab sofort vermieden werden, dass zukünftig die RNA-Integrität während standardisierter Analysen fälschlicherweise als unzureichend beurteilt und missinterpretiert wird.

4. Rückschlüsse auf die Entwicklung und das Verhalten *C. daubneyi* in der Umwelt und im Zwischenwirt auf Basis der Transkriptomanalyse

4.1. Einordnung der differentiellen Genexpression von Entwicklungsstadien *C. daubneyi* im Zwischenwirt und in der Umwelt in den Gesamtzyklus

Die Arbeit von Zhang et. al (2019b) ist zurzeit die einzige, die den kompletten Lebenszyklus einer Trematode, in diesem Fall *F. gigantica*, über sämtliche Hauptentwicklungsstadien in der Umwelt, im Zwischen- und im Endwirt transkriptomisch abdeckte. Hierbei konnten wichtige Stoffwechsel-, Wachstums- und Entwicklungsprozesse identifiziert werden, die der Parasit während des Lebenszyklus durchläuft. Dieser ähnelt dem von *F. hepatica* und *C. daubneyi* sehr und geht sowohl mit Eiern in der Umwelt, als auch einem Schnecken-Zwischenwirt einher. Die Arbeit Zhangs und Kolleg:innen (2019b) gab einen hervorragenden Einblick in die Überlebensstrategien des Parasiten auf molekularbiologischer Ebene und ließ vermuten, dass nahe verwandte Trematodenspezies ähnliche Muster verfolgen könnten. Die Analyse der differentiellen Transkription *F. gigantica* ergab beispielsweise, dass zwar tausende Gene über alle acht Lebenszyklusstadien hinweg exprimiert wurden, der überwiegende Teil der Gene aber eine stadienspezifische Expression aufwies. Dabei wurden in jedem einzelnen Transkriptom-Datensatz stadienspezifische Expressionen beobachtet. Die übergreifende Schlussfolgerung daraus war, dass *F. gigantica* im speziellen durch seine transkriptionellen Änderungen in der Lage sei, sich an seine (Zwischen-) Wirte und ändernde Umweltbedingungen anzupassen (Zhang et al., 2019b).

Huson et. al (2021b) führten derartige Untersuchungen kurze Zeit später erstmals für die vier Säugetier-Entwicklungsstadien *C. daubneyi* durch und konnten hierbei ebenfalls vergleichend Veränderungen in der Gentranskription feststellen. Die Analyse ergab eine klare Transkriptionssignaltrennung zwischen den Zyklusstadien und zeigte auf, dass für jedes der untersuchten Entwicklungszeitpunkte unterschiedliche Muster der Genexpression existierten, welche sowohl mit ihrer Reife, als auch mit ihrer Nische im Säugetierendwirt korrelierten (Huson et. al, 2021b).

In dieser Arbeit letztendlich, konnten die transkriptomischen Untersuchungen *C. daubneyi* um weitere Stadien außerhalb des Endwirtes erweitert werden. Tatsächlich wurden dieselben Beobachtungen über das Anpassungsverhalten *C. daubneyi* im Zwischenwirt und in der Umwelt getätigt: Im Gesamten betrachtet, wurden bei den untersuchten Stadien zahlenmäßig mehr Transkripte stadienspezifisch, als über alle untersuchten Lebenszyklusstadien hinweg, exprimiert und eine stadienspezifische Expression konnte, wenigstens im kleinen Anteil, bei allen Datensätzen identifiziert werden. Allerdings war ausschließlich bei den Eiern T14 der stadienspezifische Anteil größer als der mit den anderen Stadien geteilte Anteil.

Darüber hinaus zeigten die verschiedenen Vergleiche mittels MA- und Volcano-Plots eindeutige transkriptionelle Änderungen innerhalb der verschiedenen Untersuchungsgruppen im statistisch signifikanten Bereich. Insbesondere durch die Betrachtungen in IGV und die angefertigten Heatmaps konnte bestätigt werden, dass es sich bei diesen Beobachtungen um repetitive Ereignisse handelte, die innerhalb einer biologischen Replikatgruppe reproduzierbar stattfand.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass auch *C. daubneyi*, wie bereits für seine Säugetierstadien festgestellt, spezifische transkriptionelle Änderungen während seiner komplexen Entwicklung in der Umwelt und im Zwischenwirt vornimmt, um sich dadurch an die wechselnden Lebensbedingungen anpassen zu können. Insbesondere der Übergang vom in der Umwelt befindlichen Ei hin zum schwimmenden, den Zwischenwirt aufsuchenden und eindringenden Mirazidium, scheint ein entscheidender, herausfordernder Entwicklungsschritt darzustellen, welcher besonders vieler spezifischer transkriptioneller Anpassungen bedarf.

4.2. Die Bedeutung des GO-Enrichment einzelner Subcluster in Zusammenhang mit den untersuchten Entwicklungsstadien für den Lebenszyklus und das Verhalten *C. daubneyi*

Um die zugrundeliegenden Vorgänge dieser Anpassungsvorgänge näher beschreiben zu können, wurden die hier erstellten Daten mit schon vorhandenen Datenbanken verglichen, um so Rückschlüsse auf mögliche Prozesse, Funktionen und Komponenten ziehen zu können. Neben der funktionellen Annotation, ermöglichte die durchgeführte GO-Enrichment-Analyse, diejenigen biologischen Funktionen (BP), molekularen Aktivitäten (MF) und zellulären Lokalisationen (CC) zu identifizieren, die signifikant in jedem der untersuchten Entwicklungsstadien hochreguliert (bzw. herunterreguliert) waren. Durch das hierarchische Clustering der 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Genexpression, wurden 16 interpretierbare Einheiten geschaffen, die Regionen aufzeigten, die für spezifische Entwicklungszeitpunkte *C. daubneyi* individuell reguliert wurden.

Der überwiegende Teil eines jeden Clusters konnte größenunabhängig dem GO-Bereich „Biological Process“ zugeordnet werden, der zusammenfassend Vorgänge und Abläufe innerhalb einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus beschreibt, welche durch spezifische Moleküle spezielle Funktionen erfüllen. Da zum Bereich „Biological Process“ insbesondere Inhalte in Bezug auf z. B. die Entwicklung, die Differenzierung, die multizelluläre Organisation, den Metabolismus, verschiedene Abwehrprozesse oder die Stressregulierung zählen, deutete die Anreicherung dieser Kategorie schon vor einer näheren Betrachtung an, wie sehr *C. daubneyi* zyklus- und umweltbedingter Veränderungen unterliegt und sich darauf mittels transkriptioneller Änderungen anzupassen versucht (The Gene Ontology Consortium et al., 2023).

4.2.1. Entwicklung frisch ausgeschiedener und früh entwickelter Eier in der Umwelt

Im Entwicklungszyklus des Parasiten werden zunächst farblose, unembryonierte und behüllte Eier durch die geschlechtliche Fortpflanzung adulter *C. daubneyi* Pansenegele produziert und unmittelbar in den Vormagen des Endwirtes abgelegt. Erst nach der Ausscheidung in die Umwelt entwickeln sich die Eier weiter, sofern präferierte Umweltbedingungen mit ausreichend Feuchtigkeit und wärmeren Temperaturen vorherrschen. Liegen dagegen Trockenheit und Kälte vor, kann die

Entwicklung für einige Monate stagnieren, ohne dabei die Entwicklungsfähigkeit zu beeinträchtigen (Deplazes et al., 2020). Im durchgeführten Versuch wurde die Darmpassage aus Gründen der Kontamination des Probenmaterials mit Kot umgangen und die Eier direkt aus adulten Panseneiern gewonnen. Die favorisierten Umweltbedingungen wurden mittels Inkubation in destilliertem Wasser und einer Temperatur von 27 °C simuliert.

Subcluster 1 beinhaltete GO-Terms in signifikantem und biologisch relevantem Maße, welche ausschließlich bei den Gruppen der Eier T0 und T7 angereichert waren. Da bereits die adulten Egel für die Eiausscheidung in wässrigem Milieu und unter warmen Bedingungen für wenige Stunden untergebracht wurden, konnten die Eier der Gruppe T0 unmittelbar mit der Weiterentwicklung und der Zellteilung beginnen. Derartige Entwicklungsvorgänge benötigen unter anderem Gene für die Regulierung von Transkription und Translation, sowie die Zellorganisation oder Kompartimentierung. Die Ankurbelung und Hochhaltung dieser Zellteilungs- und Entwicklungsprozesse bewiesen sämtliche hochregulierte GO-Terms im Sektor „Biologischer Prozess“, wie beispielsweise die Organellorganisation, der Nukleinsäuremetabolismus, die Chromosomorganisation, die Proteinmodifikation oder die Regulation der DNA- und RNA-Replikation (z. B. GO:0006996, GO:0090304, GO:0051276, GO:0036211, GO:0006275, GO:0016070). Unter der Kategorie „Molecular Function“ waren überwiegend die für diese Prozesse notwendige Bindung von Proteinen, Enzymen, Nukleotiden, Ionen, Kohlenhydrate und Phospholipide (z. B. GO:0005515, GO:0019899, GO:0000166, GO:0043167, GO:0097367, GO:0005543) beschrieben, wie dies auch Zhang et. al (2019b) für hochregulierte Eitranskripte beobachtete. Die Energie hierfür wurde durch ATP bereitgestellt (GO:0140662, GO:0005524). Eine Transkriptomstudie an *F. hepatica* fand ebenfalls ähnliche Komponenten bei adulten Parasiten hochreguliert, darunter die Bindung von ATP, Ionen oder Nukleotiden (Young et al., 2010b).

Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass in Subcluster 1 die Anreicherung erwähnter GO-Terms für die Eier der Gruppe T7 etwas geringer ausfiel, als bei den Eiern der Gruppe T0. Dies könnte mit der Art der stattgefundenen Inkubation zu erklären sein: Während die Eier der Gruppe T0 zunächst frisch in großen Behältnissen und reichlich Platz mit den adulten Egel untergebracht waren, ehe sie zur RNA-Extraktion herangezogen wurden, wurden die Eier der Gruppe T7 hingegen in engen Tubes inkubiert, in welchen Überlagerungen stattfanden. Wie

bereits erwähnt, schien die Entwicklung dieser Gruppe ab einem gewissen Punkt zu stagnieren, was wiederum die geringere Transkriptionsaktivität erklären könnte. Nicht untersucht wurde, ob die Eier zur Weiterentwicklung fähig gewesen wären, sobald sie „optimalere“ Bedingungen vorgefunden hätten.

4.2.2. Die Entwicklung vollständig embryonierter Eier hin zum Mirazidium in der Umwelt

Subcluster 2 präsentierte sich in dieser Arbeit als dasjenige, in welchem ausschließlich Transkripte der Eigruppe T14 hochreguliert waren. Die meisten signifikant hochregulierten Transkripte beinhalteten GO-Terms über 9 + 2 bewegliche Zilien und die Regulation derer Bewegung, über axonemale Mikrotubuli oder den Zusammenbau von Dyneinkomplexen (z. B. GO:0097729, GO:0005879, GO:0036158, GO:0003352).

Zilien befinden sich auf einer Vielzahl von Zelltypen und sind verantwortlich für die Erzeugung von Bewegung. Als Axonem bezeichnet man das innere Skelett eines Ziliums, welches aus einer charakteristischen Anordnung von Mikrotubuli in einer sogenannten 9 + 2 Struktur besteht (Anordnung von neun äußeren und zwei mittigen Mikrotubuli). Dynein erzeugt dabei als Motorprotein die nötige Kraft für die Zilienbewegung (Porter und Sale, 2000). Auch die Mirazidien von *C. daubneyi* sind mit zahlreichen beweglichen Zilien bestückt, um für die Penetration des Zwischenwirts zielgerichtet zu ihm schwimmen zu können (Sey, 1977).

Die proteomischen Untersuchungen an *S. mansoni* Mirazidien konnten bereits eine Hochregulation ziliärer Dyneinarme feststellen und diese mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Begeißelung der Mirazidien zurückführen (Wang et al., 2016). Die in dieser Arbeit untersuchte Gruppe der Eier T14 bestand aus vollständig embryonierten Pansenegleiern. In deren Eiinneren befanden sich motile, vollständig ausgereifte Mirazidien, welche für ihre Beweglichkeit begeißelt waren und unmittelbar vor dem Schlupf mit anschließender Suche des Zwischenwirts standen. Das Vorhandensein hochregulierter Transkripte und GO-Terms, welche in Zusammenhang mit Zilien und Dynein standen, sprachen bei den embryonierten *C. daubneyi* Eiern demnach ebenso mit hoher Wahrscheinlichkeit für die erfolgreiche Weiterentwicklung des Parasiten zum begeißelten Mirazidium und deren typischer Aufbaustruktur.

Auch bei der Untersuchung transkriptomischer Veränderungen von frisch migrierten Panseneiern und adulten Stadien *C. daubneyi* im Endwirt, wurde die Hochregulation von Dynein beobachtet, dann aber ein Zusammenhang mit trematodischen Spermatozoen hergestellt (Huson et al., 2021b). In der Tat ist Dynein auch eine strukturelle Komponente des Axonems von Samenzellen bei Trematoden (Stitt und Fairweather, 1990) und ist demnach bei sich geschlechtlich fortpflanzenden adulten Eiern vorzufinden (Huson et al., 2021b). In Subcluster 2 dieser Arbeit existierten mehrere statistisch signifikant hochregulierte GO-Terms, die tatsächlich einen Hinweis auf Spermien-bezogene Zilien und deren Beweglichkeit gaben (GO:0036126, GO:0030317, GO:0097722). Die Entwicklung vom unembryonierten Ei hin zum beweglichen Mirazidium findet durch Zellteilung- und Differenzierung und somit ungeschlechtlich statt. Im ausgereiften Mirazidium selbst, sind allerdings schon Anlagen für Keimdrüsengewebe vorhanden, was eine erste Erklärung für die Beobachtung spermienbezogener GO-Terms sein könnte (Sey, 1977). Wahrscheinlicher ist allerdings die grundsätzliche, funktionelle Anpassung dieser Bewegungsmechanismen auf das Mirazidium: Der Bewegungsablauf von Mirazidien ähnelt generell dem der Spermien, welche ebenfalls auf oben beschriebene Mikrotubuli-Struktur und den Einsatz von Dynein zurückgreifen (Stitt und Fairweather, 1990). Diese Mechanismen sind aber grundsätzlich unabhängig von der Fortpflanzungsfunktion evolutionär konserviert und dienen universell verschiedenen Zelltypen der Fortbewegung. Vor dem Hintergrund der Art und Weise der Mirazidienbewegung ist es folglich wahrscheinlicher, dass die gleichen Mechanismen, die auch für die Spermienfortbewegung gelten, in diesem Fall funktionell angepasst wurden, um die Beweglichkeit von Mirazidien zu ermöglichen.

Der Mirazidienschlupf wird durch die Exposition der Eier mit (Tages-) Licht ausgelöst (Kumar, 1999). Bei der Verarbeitung der Eier der Gruppe T14 wurde aus diesem Grund sorgfältig darauf geachtet, keine Lichtreize zu setzen. Da eine Arbeit in völliger Dunkelheit aber praktisch nicht möglich war, konnte ein vollständiges Fehlen von Licht und ein vorzeitiger Schlupf weniger Mirazidien nicht gänzlich verhindert werden. Die identifizierten, angereicherten GO-Terms, welche die zelluläre Antwort auf UV-Licht bzw. auf einen Lichtstimulus beschrieben (GO:0034644, GO:0071482), sollten deswegen Erwähnung finden. Gleichzeitig sind sie eine Bestätigung für die Fähigkeit von *C. daubneyi* Mirazidien im Ei auf

Lichtreize zu reagieren. Diese Kompetenz konnten Zhang et. al (2019) in ähnlicher Weise für *F. gigantica* Mirazidien durch die Anreicherung des GO-Terms GO:0019684 (Photosynthese/Lichtreaktion) feststellen.

Darüber hinaus waren bei den Eiern der Gruppe T14 in Subcluster 2 insbesondere Bereiche signifikant angereichert, welche mit Genfunktionen des Ribosoms, der Translation und der Proteinbiosynthese in Zusammenhang standen (z. B. GO:0003735, GO:0044391, GO:0006412, GO:0043043). Dies spiegelte den intensiven Bedarf an Proteinen und Regulationsmechanismen wider, welcher für die zahlreichen Zell- und Gewebsdifferenzierung hin zum vollständig entwickelten Mirazidium benötigt wurden.

4.2.3. Eigenschaften aller Eistadien

Subcluster 5 und 6 beschrieben angereicherte Gene, welche für *alle* untersuchten Eistadien, vom unbembryonierten, bis zum vollständig entwickelten Zustand, hochreguliert wurden. Zwar besaß nur der überrepräsentierte p-Wert dabei statistische Signifikanz, dennoch gab die vorhandene Literatur Hinweise darauf, dass die Interpretation der hier beobachteten Annotationen nicht vernachlässigt werden sollte. Die GO-Terms, welche über alle Eistadien hinweg angereichert waren, befassten sich insbesondere mit dem Spurenelement Eisen, dessen Bindung, Transport und der Eisenhomöostase (z. B. GO:0008199, GO:0006826, GO:0006879, GO:0097577, GO:0055072). Eisen, ein essentielles Spurenelement, kommt in nahezu allen Organismen vor und dient als Cofaktor in zahlreichen biologischen Reaktionen. Eisenhaltige Proteine katalysieren lebenswichtige Reaktionen im Zusammenhang mit dem Sauerstoff- und Elektronentransport, der Energietransduktion, der Nukleinsäuresynthese und der Entgiftung.

Eisen konnte in Trematodeneiern von *S. japonicum*, genauer in deren Eischale, in hohem Maße nachgewiesen werden, welches dabei der Stabilisation diene (Jones et al., 2007). Eine weitere Studie bestätigte ebenfalls das Vorkommen von Eisen in *Schistosoma* Eiern: Die Eischalen von *S. mansoni* und *S. japonicum* enthielten hierbei derart hohe Eisenkonzentrationen, dass sie sogar schwach magnetisch waren (Karl et al., 2013). Auch in einer über *F. hepatica* durchgeführten Proteomstudie, konnte das Vorhandensein von Ferritin, ein Protein zur Eisenspeicherung, in löslichen Eiextrakten nachgewiesen werden (Moxon et al., 2010). Die Auswertung des *C. daubneyi* Genoms enthüllte darüber hinaus erst

kürzlich, dass dem Parasit das Eischalenprotein L-DOPA fehlt, welches üblicherweise für die Eischalenstabilität bei Trematoden vorgefunden wird. Es wird vermutet, dass sich *C. daubneyi* einer atypischen Vernetzungsschemie bedient, um eine besonders hohe Schalenstabilität zu erlangen (Clancy et al., 2025). Vor dem Hintergrund der vorhandenen Literatur und den Ergebnissen dieser Arbeit, lässt sich demnach vermuten, dass *C. daubneyi*-Eier Eisen nicht nur für Zellteilungs- und Entwicklungsvorgänge verwenden, sondern das Spurenelement für eine noch bisher unerforschte Strategie der Eischalenintegrität benötigt. Aufbauende Transkriptom- und Proteomstudien von leeren Eihüllen könnten weitere Erkenntnisse liefern.

4.2.4. Entwicklung und Verhalten von Redien im Schnecken-Zwischenwirt

Die Arbeit von Zhang et. al (2019b) war bisher die einzige, welche Redien einer *C. daubneyi* nahestehenden Trematodenspezies, in diesem Fall *F. gigantica*, genauer transkriptomisch untersucht hatte. Die Analyse des Stoffwechsels ergab, dass *F. gigantica* Redien, im Vergleich zu den anderen Lebenszyklusstadien, ein hohes Maß an Gentranskription, Translation, Replikation und Reparatur aufwies, was eine Voraussetzung für die Entwicklung mehrerer Rediengenerationen innerhalb der Schnecke ist. Gene, die mit dem Ribosom (ribosomale Proteine), der Ribosomenbiogenese und dem Spleißosom (Spleißfaktoren und Ribonukleoproteine) assoziiert sind, gehörten zu den am häufigsten transkribierten Genen, die mit Transkription/Translation in Verbindung stehen. Darüber hinaus trugen auch DNA-gesteuerte RNA-Polymerasen, Transkriptionsinitiationsfaktoren und Translationsinitiationsfaktoren, die mit dem RNA-Transport verbunden sind, zu den hohen Transkriptionsraten bei (Zhang et al., 2019b).

Die biologischen Veränderungen der schnellen, asexuellen Redientwicklung in der Schnecke fanden sich auch bei *C. daubneyi* in signifikant hoch angereicherten Transkripten des Subclusters 7 wieder. Ähnlich zu Zhang et. al (2019b) wurden zahlreiche Gene in Redien hochreguliert, welche in Zusammenhang mit der Transkription, Translation, dem Spleißosom und dem Proteinmetabolismus stehen. Auch *C. daubneyi* kommt folglich den hohen biologischen Anforderungen während der schnellen, asexuellen Entwicklung innerhalb der Schnecke durch die Anpassung der transkriptionellen Aktivität dafür wichtiger Prozesse nach.

Die Weiterentwicklung innerhalb eines Fremdorganismus kann nur dann ungestört von statten gehen, wenn der Parasit vom (Zwischen-)Wirt unerkannt bleibt oder zumindest wirtseigene Abwehrmechanismen lange genug umgehen oder abwehren kann. Um auf die Abwehrstrategien der Zwischenwirtsschnecke reagieren zu können, ist zunächst die Erkennung dieser notwendig. Sowohl in Subcluster 7 in statistisch signifikantem Maße, als auch darüber hinaus in Subcluster 15 mit signifikanten p-Werten, wurden in *C. daubneyi* Redien Gene angereichert, welche zur Detektion externer Stimuli (biotisch, abiotisch, organisch, anorganisch, bakteriell) und der Reaktion auf diese dienen. Zusätzlich gaben die angereicherten GO-Terms Hinweise darauf, dass die Redien über angeborene Immunabwehrstrategien verfügen, um das Überleben im Zwischenwirt zu sichern (GO:0045087). Auch Zhang et. al (2019b) konnten GO-Terms in Zwischenwirtsstadien *F. giganticas* identifizieren, welche mit der Immunabwehr assoziiert werden, einschließlich der Aktivierung der angeborenen Immunantwort (GO: 0002218), des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs (GO:0050853) und der Lymphozytenaktivierung (GO:0046649).

Da die *C. daubneyi* Redien unmittelbar aus seziierten Schnecken gewonnen wurden, kann trotz gründlicher Waschungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass eine geringe Kontamination mit Schneckengewebe vorlag und die Beobachtungen in Wahrheit auf Immunabwehrstrategien des Zwischenwirtes zurückzuführen sind.

4.2.5. Stoffwechselverhalten von Zerkarien

Für die Transkriptomanalyse *C. daubneyis* wurden ausschließlich voll ausgereifte, schwimmfähige und zur Enzystierung in der Umwelt bereite Zerkarien aus den Schnecken gewonnen. Sämtliche prozerkariale Stadien wurden nicht berücksichtigt. Die Auswertung des Subclusters 3, welcher Gene beinhaltete, die ausschließlich bei Zerkarien signifikant hochreguliert waren, gab preis, dass in Zerkarien der Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus), sowie der Citratmetabolismus und auch die Atmungskette in besonderem Maße aktiv waren. Der TCA-Zyklus ist ein zentraler Stoffwechselweg der Mitochondrien, welcher unter aeroben Bedingungen Energie für die Zelle bereitstellt und indirekt von Sauerstoff abhängt, da dieser für die Energiegewinnung in der Atmungskette benötigt wird.

Huson et. al (2021b) diskutierten ebenfalls den TCA-Zyklus bei der Transkriptomanalyse von *C. daubneyi* Stadien des Endwirts. Die Analyse zeigte,

dass Mitglieder des TCA-Zyklus im NEJ-Stadium am stärksten exprimiert wurden und mit der Reifung des Parasiten zum adulten Stadium allmählich herunter reguliert wurden. Zeitgleich mit dem stetigen Rückgang des TCA-Zyklus, wurden Gene in Zusammenhang mit dem Malat-Dismutationszyklus, also der anaeroben Energiegewinnung, hochreguliert.

Die Sauerstoffverfügbarkeit im Laufe des *C. daubneyi* Zyklus schwankt sehr. Während Stadien in der Umwelt problemlos, und auch NEJ-Stadien noch in gewissem Maße, Zugang zu Sauerstoff haben, so ist dies nicht für adulte Parasiten im anaeroben Milieu des Pansens zutreffend. Bereits Huson et. al (2021b) vermuteten deshalb, dass sich die Energiegewinnungsstrategie *C. daubneyis* während der Entwicklung vom aeroben TCA-Zyklus hin zum anaeroben Malat-Dismutationszyklus ändert. Eine Studie von Cwiklinski et. al (2015) untersuchte ebenfalls die Expression von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels *F. hepaticas* und zeigte, wie das Wachstum des Parasiten die Sauerstoffdiffusion in das Parasitengewebe einschränkt und er vom aeroben TCA-Energiestoffwechsel zum anaeroben Malat-Dismutationszyklus übergeht. Die Erkenntnis, dass in *C. daubneyi* Zerkarien Gene für den TCA-Zyklus, die Atmungskette, dem Citratmetabolismus und darüber hinaus auch für mitochondriale Vorgänge, hochreguliert waren, bestärkt die Ergebnisse aus der vorherigen Transkriptomstudie von Huson et. al (2021b) und die Art und Weise der Zerkarien, die benötigte Energie aus der aeroben Umgebung bereitzustellen.

Neben oben erwähnten GO-Terms, waren in Subcluster 3, 8 und 10 weitere Gene ausschließlich bei Zerkarien hochreguliert, welche signifikante p-Werte aufwiesen. Darunter fiel die Hochregulation kontraktiler Vakuolen. Vakuolen kommen insbesondere in freilebenden einzelligen Parasiten vor, dienen der Osmoregulation und entfernen überschüssiges Wasser aus der Zelle (Jimenez et al., 2022). *C. daubneyi* Zerkarien finden sich beim Austritt aus dem Zwischenwirt in der Regel in einer wässrigen Umgebung vor, zumal *G. truncatula* vor allem in feuchten bis nassem Habitaten vorzufinden ist (Rondelaud et al., 2016; Schweizer et al., 2007). Auch der Parasit benötigt deshalb eine Strategie, um überschüssiges Wasser aus den Zellen zu befördern und könnte sich deswegen kontraktiler Vakuolen bedienen, um dies zu bewerkstelligen.

Schwimmfähige *C. daubneyi* Zerkarien haben das Ziel, an umliegende Pflanzen heranzuschwimmen und durch den Abwurf ihres Schwanzes zu runden, infektiösen

Metazerkarien zu enzystieren (Deplazes et al., 2020). Da die Infektion des Endwirtes insbesondere oral durch die Aufnahme von mit Metazerkarien behafteten Futterpflanzen erfolgt, ist die Aufsuche der Gewächse durch Zerkarien für die Infektion mitentscheidend (Kahl et al., 2021). Genau wie Mirazidien, besitzen Trematodenzerkarien nur begrenzte Energiereserven und müssen innerhalb einer kurzen Zeitspanne zu ihrem Ziel gelangen. Obwohl die Mechanismen, welche das Schwimmverhalten von Zerkarien steuern, noch nicht vollständig verstanden werden, konnten Forschende bereits durch Verhaltensanalysen zeigen, dass die internen Steuerungsmechanismen von externen Reizen abhängen (Haas, 2003). Die Hochregulation von Genen in Subcluster 3 und 8, die in Zusammenhang mit der positiven Regulation der Chemotaxis stehen, könnte einen Hinweis darauf geben, dass auch *C. daubneyi* Zerkarien nicht „blind“, sondern zielgerichtet an Pflanzen heranschwimmen, um dort zu enzystieren und dabei durch chemotaktische Reize geführt werden.

5. Fazit und Ausblick

Wie bereits die Forschung an anderen Trematodenspezies von „Omic“-Studien profitieren konnte, so wurden auch in dieser Arbeit die Vorteile der RNA-Seq für die Erforschung der bisher „vernachlässigten“ Trematode *C. daubneyi* genutzt (Huson et al., 2017). In der vorliegenden Studie wurden erstmals Transkriptomdaten ausgewählter Entwicklungsstadien *C. daubneyis* in der Umwelt und im Schnecken-Zwischenwirt erhoben und analysiert. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass *C. daubneyi* während der untersuchten Lebensphasen spezifische, transkriptionelle Anpassungen vornimmt, um sich an Umwelt- und Zwischenwirtsbedingungen anzupassen. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung molekularer Anpassungsstrategien in der Entwicklung parasitischer Trematoden und bedeuten einen weiteren Schritt näher zur Identifizierung neuer Maßnahmen, die den Lebenszyklus *C. daubneyis* unterbrechen könnten und dadurch langfristig Neuinfektionen und die zunehmende Ausbreitung eindämmen. Da die generierte Datenmenge extrem groß ist, konnten in dieser Arbeit nur ausgewählte Aspekte berücksichtigt werden. Die Daten ließen darüber hinaus weitere, tiefergehende Analysen, beispielsweise zu *depleted*-GO-Terms, KEGG-Pathways oder die Fokussierung auf exprimierte Peptidasen zu und sollten in

Kombination mit zukünftigen Projekten weiter ausgewertet werden.

Um den Lebenszyklus des Parasiten noch detaillierter zu studieren, wäre die Analyse weiterer Entwicklungsstufen, insbesondere die der Mirazidien und Metazerkarien, erstrebenswert. Beide stellen entscheidende Schlüsselstadien dar, die für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus und die Infektion des Zwischen- bzw. Endwirts von Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass auch für Mirazidien und Metazerkarien spezifische Gene exprimiert werden, deren Analyse wichtige Angriffspunkte für weitere Bekämpfungsstrategien liefern könnten. Darüber hinaus würde die Integration von weiteren „Omics“-Studien aller Stadien, wie Proteomik oder Sekretomik, das Verständnis erweitern und die vorliegenden Transkriptomdaten sinnvoll ergänzen (Huson et al., 2017).

Die DNA-Sequenzierung eines adulten *C. daubneyi* Isolats lieferte einen ersten deutschen Genomentwurf des Parasiten. Der Vergleich mit dem umfassenderen nordirischen Genom zeigt sowohl Übereinstimmungen, als auch Unterschiede, die auf regionale Anpassungen und genetische Vielfalt hinweisen könnten (Clancy et al., 2025). Obwohl das deutsche Genom unvollständiger ist, bietet es wichtige Ansätze, um bestehende Lücken zu schließen und weitere Untersuchungen zu ermöglichen. Zukünftige Arbeiten mit detaillierteren Genomdaten sind entscheidend, um die Diversität des Parasiten genauer zu untersuchen und entsprechende Anpassungsstrategien auf regionale Gegebenheiten davon abzuleiten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Seit einigen Jahren breitet sich die Paramphistomidose zunehmend in Europa aus und gewinnt immer mehr an Bedeutung. Die Pansenegelspezies *C. daubneyi*, welche einen komplexen Lebenszyklus durchläuft, spielt dabei die dominierende Rolle. „Omic“-Studien *C. daubneyi* von Entwicklungsstadien in der Umwelt und im Zwischenwirt fehlten bisher gänzlich. Angesichts der eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten und der zunehmenden Ausbreitung der Paramphistomidose, gilt es zukünftig insbesondere auch diese Parasitenstadien auf molekularer Ebene besser zu verstehen, um langfristig geeignete Bekämpfungsmaßnahmen entwickeln zu können.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine vergleichende Transkriptomanalyse von freilebenden *C. daubneyi* Stadien, sowie Stadien aus dem Zwischenwirt mittels RNA-Seq durchgeführt. Berücksichtigt wurden jeweils drei biologische Replikate frisch ausgeschiedener, unembryonierter Eier, von Eiern am Beginn ihrer Entwicklung während der Zellteilung und vollständig embryonierter Eier, sowie von Redien und Zerkarien. Es wurde beobachtet, dass die Eier in ihrer Entwicklung gehemmt werden, sobald Gewichtsdruck auf sie ausgeübt wird. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die RNA von *C. daubneyi* eine ungewöhnliche Hitzelabilität gegenüber Temperaturen von über 70 °C aufweist. Das Vorhandensein alternativer Prozessierungsschritte der unreifen RNA mit dem Einbau von Wasserstoffbrückenbindungen wird diskutiert.

Eine vergleichende Transkriptomanalyse der untersuchten Entwicklungsstadien zeigte, dass zu allen Zeitpunkten stadienspezifische Gene exprimiert wurden und differenzielle Genexpression stattfand. Umso weiter die Entwicklungsstadien zeitlich gesehen voneinander entfernt lagen, desto größer fiel die differenzielle Expression aus. Die spezifischen transkriptionellen Änderungen erklären, wie es dem Parasiten möglich ist, sich während seiner komplexen Entwicklung in der Umwelt und im Zwischenwirt an die wechselnden Lebensbedingungen anzupassen. Es scheint, dass insbesondere der Übergang vom Ei zum Mirazidium dabei besonders herausfordernd ist und vieler transkriptioneller Anpassungen bedarf.

Des Weiteren wurde eine funktionelle Annotation und eine GO-Enrichment-Analyse ausgewählter Gencluster durchgeführt und insbesondere hochregulierte

Transkripte ausgewertet. Alle untersuchten Eistadien zeigten transkriptionelle Aktivität in Zusammenhang mit Eisen (Bindung, Transport und Homöostase), welches dabei eine noch unerforschte Rolle in der Eischalenstabilität spielen könnte. Die Eier waren zu Beginn ihrer Entwicklung besonders in der Transkription, Translation und dem Nukleinsäuremetabolismus involviert, was mit der fortschreitenden Zellteilung und Organellorganisation im Eiinneren einhergeht. In vollständig embryonierten Eiern hingegen waren überwiegend Transkripte aktiv, welche in Zusammenhang mit dem Zusammenbau von Zilien und der Regulation von Bewegung standen. Dies korreliert mit der Entwicklung vom Ei zum schwimmfähigen, den Zwischenwirt aufsuchenden Mirazidium. Redien entwickeln sich im Schnecken-Zwischenwirt schnell über mehrere Generationen weiter, was durch die Hochregulation von Genen, welche mit dem Ribosom und Spleißosom, sowie Transkriptions- und Translationskomponenten zusammenhängen, widerspiegelt wurde. Die Analyse der Zerkarien ergab, dass in diesen Gene für den TCA-Zyklus hochreguliert waren, was eine Anpassung des Parasiten an die aeroben Verhältnisse in der Umwelt nach dem Austritt aus dem Schneckenzwischenwirt erklärt.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmals eine Erstsequenzierung aus DNA von deutschen, adulten *C. daubneyi*-Parasitenisolaten durchgeführt. Ein grundlegender Genomentwurf wurde erstellt, der mit 417,81 Mb noch vergleichsweise lückenhaft war und daher zukünftiger Nachsequenzierungen bedarf. Der ermittelte GC-Gehalt von 42,75 % kam dem verwandter Trematodenspezies sehr nahe. Ein erster Vergleich mit dem kürzlich erschienenen nordirischen *C. daubneyi* Genomentwurf enthüllte etliche Parallelen und gab Hinweise auf das Vorhandensein von Sequenzrepetitionen. Insgesamt stimmten 78 % des deutschen Entwurfes mit dem der Nordiren überein. Die genetische Diversität verschiedener *C. daubneyi* Isolate aus unterschiedlichen Regionen könnte eine Erklärung hierfür liefern.

Zusammenfassend ermöglichte diese Arbeit erstmals anhand transkriptomischer Daten, das Verständnis über die Lebensweise *C. daubneyis*, insbesondere in der Umwelt und im Schnecken-Zwischenwirt, zu vertiefen. Gleichzeitig lieferte das Projekt eine wertvolle Grundlage für folgende „Omic“-Studien und trägt dazu bei, potentielle Angriffspunkte zu ermitteln, um zukünftig Bekämpfungsstrategien zu entwickeln, die schon auf Umwelt- und Zwischenwirtsebene ansetzen.

VII. SUMMARY

For some years now, Paramphistomidosis has been spreading increasingly in Europe and is becoming more important. The rumen fluke species *C. daubneyi*, which goes through a complex life cycle, plays the dominant role. All ‘Omic’ studies of developmental stages in the environment and the intermediate host have so far been completely lacking. In view of the limited treatment options and the increasing spread of Paramphistomidosis, it is particularly important to better understand these parasite stages at the molecular level in order to be able to develop suitable control measures in the long term.

In this work, a comparative transcriptome analysis of *C. daubneyi* environmental and intermediate host stages was performed for the first time using RNA-Seq. Three biological replicates each of freshly excreted, unembryonated eggs, eggs at the beginning of their development during cell division and fully embryonated eggs, as well as redia and cercariae, were considered. It was observed, that the eggs are inhibited in their development as soon as weight pressure is exerted on them. In addition, the RNA of *C. daubneyi* was found to have an unusual heat intolerance to temperatures above 70 °C. The existence of alternative processing steps of the immature RNA with the incorporation of hydrogen bonds is discussed.

A comparative transcriptome analysis of the developmental stages showed that stage-specific genes were expressed at all time points and that differential gene expression took place. The further apart the developmental stages were in time, the greater was the differential expression. The specific transcriptional changes explain how the parasite is able to adapt to changing living conditions during its complex development in the environment and in the intermediate host. It appears that the transition from the egg to the miracidium requires a particularly large number of transcriptional adaptations.

Furthermore, a functional annotation and GO enrichment analysis of selected gene clusters was performed and in particular upregulated transcripts were analysed. All egg stages showed transcriptional activity related to iron (binding, transport and homeostasis), which might play an so far unexplored role in eggshell stability. The eggs were particularly involved in transcription, translation and nucleic acid metabolism at the beginning of their development, which is associated with

progressive cell division and organelle organisation inside the egg. In fully embryonated eggs, on the other hand, transcripts associated with cilia assembly and the regulation of movement were predominantly active. This correlates with the development of the egg into a swimming miracidium that seeks out the intermediate host. Redia develop rapidly over several generations in the snail intermediate host, which was reflected by the upregulation of genes related to the ribosome and spliceosome, as well as transcription and translation components. Analysis of the cercariae revealed, that genes for the TCA cycle were upregulated in them, which explains an adaptation of the parasite to the aerobic conditions in the environment after exit from the snail intermediate host.

In addition to transcriptome analysis, in this work initial sequencing of DNA from a German adult *C. daubneyi* parasite isolate was carried out for the first time. A basic draft genome was created, which at 417.81 Mb was still comparatively incomplete and therefore requires future sequencing. The determined GC content of 42.75 % was very close to that of related trematode species. An initial comparison with the recently published Northern Irish *C. daubneyi* draft genome revealed a number of parallels and indicated the presence of sequence repeats. Overall, 78 % of the German draft matched the Northern Irish draft. The genetic diversity of different *C. daubneyi* isolates from different regions could provide an explanation for this.

In summary, this work allowed for the first time to deepen the understanding of the life cycle of *C. daubneyi*, especially in the environment and in the snail intermediate host, using transcriptomic data. At the same time, the project provided a valuable basis for future ‘omic’ studies and contributes to the identification of potential targets for the development of future control strategies at the environmental and intermediate host level.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abrous, M., Rondelaud, D. und Dreyfuss, G. (1996). *Paramphistomum daubneyi*: the development of redial generations in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research* 83, 64-69.

Abrous, M., Rondelaud, D. und Dreyfuss, G. (1999a). Influence of low temperatures on the cercarial shedding of *Paramphistomum daubneyi* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite* 6, 85-8.

Abrous, M., Rondelaud, D. und Dreyfuss, G. (1999b). *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research* 85, 765-9.

Abrous, M., Rondelaud, D. und Dreyfuss, G. (2000). A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *Journal of Helminthology* 74, 189-194.

Abrous, M., Rondelaud, D., Dreyfuss, G. und Cabaret, J. (1999c). Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Veterinary Research* 30, 113-8.

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F. et al. (1991). Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. *Science* 252, 1651-1656.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2002). "From DNA to RNA" In: *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. New York: Garland Science.

Alstedt, U., Voigt, K., Jäger, M. C., Knubben-Schweizer, G., Zablotski, Y., Strube, C. und Wenzel, C. (2022). Rumen and Liver Fluke Infections in Sheep and Goats in Northern and Southern Germany. *Animals* 12, 876.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Anderson, L., Amaral, M. S., Beckedorff, F., Silva, L. F., Dazzani, B., Oliveira, K. C., Almeida, G. T., Gomes, M. R., Pires, D. S., Setubal, J. C. et al. (2016). *Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(12), e0004334.

Arias, M. S., Sanchís, J., Francisco, I., Francisco, R., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Cortiñas, F. J., Suárez, J. L., Sánchez-Andrade, R. und Paz-Silva, A. (2013). The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle. *Veterinary Parasitology* 197, 126-129.

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T. et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25-29.

Atcheson, E., Skuce, P. J., Oliver, N. A. M., McNeilly, T. N. und Robinson, M. W. (2020). *Calicophoron daubneyi* - The Path Toward Understanding Its Pathogenicity and Host Interactions. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 606.

Augot, D., Abrous, M., Rondelaud, D. und Dreyfuss, G. (1996). *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* subjected to successive unimiracidial cross-exposures. *Parasitology Research* 82, 623-7.

Bairoch, A. und Apweiler, R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research* 28, 45-8.

Barda, B. D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M. und Albonico, M. (2013). Mini-FLOTAC, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2344.

Bastyrova Brutovska, A., Vogalova, P., Rost, M., Sak, B. und Kvac, M. (2023). *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) (*Digenea*) in beef and dairy cattle in the Czech Republic: prevalence and drug efficacy. *Folia Parasitologica (Praha)* 70, 001.

Bentley, D. R. Balasubramanian, S. Swerdlow, H. P. Smith, G. P. Milton, J. Brown, C. G. Hall, K. P. Evers, D. J. Barnes, C. L. Bignell, H. R. et al. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53-59.

Berger, D. (2021). Comparative and population genomic analyses of the parasitic blood flukes. Ph.D. Thesis. Apollo - University of Cambridge Repository.

Berriman, M., Haas, B. J., LoVerde, P. T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., Cerqueira, G. C., Mashiyama, S. T., Al-Lazikani, B., Andrade, L. F., Ashton, P. D. et al. (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460, 352-8.

Biswal, D. K., Roychowdhury, T., Pandey, P. und Tandon, V. (2018). De novo genome and transcriptome analyses provide insights into the biology of the trematode human parasite *Fasciolopsis buski*. *PLOS One* 13, e0205570.

Bosco, A., Ciuca, L., Maurelli, M. P., Vitiello, P., Cringoli, G., Prada, J. M. und Rinaldi, L. (2023). Comparison of Mini-FLOTAC, Flukefinder® and sedimentation techniques for detection and quantification of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* eggs using spiked and naturally infected bovine faecal samples. *Parasites & Vectors* 16, 260.

Bosco, A., Nocerino, M., Santaniello, M., Maurelli, M. P., Cringoli, G. und Rinaldi, L. (2021). Mapping the Spatial Distribution of the Rumen Fluke *Calicophoron daubneyi* in a Mediterranean Area. *Pathogens* 10, 1122.

Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X. et al. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26, 1146-53.

BroadInstitute. (2019). "Picard". *Broad Institute, GitHub repository*, <https://broadinstitute.github.io/picard/>; Zugriff am 07. September 2024

Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., Lee, T. J., Leigh, N. D., Kuo, T.-H., Davis, F. G. et al. (2017). A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Reports* 18, 762-776.

Busin, V., Geddes, E., Robertson, G., Mitchell, G., Skuce, P., Waime, K., Millins, C. und Forbes, A. (2023). A Study into the Identity, Patterns of Infection and Potential Pathological Effects of Rumen Fluke and the Frequency of Co-Infections with Liver Fluke in Cattle and Sheep. *Ruminants* 3, 27-38.

Byron, S. A., Van Keuren-Jensen, K. R., Engelthaler, D. M., Carpten, J. D. und Craig, D. W. (2016). Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: opportunities and challenges. *Nature Reviews Genetics* 17, 257-271.

Červená, B., Anettová, L., Nosková, E., Pafčo, B., Pšenková, I., Javorská, K., Příhodová, P., Ježková, J., Václavek, P., Malát, K. et al. (2022). The winner takes it all: dominance of *Calicophoron daubneyi* (*Digenea: Paramphistomidae*) among flukes in Central European beef cattle. *Parasitology* 149, 612-621.

Chen, J. und Xu, F. (2023). Application of Nanopore Sequencing in the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Infections. *Molecular Diagnosis & Therapy* 27, 685-701.

Chen, P. Y. und Meister, G. (2005). microRNA-guided posttranscriptional gene regulation. *Biological Chemistry* 386, 1205-18.

Choudhary, V., Garg, S., Chourasia, R., Hasnani, J. J., Patel, P. V., Shah, T. M., Bhatt, V. D., Mohapatra, A., Blake, D. P. und Joshi, C. G. (2015). Transcriptome analysis of the adult rumen fluke *Paramphistomum cervi* following next generation sequencing. *Gene* 570, 64-70.

Chryssafidis, A. L., Fu, Y., De Waal, T. und Mulcahy, G. (2015). Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. *Veterinary Parasitology* 210, 25-31.

Clancy, S. M., Whitehead, M., Oliver, N. A. M., Huson, K. M., Kyle, J., Demartini, D., Irvine, A., Santos, F. G., Kajugu, P. E., Hanna, R. E. B. et al. (2025). The *Calicophoron daubneyi* genome provides new insight into mechanisms of feeding, eggshell synthesis and parasite-microbe interactions. *BMC Biology* 23, 11.

Coffin, J. M. und Fan, H. (2016). The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annual Review of Virology* 3, 29-51.

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X. et al. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 17, 13.

Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561-563.

Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 12, 138-63.

Cwiklinski, K., Dalton, J. P., Dufresne, P. J., La Course, J., Williams, D. J., Hodgkinson, J. und Paterson, S. (2015). The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biology* 16, 71.

Cwiklinski, K., Robinson, M. W., Donnelly, S. und Dalton, J. P. (2021). Complementary transcriptomic and proteomic analyses reveal the cellular and molecular processes that drive growth and development of *Fasciola hepatica* in the host liver. *BMC Genomics* 22, 46.

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M. et al. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience* 10, 1-4.

Dar, Y., Rondelaud, D., Vignoles, P. und Dreyfuss, G. (2015). *Pseudosuccinea columella*: age resistance to *Calicophoron daubneyi* infection in two snail populations. *Parasite* 22, 6.

Davies, R. W. (1984). Active RNA: RNA enzymes in RNA splicing and processing: Review. *Bioscience Reports* 4, 707-727.

Del Giacco, L. und Cattaneo, C. (2012). "Introduction to Genomics". In: *Molecular Profiling: Methods and Protocols*, S. 79-88. Totowa, New Jersey: Humana Press.

Deplazes, P., Joachim, A., Mathis, A., Strube, C., Taubert, A., von Samson-Himmelstjerna, G. und Zahner, H. (2020). In: *Parasitologie für die Tiermedizin, 4. überarbeitete Auflage*. S. 166-87, 542-77. ednStuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Deschamps, S., Mudge, J., Cameron, C., Ramaraj, T., Anand, A., Fengler, K., Hayes, K., Llaca, V., Jones, T. J. und May, G. (2016). Characterization, correction and de novo assembly of an Oxford Nanopore genomic dataset from *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientific Reports* 6, 28625.

Devos, J., Vassiloglou, B., Amenna-Bernard, N. und Marcotty, T. (2013). Paramphistomosis in sheep; Natural infection of lambs by *Calicophoron daubneyi*. *Revue de médecine vétérinaire* 11, 528-535.

Dinnik, J. A. (1962). *Paramphistomum daubneyi* sp.nov. from cattle and its snail host in the Kenya Highlands. *Parasitology* 52, 143-151.

Doyle, S. R. (2022). Improving helminth genome resources in the post-genomic era. *Trends in Parasitology* 38, 831-840.

Dreyfus, M. und Régnier, P. (2002). The Poly(A) Tail of mRNAs: Bodyguard in Eukaryotes, Scavenger in Bacteria. *Cell* 111, 611-613.

Dreyfuss, G., Vignoles, P. und Rondelaud, D. (2014). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: decrease in prevalence of natural infection in habitats colonized by *Galba truncatula* and *Lymnaea glabra*. *Revue de médecine vétérinaire* 165(5), 160-166.

Dyshlovoy, S. A., Paigin, S., Afflerbach, A.-K., Lobermeyer, A., Werner, S., Schüller, U., Bokemeyer, C., Schuh, A. H., Bergmann, L., von Amsberg, G. et al. (2024). Applications of Nanopore sequencing in precision cancer medicine. *International Journal of Cancer*, 1-12.

Elbert, V. K. (2024). Etablierung der Zucht von *Galba truncatula* unter Laborbedingungen zur Erforschung des Lebenszyklus von *Calicophoron daubneyi* im Zwischenwirt. Diss. med. vet.: Ludwig-Maximilian-Universität München.

Fenemore, C., Floyd, T. und Mitchell, S. (2021). Rumen Fluke in Great Britain. *Journal of Comparative Pathology* 184, 31-36.

Ferreras, M. C., González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A. M., Delgado, L. et al. (2014). *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). *Veterinary Parasitology* 199, 268-271.

Field, M. C. (2022). Molecular Cellular Parasitology: The Decades and Challenges Ahead. *Frontiers in Parasitology* 1, 963515.

Forstmaier, T., Knubben-Schweizer, G., Strube, C., Zablotski, Y. und Wenzel, C. (2021). Rumen (*Calicophoron/Paramphistomum spp.*) and Liver Flukes (*Fasciola hepatica*) in Cattle-Prevalence, Distribution, and Impact of Management Factors in Germany. *Animals (Basel)* 11, 2727.

Foster, A. P., Otter, A., O'Sullivan, T., Cranwell, M. P., Twomey, D. F., Millar, M. F. und Taylor, M. A. (2008). Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. *Veterinary Record* 162, 528.

Fuertes, M., Pérez, V., Benavides, J., González-Lanza, M. C., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, F. J., Fernández, M., Manga-González, M. Y. und Ferreras, M. C. (2015). Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. *Veterinary Parasitology* 209, 188-196.

García-Dios, D., Díaz, P., Remesar, S., Viña, M., Martínez-Calabuig, N., Saldaña, A., Díez-Baños, P., Panadero, R., Morrondo, P. und López, C. M. (2024). Prevalence, risk factors and molecular identification of paramphistomid species in sheep from a Spanish endemic area. *Irish Veterinary Journal* 77, 21.

García-Dios, D., Díaz, P., Viña, M., Remesar, S., Prieto, A., López-Lorenzo, G., Cao, J. M., Panadero, R., Díez-Baños, P. und López, C. M. (2020). Efficacy of Oxyclozanide and Closantel against Rumen Flukes (*Paramphistomidae*) in Naturally Infected Sheep. *Animals* 10, 1943.

González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J. A., Martínez-Ibeas, A. M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y. und Mezo, M. (2013). Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology* 191, 252-263.

Gordon, D. K., Roberts, L. C. P., Lean, N., Zadoks, R. N., Sargison, N. D. und Skuce, P. J. (2013). Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Veterinary Parasitology* 195, 65-71.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q. et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29, 644-652.

Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. und Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. und Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072-5.

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M. et al. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8, 1494-512.

Haas, W. (2003). Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology* 106, 349-364.

Haçarız, O., Akgün, M., Kavak, P., Yüksel, B. und Sağiroğlu, M. (2015). Comparative transcriptome profiling approach to glean virulence and immunomodulation-related genes of *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* 16, 366.

Haque, A., Engel, J., Teichmann, S. A. und Lönnberg, T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Medicine* 9, 75.

Hecker, A. S., Raulf, M. K., König, S., Knubben-Schweizer, G., Wenzel, C., May, K. und Strube, C. (2024). In-herd prevalence of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron / Paramphistomum spp.* infections in German dairy cows with comparison of two coproscopical methods and establishment of real-time pyrosequencing for rumen fluke species differentiation. *Veterinary Parasitology* 327, 110142.

Howe, K. L., Bolt, B. J., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., Done, J., Down, T., Gao, S., Grove, C. et al. (2015). WormBase 2016: expanding to enable helminth genomic research. *Nucleic Acids Research* 44, D774-D780.

Howe, K. L., Bolt, B. J., Shafie, M., Kersey, P. und Berriman, M. (2017). WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Molecular and Biochemical Parasitology* 215, 2-10.

Hu, J., Wang, Z., Sun, Z., Hu, B., Ayoola, A. O., Liang, F., Li, J., Sandoval, J. R., Cooper, D. N., Ye, K. et al. (2024). NextDenovo: an efficient error correction and accurate assembly tool for noisy long reads. *Genome Biology* 25, 107.

Huang, Y., Chen, W., Wang, X., Liu, H., Chen, Y., Guo, L., Luo, F., Sun, J., Mao, Q., Liang, P. et al. (2013). The carcinogenic liver fluke, *Clonorchis sinensis*: new assembly, reannotation and analysis of the genome and characterization of tissue transcriptomes. *PLOS One* 8, e54732.

Huson, K., Morphew, R., Winters, A., Cookson, A., Hauck, B. und Brophy, P. (2021a). In vitro screening as an anthelmintic discovery pipeline for *Calicophoron daubneyi*: nutritive media and rumen environment-based approaches. *Parasitology Research* 120, 1-12.

Huson, K. M., Atcheson, E., Oliver, N. A. M., Best, P., Barley, J. P., Hanna, R. E. B., McNeilly, T. N., Fang, Y., Haldenby, S., Paterson, S. et al. (2021b). Transcriptome and Secretome Analysis of Intra-Mammalian Life-Stages of *Calicophoron daubneyi* Reveals Adaptation to a Unique Host Environment. *Molecular & Cellular Proteomics* 20, 100055.

Huson, K. M., Morphew, R. M., Allen, N. R., Hegarty, M. J., Worgan, H. J., Girdwood, S. E., Jones, E. L., Phillips, H. C., Vickers, M., Swain, M. et al. (2018). Polyomic tools for an emerging livestock parasite, the rumen fluke *Calicophoron daubneyi*; identifying shifts in rumen functionality. *Parasites & Vectors* 11, 617.

Huson, K. M., Oliver, N. A. M. und Robinson, M. W. (2017). Paramphistomosis of Ruminants: An Emerging Parasitic Disease in Europe. *Trends in Parasitology* 33, 836-844.

Iglesias-Piñeiro, J., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., Córdoba, M., González-Lanza, C., Manga-González, Y. und Mezo, M. (2016). Transmission of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in Galicia (Spain): Temporal follow-up in the intermediate and definitive hosts. *Parasites & Vectors* 9, 610.

Ilgová, J., Vorel, J., Roudnický, P., Škorpíková, L., Horn, M. und Kašný, M. (2022). Transcriptomic and proteomic profiling of peptidase expression in *Fasciola hepatica* eggs developing at host's body temperature. *Scientific Reports* 12, 10308.

International Human Genome Sequencing, C. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.

Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J. R., Beggs, A. D., Dilthey, A. T., Fiddes, I. T. et al. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology* 36, 338-345.

Jimenez, V., Miranda, K. und Augusto, I. (2022). The old and the new about the contractile vacuole of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 69, e12939.

Jones, M. K., McManus, D. P., Sivadorai, P., Glanfield, A., Moertel, L., Belli, S. I. und Gobert, G. N. (2007). Tracking the fate of iron in early development of human blood flukes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1646-1658.

Jones, R. A., Brophy, P. M., Mitchell, E. S. und Williams, H. W. (2017a). Rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) on Welsh farms: prevalence, risk factors and observations on co-infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 144, 237-247.

Jones, R. A., Williams, H. W., Dalesman, S., Ayodeji, S., Thomas, R. K. und Brophy, P. M. (2017b). The prevalence and development of digenean parasites within their intermediate snail host, *Galba truncatula*, in a geographic area where the presence of *Calicophoron daubneyi* has recently been confirmed. *Veterinary Parasitology* 240, 68-74.

Jones, R. A., Williams, H. W., Dalesman, S. und Brophy, P. M. (2015). Confirmation of *Galba truncatula* as an intermediate host snail for *Calicophoron daubneyi* in Great Britain, with evidence of alternative snail species hosting *Fasciola hepatica*. *Parasites & Vectors* 8, 656.

Kahl, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J. und Ganter, M. (2021). Chronic Wasting Due to Liver and Rumen Flukes in Sheep. *Animals* 11, 549.

Karl, S., Gutiérrez, L., Lucyk-Maurer, R., Kerr, R., Candido, R. R. F., Toh, S. Q., Saunders, M., Shaw, J. A., Suvorova, A., Hofmann, A. et al. (2013). The Iron Distribution and Magnetic Properties of Schistosome Eggshells: Implications for Improved Diagnostics. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7, e2219.

Knubben-Schweizer, G., Rüegg, S., Torgerson, P. R., Rapsch, C., Grimm, F., Hässig, M., Deplazes, P. und Braun, U. (2010). Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. *The Veterinary Journal* 186, 188-91.

Knubben-Schweizer, G. und Torgerson, P. R. (2015). Bovine fasciolosis: Control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. *Veterinary Parasitology* 208, 77-83.

Küchler, A. M. (2021). Untersuchung möglicher Zwischenwirte von *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica* mittels Multiplex-PCR. Diss. med. vet.: Ludwig-Maximilian-Universität München.

Kukurba, K. R. und Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor Protocols* 2015, 951-69.

Kumar, V. (1999). In: *Trematode Infections and Diseases of Man and Animals*. S. 300-5. Luxemburg: Springer Science & Business Media.

Langmead, B. und Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357-359.

Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 34, 3094-3100.

Li, H. und Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-60.

Liu, G.-H., Xu, M.-J., Song, H.-Q., Wang, C.-R. und Zhu, X.-Q. (2016a). De novo assembly and characterization of the transcriptome of the pancreatic fluke *Eurytrema pancreaticum* (trematoda: *Dicrocoeliidae*) using Illumina paired-end sequencing. *Gene* 576, 333-338.

Liu, G. H., Xu, M. J., Chang, Q. C., Gao, J. F., Wang, C. R. und Zhu, X. Q. (2016b). De novo transcriptomic analysis of the female and male adults of the blood fluke *Schistosoma turkestanicum*. *Parasites & Vectors* 9, 143.

Loman, N. J., Quick, J. und Simpson, J. T. (2015). A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nature Methods* 12, 733-5.

Lotfy, W. M., Brant, S. V., Ashmawy, K. I., Devkota, R., Mkoji, G. M. und Loker, E. S. (2010). A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Veterinary Parasitology* 174, 234-240.

Love, M. I., Huber, W. und Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550.

Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S. und Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology* 13, e1005457.

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A. und Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking* 14, 264-70.

Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J. M., Rondelaud, D. und Dreyfuss, G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary Research* 33, 439-47.

Mahmoud, M., Huang, Y., Garimella, K., Audano, P. A., Wan, W., Prasad, N., Handsaker, R. E., Hall, S., Pionzio, A., Schatz, M. C. et al. (2024). Utility of long-read sequencing for All of Us. *Nature Communications* 15, 837.

Malrait, K., Verschave, S., Skuce, P., Van Loo, H., Vercruyse, J. und Charlier, J. (2015). Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) in cattle. *Veterinary Parasitology* 207, 134-139.

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9, 387-402.

Martínez-Ibeas, A. M., González-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J. A., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ferreras, C., Mezo, M. und Manga-González, M. Y. (2013). Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Veterinary Parasitology* 195, 57-64.

Martinez-Ibeas, A. M., Munita, M. P., Lawlor, K., Sekiya, M., Mulcahy, G. und Sayers, R. (2016). Rumen fluke in Irish sheep: prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species. *BMC Veterinary Research* 12, 143.

Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I. und Rodger, C. (2012). Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. *Veterinary Record* 170, 343-4.

Mattick, J. S. und Makunin, I. V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Human Molecular Genetics* 14, R121-32.

Mattick, J. S. und Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics* 15, R17-29.

Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 560-4.

May, K., Brügemann, K., König, S. und Strube, C. (2019). Patent infections with *Fasciola hepatica* and paramphistomes (*Calicophoron daubneyi*) in dairy cows and association of fasciolosis with individual milk production and fertility parameters. *Veterinary Parasitology* 267, 32-41.

May, K., Hecker, A. S., Strube, C., Yin, T. und König, S. (2025). Genetic parameters and single-step genome-wide association analysis for trematode (*Fasciola hepatica* and *Calicophoron/Paramphistomum* spp.) infections in German dairy cows. *Infection, Genetics and Evolution* 128, 105712.

McClure, R. S., Rericha, Y., Waters, K. M. und Tanguay, R. L. (2023). 3' RNA-seq is superior to standard RNA-seq in cases of sparse data but inferior at identifying toxicity pathways in a model organism. *Frontiers in Bioinformatics* 3, 1234218.

McNulty, S. N., Tort, J. F., Rinaldi, G., Fischer, K., Rosa, B. A., Smircich, P., Fontenla, S., Choi, Y.-J., Tyagi, R., Hallsworth-Pepin, K. et al. (2017). Genomes of *Fasciola hepatica* from the Americas Reveal Colonization with *Neorickettsia* Endobacteria Related to the Agents of Potomac Horse and Human Sennetsu Fevers. *PLOS genetics* 13(1), e1006537.

Millar, M., Foster, A., Mitchell, G., Skuce, P. und Wessels, J. (2017). Rumen fluke in South American camelids in Great Britain. *The Veterinary Record* 181, 123.

Milward, E. A., Shahandeh, A., Heidari, M., Johnstone, D. M., Daneshi, N. und Hondermarck, H. (2016). "Transcriptomics". In: *Encyclopedia of Cell Biology, Volume 4*. S. 160-165. Amsterdam: Elsevier

Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, Gustavo A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J. et al. (2020). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research* 49, D412-D419.

Mooers, A. Ø. und Holmes, E. C. (2000). The evolution of base composition and phylogenetic inference. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 365-369.

Morariu, S., Sîrbu, C. B., Tóth, A. G., Dărăbuș, G., Oprescu, I., Mederle, N., Ilie, M. S., Imre, M., Sîrbu, B. A.-M., Solymosi, N. et al. (2023). First Molecular Identification of *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) and *Paramphistomum leydeni* (Nasmark, 1937) in Wild Ruminants from Romania. *Veterinary Sciences* 10, 603.

Moxon, J. V., Flynn, R. J., Golden, O., Hamilton, J. V., Mulcahy, G. und Brophy, P. M. (2010). Immune responses directed at egg proteins during experimental infection with the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunology* 32, 111-124.

Müller, L. S. M., Cosentino, R. O., Förstner, K. U., Guizetti, J., Wedel, C., Kaplan, N., Janzen, C. J., Arampatzi, P., Vogel, J., Steinbiss, S. et al. (2018). Genome organization and DNA accessibility control antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 563, 121-125.

Niedringhaus, T. P., Milanova, D., Kerby, M. B., Snyder, M. P. und Barron, A. E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Analytical Chemistry* 83, 4327-41.

O'Shaughnessy, J., Casey, M., Fagan, S., Fagan, J., Garcia-Campos, A., Good, B., McAloon, C. G., McElroy, M., Mulcahy, G., Murphy, D. et al. (2018). Epidemiological investigation of a severe rumen fluke outbreak on an Irish dairy farm. *Parasitology* 145, 948-952.

O'Toole, A., Browne, J. A., Hogan, S., Bassière, T., DeWaal, T., Mulcahy, G. und Zintl, A. (2014). Identity of rumen fluke in deer. *Parasitology Research* 113, 4097-4103.

Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H. et al. (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* 420, 563-73.

Ozsolak, F. und Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics* 12, 87-98.

Pandey, T., Ghosh, A., Todur, V. N., Rajendran, V., Kalita, P., Kalita, J., Shukla, R., Chetri, P. B., Shukla, H., Sonkar, A. et al. (2020). Draft Genome of the Liver Fluke *Fasciola gigantica*. *ACS Omega* 5, 11084-11091.

Paraud, C., Gaudin, C., Pors, I. und Chartier, C. (2009). Efficacy of oxcyclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. *The Veterinary Journal* 180, 265-267.

Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. und Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* 14, 417-419.

Piétu, G., Mariage-Samson, R., Fayein, N.-A., Matingou, C., Eveno, E., Houlgatte, R., Decraene, C., Vandenbrouck, Y., Tahi, F., Devignes, M.-D. et al. (1999). The Genexpress IMAGE Knowledge Base of the Human Brain Transcriptome: A Prototype Integrated Resource for Functional and Computational Genomics. *Genome Research* 9, 195-209.

Ploeger, H. W., Ankum, L., Moll, L., van Doorn, D. C. K., Mitchell, G., Skuce, P. J., Zadoks, R. N. und Holzhauer, M. (2017). Presence and species identity of rumen flukes in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 243, 42-46.

Porter, M. E. und Sale, W. S. (2000). The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *Journal of Cell Biology* 151, F37-42.

Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., Lopez, R. und Finn, R. D. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46, W200-W204.

Ramírez, F., Ryan, D. P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A. S., Heyne, S., Dündar, F. und Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* 44, W160-W165.

Reuter, Jason A., Spacek, D. V. und Snyder, Michael P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell* 58, 586-597.

Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. und Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29, 24-26.

Robinson, M. W., Menon, R., Donnelly, S. M., Dalton, J. P. und Ranganathan, S. (2009). An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular & Cellular Proteomics* 8, 1891-907.

Rolfe, P. F., Boray, J. C., Nichols, P. und Collins, G. H. (1991). Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *International Journal for Parasitology* 21, 813-819.

Rondelaud, D., Vignoles, P. und Dreyfuss, G. (2004). *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally infected *Galba truncatula*. *Parasitology Research* 94, 183-7.

Rondelaud, D., Vignoles, P. und Dreyfuss, G. (2007). Parasite development and visceral pathology in *Galba truncatula* co-infected with *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*. *Journal of Helminthology* 81, 317-22.

Rondelaud, D., Vignoles, P. und Dreyfuss, G. (2016). Larval trematode infections in *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) from the Brenne Regional Natural Park, central France. *Journal of Helminthology* 90, 256-61.

Rondelaud, D., Vignoles, P. und Dreyfuss, G. (2022). Changes in the Populations of Two *Lymnaeidae* and Their Infection by *Fasciola hepatica* and/or *Calicophoron daubneyi* over the Past 30 Years in Central France. *Animals (Basel)* 12, 3566.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-7.

Sargison, N., Francis, E., Davison, C., Bronsvort, B. M., Handel, I. und Mazeri, S. (2016). Observations on the biology, epidemiology and economic relevance of rumen flukes (*Paramphistomidae*) in cattle kept in a temperate environment. *Veterinary Parasitology* 219, 7-16.

Sargison, N. D., Shahzad, K., Mazeri, S. und Chaudhry, U. (2019). A high throughput deep amplicon sequencing method to show the emergence and spread of *Calicophoron daubneyi* rumen fluke infection in United Kingdom cattle herds. *Veterinary Parasitology* 268, 9-15.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. und Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. und Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7, 3.

Schweizer, G., Meli, M. L., Torgerson, P. R., Lutz, H., Deplazes, P. und Braun, U. (2007). Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Veterinary Parasitology* 150, 164-9.

Sey, O. (1977). Life-cycle and geographical distribution of *Paramphistomum daubneyi* Dinnik, 1962 (*Trematoda: Paramphistomata*). *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 27, 115-30.

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. und Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31, 3210-3212.

Skuce, P. J., Morgan, E. R., van Dijk, J. und Mitchell, M. (2013). Animal health aspects of adaptation to climate change: beating the heat and parasites in a warming Europe. *Animal* 7(2), 333-45.

Stitt, A. W. und Fairweather, I. (1990). Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (*Trematoda: Digenea*). *Parasitology* 101(3), 395-407.

Suleiman, A. A., Al-Chalabi, R. und Shaban, S. A. (2024). Integrative role of small non-coding RNAs in viral immune response: a systematic review. *Molecular Biology Reports* 51, 107.

Suzuki, S., Horinouchi, T. und Furusawa, C. (2014). Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nature Communications* 5, 5792.

Teschner, V., Zablotski, Y., Knubben-Schweizer, G., Bootz, F., Strube, C. und Wenzel, C. (2025). Impact of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* on milk production parameters, β -hydroxybutyrate, fertility and feces consistency in southern German dairy cows. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 101200.

The Gene Ontology Consortium Aleksander, S. A. Balhoff, J. Carbon, S. Cherry, J. M. Drabkin, H. J. Ebert, D. Feuermann, M. Gaudet, P. Harris, N. L. et al. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics* 224(1), iyad031.

Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P. und Mi, H. (2022). PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *The Protein Society* 31, 8-22.

van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D. und Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics* 34, 666-681.

VanInsberghe, M., van den Berg, J., Andersson-Rolf, A., Clevers, H. und van Oudenaarden, A. (2021). Single-cell Ribo-seq reveals cell cycle-dependent translational pausing. *Nature* 597, 561-565.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M. A., Bassett, D. E., Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1997). Characterization of the Yeast Transcriptome. *Cell* 88, 243-251.

Venter, J. C. Adams, M. D. Myers, E. W. Li, P. W. Mural, R. J. Sutton, G. G. Smith, H. O. Yandell, M. Evans, C. A. Holt, R. A. et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* 291, 1304-1351.

Wang, T., Zhao, M., Rotgans, B. A., Strong, A., Liang, D., Ni, G., Limpanont, Y., Ramasoota, P., McManus, D. P. und Cummins, S. F. (2016). Proteomic Analysis of the *Schistosoma mansoni* Miracidium. *PLOS One* 11, e0147247.

Wang, Z., Gerstein, M. und Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics.* 10, 57-63.

Watson, J. D. und Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737-738.

Wellcome Sanger Institute. (2025). "50 Helminth Genomes Project (50HGP)": *Wellcome Sanger Institute*. <https://www.sanger.ac.uk/collaboration/50hgp/#about>. Zugriff am 27. Februar 2025

Wenzel, C., Elbert, V. K., Haug, S., Voigt, K., Weber, F., Balasopoulou, V., Roden, E., Zablotski, Y., Meissner, M. und Knubben-Schweizer, G. (2025). Establishment of the complete life cycle of *Calicophoron daubneyi* under experimental conditions. *Veterinary Parasitology* 334, 110391.

Wenzel, C., K uchler, A., Strube, C. und Knubben-Schweizer, G. (2019). Paramphistomidose – eine Übersicht zu Epidemiologie und klinischer Symptomatik. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere/Nutztiere* 47, 184-191.

Wiedermann, S., Harl, J., Fuehrer, H. P., Mayr, S., Schmid, J., Hinney, B. und Rehbein, S. (2021). DNA barcoding of rumen flukes (*Paramphistomidae*) from bovines in Germany and Austria. *Parasitology Research* 120, 4061-4066.

Winnebeck, E. C., Millar, C. D. und Warman, G. R. (2010). Why does insect RNA look degraded? *Journal of Insect Science* 10, 159.

Wolf, J., Lapp, T., Reinhard, T., Agostini, H., Schlunck, G. und Lange, C. (2022). Webbasierte Genexpressionsanalysen – auf dem Weg zur molekularen Entschlüsselung gesunder und erkrankter Augengewebe. *Die Ophthalmologie* 119, 929-936.

Wolf, J. B. W. (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources* 13, 559-572.

Wood, D. E., Lu, J. und Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20, 257.

Wu, H.-J., Wang, A. H. J. und Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 93-101.

Yan, H. B., Wang, X. Y., Lou, Z. Z., Li, L., Blair, D., Yin, H., Cai, J. Z., Dai, X. L., Lei, M. T., Zhu, X. Q. et al. (2013). The mitochondrial genome of *Paramphistomum cervi* (Digenea), the first representative for the family *Paramphistomidae*. *PLOS One* 8, e71300.

Yang, X., Zhao, Y., Wang, L., Feng, H., Tan, L., Lei, W., Zhao, P., Hu, M. und Fang, R. (2015). Analysis of the complete *Fischoederius elongatus* (*Paramphistomidae*, *Trematoda*) mitochondrial genome. *Parasites & Vectors* 8, 279.

Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K. und Oshlack, A. (2010a). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology* 11, R14.

Young, N. D., Hall, R. S., Jex, A. R., Cantacessi, C. und Gasser, R. B. (2010b). Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* — A key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnology Advances* 28, 222-231.

Young, N. D., Nagarajan, N., Lin, S. J., Korhonen, P. K., Jex, A. R., Hall, R. S., Safavi-Hemami, H., Kaewkong, W., Bertrand, D., Gao, S. et al. (2014). The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. *Nature Communications* 5, 4378.

Young, N. D., Stroehlein, A. J., Kinkar, L., Wang, T., Sohn, W.-M., Chang, B. C. H., Kaur, P., Weisz, D., Dudchenko, O., Aiden, E. L. et al. (2021). High-quality reference genome for *Clonorchis sinensis*. *Genomics* 113, 1605-1615.

Yuan, L., Yingjia, S., Wesley, W. und Ronald, W. (2016). "Next Generation Sequencing in Aquatic Models". In: *Next Generation Sequencing*. S. 61-79. Rijeka: IntechOpen.

Zhang, X.-X., Cong, W., Elsheikha, H. M., Liu, G.-H., Ma, J.-G., Huang, W.-Y., Zhao, Q. und Zhu, X.-Q. (2017). De novo transcriptome sequencing and analysis of the juvenile and adult stages of *Fasciola gigantica*. *Infection, Genetics and Evolution* 51, 33-40.

Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z. und Shen, F. (2019a). Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 5573.

Zhang, X. X., Cwiklinski, K., Hu, R. S., Zheng, W. B., Sheng, Z. A., Zhang, F. K., Elsheikha, H. M., Dalton, J. P. und Zhu, X. Q. (2019b). Complex and dynamic transcriptional changes allow the helminth *Fasciola gigantica* to adjust to its intermediate snail and definitive mammalian hosts. *BMC Genomics* 20, 729.

Zhou, Y., Zheng, H., Chen, Y., Zhang, L., Wang, K., Guo, J., Huang, Z., Zhang, B., Huang, W., Jin, K. et al. (2009). The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. *Nature* 460, 345-351.

Zintl, A., Garcia-Campos, A., Trudgett, A., Chryssafidis, A. L., Talavera-Arce, S., Fu, Y., Egan, S., Lawlor, A., Negredo, C., Brennan, G. et al. (2014). Bovine paramphistomes in Ireland. *Veterinary Parasitology* 204, 199-208.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schneckengehäuse von G. truncatula</i>	7
<i>Abbildung 2: Untersuchung eines frisch geschlachteten, mit C. daubneyi infizierten Rindes: a) an den Pansenzotten anhaftende, adulte Panseneigel, b) am Netzmagen anhaftende, adulte Panseneigel</i>	9
<i>Abbildung 3: Prinzip der Illumina-Sequencing-by-Synthesis Methode, übernommen aus Yuan (2016): Adaptoren werden an die DNA-Fragmente gebunden. Die Fragmente binden an Primer auf einer Fließzelle, wo sie per Brücken-PCR zu Clustern amplifiziert werden. Während jedes Sequenzierzyklus wird ein Fluorophor-markiertes Nukleotid an die wachsenden Stränge eingebaut. Diese können per Laser angeregt und deren Signale optisch erfasst werden.</i>	14
<i>Abbildung 4: Prinzip des Nanopore-Sequencing, übernommen aus Chen und Xu (2023): Unter Spannung bewegen sich negativ geladene DNA- oder RNA-Stränge durch in einer Biomembran eingebettete Nanoporen. Motorproteine spalten zuvor die Doppelstränge auf und steuern die Geschwindigkeit. Jede Base erzeugt spezifische elektronische Stromänderungen, welche abgelesen und durch Algorithmen erkannt werden.</i>	15
<i>Abbildung 5: Übersicht verschiedener RNA-Typen und deren Funktionen, modifiziert nach Suleiman et. al (2024)</i>	19
<i>Abbildung 6: Vereinfachte grafische Darstellung des Weges vom Gen zum Protein, modifiziert nach Wolf et al. (2022): Die DNA wird mittels Transkription in RNA umgeschrieben, welche als Vorlage für die Proteinherstellung (Translation) dient oder regulatorische Funktionen während dieses Prozesses ausübt. Die Gesamtheit aller Gene, RNA und Proteine wird Genom, Transkriptom und Proteom genannt.</i>	20
<i>Abbildung 7: Adulte, lebende Panseneigel in NaCl 0,9 %</i>	29
<i>Abbildung 8: Mikroskopische Kontrolle frisch ausgeschiedener Pansenegeleier in NaCl 0,9 %</i>	31
<i>Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Eistadien C. daubneyis:</i>	48
<i>Abbildung 10: Stadien C. daubneyis im Zwischenwirt während der Sektion: Redie (1, 2), unreife Zerkarie (3), ausgereifte, schwimmfähige Zerkarien (4), Stadien (aus 1 - 4) durchmischt unmittelbar nach Eröffnung der Schnecke nach Tag 55 p. i. (5), vollständig enzystierte Metazerkarien (6)</i>	49
<i>Abbildung 11: Virtuelles Elektrophoresegel der PCR zur Speziesbestätigung der untersuchten Proben: Bande A1 (L): Leiter, Bande B1: Negativkontrolle ohne Signal, Banden C1 (Positivkontrolle), D1 (Pansenegeleier), E1 (Redien und Zerkarien) und F1</i>	

(mit Pansenegelelmirazidien infizierte Schnecke) mit positivem Signal für <i>C. daubneyi</i> -DNA	50
Abbildung 12: Ausgewählte Bildausschnitte des Dotplots (erstellt von Dr. M. Schmidt) zum Vergleich des nordirischen (Clancy et. al, 2025) und deutschen Genomentwurfes; a) parallele Linie zur Diagonalen, b) obere rechte Ecke der Diagonalen mit Unterbrechung dieser, c) Punktgruppe außerhalb der Diagonalen.....	58
Abbildung 13: Übersichtsbildausschnitt des Punktediagramms (Dotplot, linke untere Ecke) zum Vergleich des deutschen (links, Y-Achse) und nordirischen (unten, X-Achse; Clancy et. al, 2025) Genoms mit Darstellung der Diagonalen (erstellt von Dr. M. Schmidt)	59
Abbildung 14: Quantitative Transkriptverteilung der untersuchten <i>C. daubneyi</i> Entwicklungsstadien, unterteilt in „stadienspezifische“ (orange) und „über alle Stadien hinweg“ exprimierte (blau) Transkripte (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)	61
Abbildung 15: (fortgesetzt): MA-Plots zur vergleichenden Darstellung der differentiellen Genexpression, $FDR \leq 0,05$; a) T0 vs. T7, b) T0 vs. T14, c) T0 vs. Zerkarien, d) T7 vs. Zerkarien, e) T14 vs. T7, f) T14 vs. Zerkarien, g) Redien vs. T0, h) Redien vs. T7, i) Redien vs. T14, j) Redien vs. Zerkarien (erstellt von Dr. Raúl Cosentino).....	64
Abbildung 16: (fortgesetzt): Volcano-Plots zur Visualisierung der vergleichenden differentiellen Genexpression, $FDR \leq 0,05$; a) T14 vs. T7, b) T14 vs. Zerkarien, c) Redien vs. T0, d) Redien vs. T7, e) Redien vs. T14 und f) Redien vs. Zerkarien, g) T0 vs. T7, h) T0 vs. T14, i) T0 vs. Zerkarien und j) T7 vs. Zerkarien (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)	67
Abbildung 17: IGV-Screenshot der <i>C. daubneyi</i> Coverage-Tracks, Scaffold 1, in der Region um 8.700 kb bis 8.720 kb	69
Abbildung 18: IGV-Screenshot der <i>C. daubneyi</i> Coverage-Tracks, Scaffold 1, in der Region um 6.040 kb bis 6.050 kb	69
Abbildung 19: IGV-Screenshot der <i>C. daubneyi</i> Coverage-Tracks, Scaffold 1, in der Region um 160 kb.....	70
Abbildung 20: HeatMap zur Visualisierung der Korrelation der untersuchten <i>C. daubneyi</i> Replikate auf Basis der 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)	71
Abbildung 21: HeatMap zur Visualisierung der Korrelation der untersuchten <i>C. daubneyi</i> Transkripte auf Basis der 1000 Gene mit der höchsten differentiellen Expression (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)	72
Abbildung 22 (fortgesetzt): Grafische Darstellung der Subcluster 1 - 3, 5 - 8, 10 und 15 (erstellt von Dr. Raúl Cosentino). X-Achse: logarithmierter, medianzentrierter FPKM-Wert, entspricht der Änderung der Genexpression. Y-Achse: Replikate der untersuchten Gruppen (Redien, Zerkarien, Eier Gruppe T14, T0, T7).	74
Abbildung 23: Anzahl und funktionelle Verteilung in Biological Process (BP), Molecular	

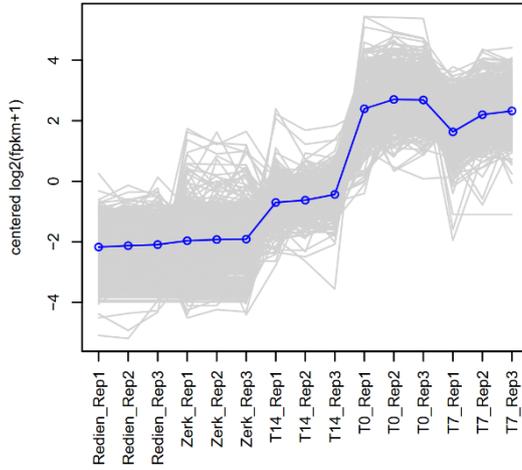
<i>Function (MF) und Cellular Component (CC) der enriched GO-Terms aller 16 Subcluster (P_30).....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 24: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 1 (Eier T0/T7), p-Wert < 0,05; FDR-Wert < 0,05.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 25: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 2 (Eier T14), p-Wert < 0,038; FDR-Wert < 0,99.....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 26: Prozentuale Verteilung aller GO-Terms aus Subcluster 5 und 6 (Eier gesamt), p-Wert < 0,05; FDR-Wert < 0,99.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 27: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 7 (Redien), p-Wert < 0,05; FDR-Wert < 0,05.....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 28: Prozentuale Verteilung relevanter GO-Terms aus Subcluster 3 (Zerkarien), p-Wert < 0,05; FDR-Wert < 0,05.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 29 (fortgesetzt): Grafische Darstellung der Subcluster 4, 9, 11 - 14 und 16 (erstellt von Dr. Raúl Cosentino).....</i>	<i>140</i>

2. Tabellenverzeichnis

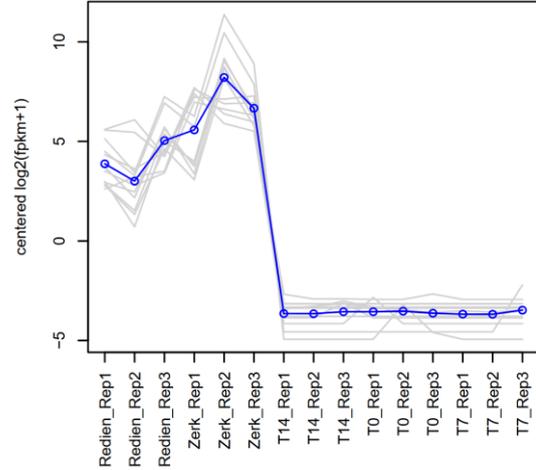
<i>Tabelle 1: Temperaturprotokoll der PCR</i>	35
<i>Tabelle 2: Detailübersicht der zwei Nanopore-Sequenzierungsruns auf der PromethION 24 Plattform (ONT)</i>	38
<i>Tabelle 3: Verwendete bioinformatische Tools zur Erstverarbeitung der RNA-Seq-Daten</i>	43
<i>Tabelle 4: Anzahl gewonnener Pansenegleier aus adulten Egeln zu unterschiedlichen Sammlungs-Zeitpunkten</i>	47
<i>Tabelle 5: Ergebnisse der Nanodrop-Kontrollmessungen bei λ 260 nm; Messungen 1 - 3 erfolgten nach erster 60-minütiger Inkubation bei 37 °C, Messungen 4 - 6 erfolgten nach weiterer Inkubation für 24 h bei Raumtemperatur und erneuter 60-minütiger Inkubation bei 37 °C.</i>	51
<i>Tabelle 6: RINe-Werte und RNA-Konzentrationen der extrahierten C. daubneyi RNA (Tape Station 4150, High Sensitivity RNA ScreenTape®)</i>	52
<i>Tabelle 7: Übersicht über Kontrollwerte, verwendete Adaptersequenzen und Sequenzierungsergebnisse während der Erstellung der Sequenzierungsbibliotheken und der RNA-Sequenzierung (Fortsetzung auf nächster Seite)</i>	54
<i>Tabelle 8: Allgemeine Angaben zum ersten deutschen Genomentwurf C. daubneyis</i>	56
<i>Tabelle 9: Assemblierungs-Statistiken des ersten deutschen Genomentwurfes C. daubneyis vor und nach dem Scaffolding im Vergleich zum nordirischen Genomentwurf (Clancy et al., 2025)</i>	57
<i>Tabelle 10: Subcluster P_30: Übersicht Anzahl zugehöriger Transkripte und identifizierter enriched/depleted GO-Terms</i>	76

3. Abbildungen des Anhangs

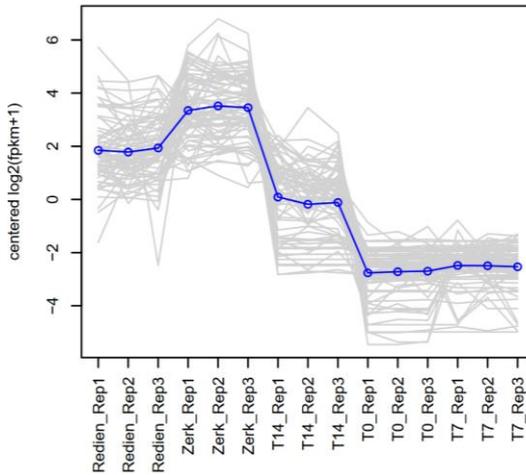
subcluster_4_log2_medianCentered_fpkm.matrix, 462



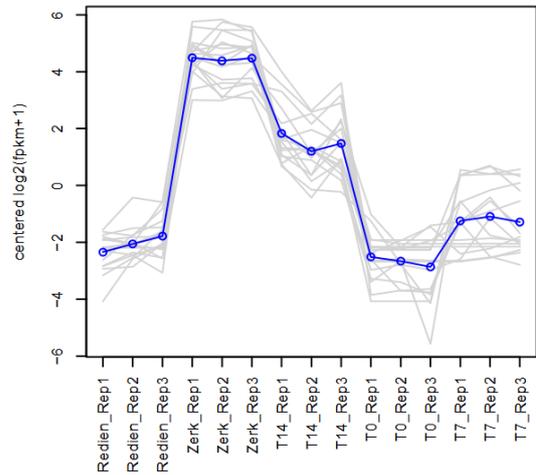
subcluster_9_log2_medianCentered_fpkm.matrix, 12



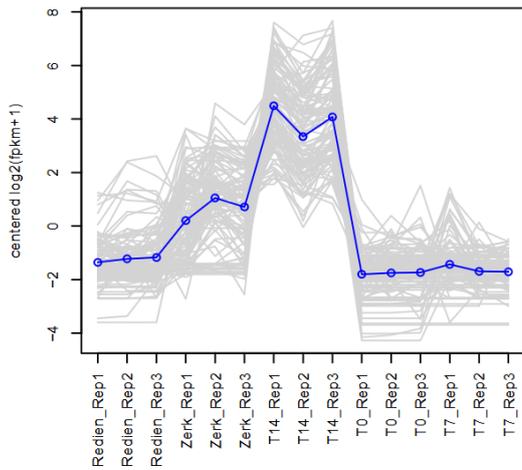
subcluster_11_log2_medianCentered_fpkm.matrix, 73



subcluster_12_log2_medianCentered_fpkm.matrix, 17



subcluster_13_log2_medianCentered_fpkm.matrix, 107



subcluster_14_log2_medianCentered_fpkm.matrix, 33

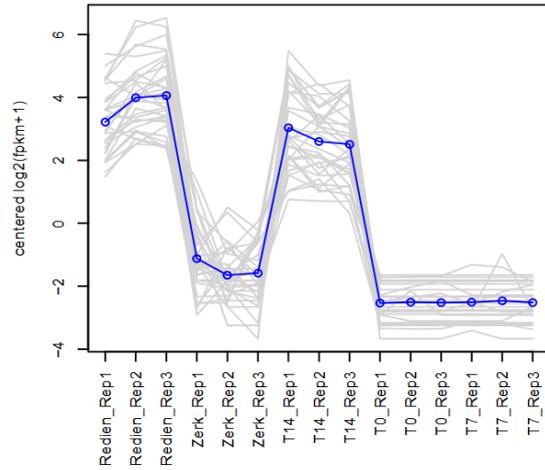


Abbildung 29: Fortsetzung auf nächster Seite

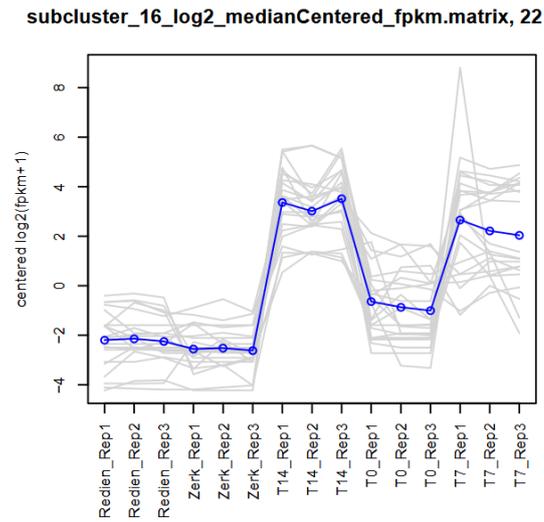


Abbildung 29 (fortgesetzt): Grafische Darstellung der Subcluster 4, 9, 11 - 14 und 16 (erstellt von Dr. Raúl Cosentino)

4. Digitales Zusatzmaterial

Da Genom- und Transkriptomanalysen eine enorm große Datenmenge erzeugen, war es in dieser Schriftausführung nicht möglich, alle wichtigen Dateien darzulegen. Aus diesem Grund wird der Arbeit ein USB-Stick mitgeliefert, welcher ergänzend folgendes Zusatzmaterial enthält:

- 1) **dotplot.png**: Originalgröße des Dotplot aus Abschnitt IV.2.2
- 2) **P_30_Enriched_Alle_Cluster.xlsx**: Auflistung der *enriched*-GO-Terms aller 16 Subcluster mit jeweiligen Signifikanzen aus Abschnitt IV.3.2
- 3) **P_30_Depleted_Alle_Cluster.xlsx**: Ergänzende Auflistung der *depleted*-GO-Terms aller 16 Subcluster mit jeweiligen Signifikanzen aus Abschnitt IV.3.2

X. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denjenigen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben. Ohne die tolle Zusammenarbeit und „das Rücken-Freihalten“, auch von Seiten meiner Arbeitgeber, wäre dieses Projekt nicht in dieser Art möglich gewesen!

Mein besonderer Dank gilt zunächst meiner Betreuerin und meinem Betreuer: Danke Prof. Gabi Knubben, dass du mir ohne jegliche Zweifel dieses Thema zu- und anvertraut hast. Danke für deine Unterstützung während allen Hoch- und Tiefphasen, dein immer offenes Ohr und deine wertvollen Ratschlägen, sowohl auf fachlicher, als auch auf emotionaler Ebene.

Vielen Dank Prof. Markus Meissner, dass ich durch diese Arbeit einen tieferen Einblick in die Parasitologie erhalten habe. Dein ansteckender Optimismus, das grenzenlose Ideenreichtum und die Unkompliziertheit in allen Belangen waren überaus lehrreich, motivierend und hat mir gezeigt, wie vielseitig Forschung sein kann.

Besonders erwähnen und danken möchte ich Dr. Markus Schmidt und Dr. Raúl Cosentino für die Übernahme der bioinformatischen Auswertung. Ohne eure fachliche Expertise und euer zeitintensives Engagement wäre diese Arbeit nicht das geworden was sie ist. Ich bin sehr dankbar für unsere tolle Zusammenarbeit und die tiefen Einblicke in die Bioinformatik, die ich durch euch erhalten habe. Danke für eure endlose Geduld, mir alle meine vielen Fragen zu beantworten und umzusetzen.

Ein herzlicher Dank geht an das gesamte Team der Rinderklinik, insbesondere an das Team aus dem Labor, für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten. Danke Sandra, für deine vielen Erklärungen und neuen Ideen im Labor, während ich selbst schon am Verzweifeln war. Danke Rebecca und Marina für eure Hilfe und euer Durchhaltevermögen dabei. Vielen Dank Frank, für deine hilfreichen Einfälle und dein Zuspruch wann immer es gerade hakte.

Danken möchte ich ebenso Dr. Antonio Vázquez und Dr. Annia Alba, die mir von Frankreich aus mit ihrem Wissen und ihrer Unterstützung zur Seite standen. Ihre Hilfe war nicht nur fachlich von großer Bedeutung, sondern hat mir auch gezeigt, wie wertvoll internationale Zusammenarbeit sein kann.

Danke auch an meine lieben Mitdoktorand:innen für die vielen lustigen Gespräche, die

motivierenden Worte an schlechten Tagen und die gute Stimmung bei uns im Büro. Insbesondere möchte ich dich Verena, an dieser Stelle erwähnen. Danke, dass du mich von Anfang an so ehrlich und herzlich ins Trematoden-Team aufgenommen und mir deine wertvollen Schnecken und das Wissen darüber überlassen hast. Ohne dich wäre die Arbeit nicht halb so produktiv, spannend und positiv gewesen.

Darüber hinaus möchte ich den Beteiligten der Stiftung des Nachlasses des Dr. Karl-Heinz Kurtze danken, welche mich als eine ihrer Stipendiatinnen ausgewählt haben und mir dadurch eine enorme finanzielle Stütze war.

Danke an meine lieben Freunde, für den perfekten Ausgleich in stressigen Momenten und euer stets offenes Ohr, auch wenn ihr gerade nicht verstanden habt von welchen wirren Daten oder exotischen Parasiten ich gerade spreche.

Nicht zuletzt möchte ich meiner ganzen Familie danken, die mir immer und bedingungslos den nötigen Rückhalt gegeben hat, egal ob sie vor Ort oder gar auf einem anderen Kontinent war. Danke für euren Glauben an mich und dafür, dass ihr noch nie an mir und meinen Vorhaben gezweifelt habt. Ohne eure Liebe, Geduld und euren Humor hätte ich diese Herausforderung nicht meistern können. Danke Valentin, dass du mir immer den Rücken freihältst und für mich da bist.

Ich möchte von Herzen allen Danke sagen, die ich in dieser Danksagung nicht namentlich erwähnen konnte, aber die dennoch einen wichtigen Beitrag zu diesem Projekt geleistet haben. Eure Hilfe, sei es in Form von wertvollen Gesprächen, praktischen Ratschlägen oder einfach durch euer Vertrauen, weiß ich enorm zu schätzen.