Identifizierung der Pathogenitätsfaktoren von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN) mittels vergleichender Transkriptom-Analysen, Proteom-Analysen und Phänotypisierung



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Departments Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Laura Biller aus Heilbronn

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Prof. Dr. I. Bruchhaus Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. H.-P. Mühlbach Tag der Disputation: 03. April 2009

Hamburg, den 20. März 2009



Dirg

Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	I
1 EINLEITUNG	3
1.1 DAS PARASITISCHE PROTOZOON ENTAMOEBA HISTOLYTICA	3
1.2 VERBREITUNG, KRANKHEITSBILDER UND THERAPIE	4
1.3 DIE BIOLOGIE DES PARASITEN	5
1.4 ZELLBIOLOGISCHE UND GENETISCHE ORGANISATION VON E. HISTOLYTICA	6
1.5 KULTURISOLATE VON E. HISTOLYTICA	6
1.6 PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	7
1.7 IDENTIFIZIERUNG PUTATIVER PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON <i>E. HISTOLYT</i> MITTELS VERGLEICHENDER MOLEKULARBIOLOGISCHER ANALYSEN	<i>FICA</i> 7
1.7.1 VERGLEICHENDE PROTEOM-STUDIEN	8
1.7.2 VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOM-STUDIEN	
1.8 ZIELSETZUNG	
2 MATERIAL UND METHODEN	
2.1 MATERIAL	
2.1.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	
2.1.2 ENZYME UND ENZYMINHIBITOREN	
2.1.3 IMMUNREAGENZIEN	
2.1.4 MARKER	
2.1.5 KITS	
2.1.6 OLIGONUKLEOTIDE	17
2.2 VERBRAUCHSMATERIAL	
2.2.1 GERÄTE	
2.2.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	
2.2.3 ANTIBIOTIKA	
2.2.4 KULTURMEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE	
2.3 ORGANISMEN UND PLASMIDE	
2.3.1 ORGANISMEN	
2.3.1.1 BAKTERIEN	
2.3.1.2 CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) ZELLEN	
2.3.1.3 ENTAMOEBA HISTOLYTICA	
2.3.1.4 MERIONES UNGUICULATUS	
2.3.1.5 MUS MUSCULUS	
2.3.2 PLASMIDE	
2.4 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	
2.4.1 KULTIVIERUNG VON E. HISTOLYTICA	

2.4.2	ZELLERNTE	28
2.4.3	KULTIVIERUNG VON E. HISTOLYTICA UNTER HITZESTRESS	28
2.4.4 KOMI	KULTIVIERUNG VON <i>E. HISTOLYTICA</i> IN GEGENWART VON HUMANEM, AKTIVEM PLEMENT	28
2.4.5	KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	28
2.4.6	KULTIVIERUNG VON CHO-ZELLEN	29
2.4.7	BESTIMMUNG DER ZYTOPATHISCHEN AKTIVITÄT VON E. HISTOLYTICA	29
2.4.8	BESTIMMUNG DER ERYTHROPHAGOZYTOSE-RATE BEI E. HISTOLYTICA	29
2.4.9 <i>HISTO</i>	BESTIMMUNG DER DIGESTIONSRATE PHAGOZYTIERTER ZELLEN BEI <i>E.</i> DLYTICA	.30
2.4.10	QUANTIFIZIERUNG DES ROSETTINGS BEI E. HISTOLYTICA	30
2.4.11	INDUKTION VON AMÖBENLEBERABSZESSEN IN M. UNGUICULATUS	31
2.4.12	IMMUNFLUORESZENZ-ANALYSE (IFA) IN <i>E. HISTOLYTICA</i>	31
2.5 I	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	32
2.5.1 <i>E. HIS</i>	ISOLIERUNG VON NAPBS-LÖSLICHEN UND UREA-LÖSLICHEN PROTEINEN AUS STOLYTICA	32
2.5.2	ISOLIERUNG VON MEMBRANOBERFLÄCHEN-PROTEINEN AUS E. HISTOLYTICA	32
2.5.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN	33
2.5.3.1	PROTEINBESTIMMUNG MIT BICINCHONINSÄURE (BCA)	33
2.5.3.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	33
2.5.3.3	PROTEINBESTIMMUNG DETERGENZIEN-HALTIGER PROBEN	33
2.5.4 <i>E. HIS</i>	BESTIMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN CYSTEINPEPTIDASE-AKTIVITÄT VON STOLYTICA	.33
2.5.5	BESTIMMUNG DER HÄMOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON E. HISTOLYTICA	34
2.5.6	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	34
2.5.7	COOMASSIE-PROTEINFÄRBUNG	35
2.5.8	WESTERNBLOT-ANALYSE UND DETEKTION	35
2.5.9	ZWEIDIMENSIONALE DIFFERENTIELLE IN-GEL ELEKTROPHORESE (DIGE)	36
2.5.9.1	FLUORESZENZMARKIERUNG VON PROTEINEN	37
2.5.9.2	ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG VON PROTEINEN	38
2.5.9.3	GELELEKROPHORETISCHE TRENNUNG VON PROTEINEN	38
2.5.9.4	LOKALISIERUNG VON PROTEIN- <i>SPOTS</i> MIT HILFE VON SYPRO RUBY	38
2.5.9.5	AUSWERTUNG UND NORMALISIERUNG DER DIGE-DATEN	39
2.5.10 <i>DESO</i> ANAL	TRYPTISCHER VERDAU VON PROTEINEN FÜR <i>MATRIX ASSISTED LASER</i> RPTION IONISATION TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY (MALDI TOF MS)- YSE	40
2.5.11	MALDI TOF MS/MS-ANALYSE	40
2.5.12 (NANO	TRYPTISCHER VERDAU VON PROTEINEN FÜR <i>NANO LIQUID CHROMATOGRAPHIE</i> D-LC)-ANALYSEN	41
2.5.13	NANO-LC UND MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE MITTELS MS/MS	42
2.5.14	GEWINNUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER	43
2.6 N	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	.44
2.6.1	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS E. HISTOLYTICA	44

2.6.2	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS E.HISTOLYTICA	
2.6.3	RNA-REINIGUNG UND DNA-VERDAU	
2.6.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN	45
2.6.4.1	MINI-PRÄPARATION	
2.6.4.2	MAXI-PRÄPARATION	
2.6.5	PRÄZIPITATION VON NUKLEINSÄUREN	
2.6.6	REVERSE TRANSKRIPTION VON MRNA IN CDNA	
2.6.7	DNA-AMPLIFIKATION MITTELS POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	
2.6.8	REAL-TIME PCR	
2.6.9 NUKI	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG UND REINHEITSKONTROLLE VON LEINSÄUREN	48
2.6.10	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	
2.6.11	REINIGUNG VON PCR-AMPLIFIKATEN AUS AGAROSE-GELEN	49
2.6.12	RESTRIKTIONSANALYSE VON DNA	
2.6.13	DNA-SEQUENZANALYSE	49
2.6.14	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	
2.6.15	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	49
2.6.16	TRANSFORMATION VON E. COLI	50
2.6.17	KLONIERUNG UND TRANSFORMATION MIT <i>TOPO TA CLONING®</i> KIT (INVITRO 50)GEN)
2.6.18	REKOMBINANTE EXPRESSION VON GENEN IN <i>E.COLI</i>	
2.6.19 AFFIN	REINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE DURCH NICKEL-CHELAT- NITÄTSCHROMATOGRAPHIE	51
2.6.20	TRANSFEKTION VON E. HISTOLYTICA	52
2.6.21	MICROARRAY-ANALYSE I	52
2.6.21	1 MICROARRAY I-GESTALTUNG	
2.6.21	2 CDNA-SYNTHESE UND INDIREKTE FLUORESZENZMARKIERUNG	
2.6.21	3 HYBRIDISIERUNG	
2.6.21	4 AUSWERTUNG UND NORMALISIERUNG DER MICROARRAY I-DATEN	
2.6.22	MICROARRAY-ANALYSE II	55
2.6.22	1 MICROARRAY II-GESTALTUNG	55
2.6.22	2 CDNA-SYNTHESE UND INDIREKTE FLUORESZENZMARKIERUNG	
2.6.22	3 HYBRIDISIERUNG	
2.6.22	4 AUSWERTUNG UND NORMALISIERUNG DER MICROARRAY II-DATEN	57
2.7	IN SILICO METHODEN	
3 EI	RGEBNISSE	59
3.1 HM-1	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER <i>E. HISTOLYTICA-</i> ZELLLINIEN :IMSS A UND HM-1:IMSS B	59
3.1.1 HM-1	GENOTYPISIERUNG DER <i>E. HISTOLYTICA-</i> ZELLLINIEN HM-1:IMSS A UND IMSS B	60
3.1.2 HM-1	<i>IN VITRO-</i> STUDIEN AN <i>E. HISTOLYTICA-</i> ZELLLINIEN HM-1:IMSS A UND :IMSS B	61
3.2	DIFFERENTIELLE PROTEOM-ANALYSEN	66

3.2.1 DIFFERENTIELLE PROTEOM-ANALYSE MITTELS DIGE-TECHNOLOGIE	66
3.2.2 WESTERNBLOT-ANALYSEN	72
3.2.3 VERGLEICHENDE ANALYSE DES MEMBRANOBERFLÄCHEN-PROTEOMS VON <i>E. HISTOLYTICA</i> -ZELLLINIE A UND ZELLLINIE B	
3.3 DIFFERENTIELLE TRANSKRIPTOM-ANALYSEN	78
3.3.1 MICROARRAY I UND MICROARRAY II	78
3.3.2 DIFFERENTIELLE TRANSKRIPTOM-ANALYSE DER <i>AIG</i> -GENE VON <i>E. HISTOLYT</i> MITTELS <i>REAL-TIME</i> PCR	ICA 83
3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE, DIE DURCH DIFFERENTIELLE PROTEON STUDIEN UND TRANSKRIPTOM-STUDIEN GEWONNEN WURDEN	И- 86
3.5 ÜBEREXPRESSIONSSTUDIEN	88
3.6 GEWINNUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN DIE REKOMBINANTE FE-HYDROGENASE	90
3.6.1 LOKALISATIONS-STUDIEN DER FE-HYDROGENASE IN <i>E. HISTOLYTICA</i> - TROPHOZOITEN MITTELS IFA	
4 DISKUSSION	95
4.1 PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON E. HISTOLYTICA	
4.2 CHARAKTERISIERUNG DER HM-1:IMSS-ZELLLINIE A UND DER HM-1:IMSS-ZELLLINIE B	
4.2.1 GENOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG	
4.2.2 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG	97
4.3 PROTEOM-ANALYSEN	
4.3.1 VERGLEICHENDE PROTEOM-ANALYSE MITTELS DIGE-TECHNOLOGIE	99
4.3.2 VERGLEICHENDE ANALYSE DES MEMBRANOBERFLÄCHEN-PROTEOMS VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	103
4.4 VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOM-ANALYSEN	105
4.4.1 MICROARRAY-ANALYSEN	105
4.4.2 VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOM-ANALYSE DER <i>AIG</i> -GENE VON <i>E. HISTOLYT</i> MITTELS <i>REAL-TIME</i> PCR	<i>ICA</i> 108
4.5 ÜBEREXPRESSIONSSTUDIEN	109
4.6 AUSBLICK	111
LITERATURVERZEICHNIS	112
ANHANG	119
DANKSAGUNG	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Neben den Standard-Symbolen und Präfixen der SI- Einheiten und deren Ableitungen, sowie den Symbolen der chemischen Elemente des Periodensystems wurden folgende Abkürzungen verwendet:

A. (bi)dest.	Aqua (bi)destillata
Abb.	Abbildung
ABS	Adultes Bovines Serum
ACN	Acetonitril
ad.	Auffüllen bis
AIG	avrRpt2-induced gene
Ak	Antikörper
ALA	Amöbenleberabszess
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Anti-Sense
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
СНО	Chinese Hamster Ovary cells
СР	Cysteinpeptidase
C _T	Cycle of Threshold
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
Cy5	Carbocyanin 5
2D	Zweidimensional
Da	Dalton
DAPI	4´,6-Diamidino-2-phenylindol
DIGE	Zweidimensionale Differentielle In-Gel Elektrophorese
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E-64	L-transpoxysuccinyl-l-leucylamido-4-(guanidino)-butane
ECL	Enhanced Chemi-Luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminomethylether)-N,N,N',N'-tetra-essigsäure
Eh	Entamoeba histolytica
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FCS	Fötales Kälberserum
FeHyd	Fe-Hydrogenase
g	Erdbeschleunigung
Gal/GalNAc	Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin
gDNA	Genomische DNA
GIMAP	GTPase of the Immunity Associated Protein
G418	Geniticin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFA	Immunfluoreszenz-Analyse
IP	Isoelektrische Punkt
IPTG	Isopropyl-b-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LC	Liquid Chromatography
LP	NaPBS-lösliche Proteine
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
М	Molar

MALDI TOF MS	<i>Matrix Assised Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass</i> <i>Spectrometry</i>
MB	Megabase
MeOH	Methanol
MgAcetat	Magnesium-Acetat
MGL	Methionin-gamma Lyase
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Na-Acetat	Natrium-Acetat
Na-Citrat	Natrium-Citrat
NaPBS	Natrium- Phosphate Buffered Saline
neo	Neomycinphosphotransferase
NL	nicht-linear
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMF	Peptide Mass Fingerprint
ppm	parts per million
Pwo	Pyrococcus woesei
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Sense
SAPLIPs	Saponin-ähnliche Proteine
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Saline Sodium Citrate
STR	Short Tandem Repeat
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Trisboratessigpuffer

TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-Hydroxmethyl-Aminoethan
tRNA	transfer RNA
TY-I-S-33	Trypticase-yeast extract-iron-serum medium
u.a.	unter anderem
U	Unit (Enzymeinheit)
ULP	Urea-lösliche Proteine
üN	über Nacht
üΤ	über Tag
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WHO	World Health Organization
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid
Z-Arg-Arg-pNA	Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid
z.B.	zum Beispiel

ZUSAMMENFASSUNG

Der protozooische Humanparasit *Entamoeba histolytica* ist Erreger der Amöbiasis. Diese Infektionskrankheit kann asymptomaisch für den Menschen verlaufen oder sich invasiv entwickeln. Im letzteren Fall hat dies klinische Manifestationen wie eine Amöbenkolitis und die Bildung von Amöbenleberabszessen zur Folge. Bisher konnten nur wenige Moleküle als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* beschrieben werden. Nach wie vor sind jedoch die pathobiologischen Mechanismen, weshalb eine Amöben-Infektion asymptomatisch bleibt oder aber einen invasiven und extra-intestinalen Verlauf nimmt, weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurde daher das Ziel verfolgt, weitere Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* zu identifizieren. Mit Hilfe von zwei *E. histolytica*-Zelllinien (A und B) des Isolates HM-1:IMSS, die im Tiermodell Unterschiede hinsichtlich ihrer Pathogenität aufweisen, wurden sowohl auf physiologischer, transkriptiver als auch translativer Ebene nach differentiellen Molekülen zwischen beiden Zelllinien gesucht, die in die Pathogenese des Erregers involviert sein könnten.

Die genotypische und phänotypische Charakterisierung der HM-1:IMSS-Zelllinie A und der HM-1:IMSS-Zelllinie B zeigte, dass beide Zelllinien denselben genetischen Ursprung haben, sich aber in ihrem Phänotyp konstant unterscheiden. Zelllinie A verursacht keine Amöbenleberabszesse im Tiermodell, wohingegen Zelllinie B große Leberabszesse hervorruft. Darüber hinaus zeigen die Trophozoiten von Zelllinie B eine ca. siebenfach höhere Cysteinpeptidase-Aktivität, sind vergleichsweise größer und ihre Zellteilungsrate ist um ein Drittel höher, vergleicht man sie mit Trophozoiten der Zelllinie A. Der Zugriff auf die apathogene Zelllinie A und die pathogene Zelllinie B, die auf denselben genetischen Ursprung zurückzuführen sind, bietet die ausserordentliche Möglichkeit, anhand verleichender Analysen molekulare Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zu finden, die Hinweise auf die Virulenz liefern können.

Mit Hilfe der zweidimensionalen differentiellen in-Gel Elektrophorese (DIGE) wurde eine vergleichende Proteom-Analyse zwischen beiden Zelllinien durchgeführt. Insgesamt konnten 33 *E. histolytica*-spezifische Proteine identifiziert werden, die zwischen beiden Zelllinien in differentiell unterschiedlichen Mengen vertreten sind. Wurden die Proteine entsprechend ihrer biologischen Funktion sortiert, so fiel auf, dass Antioxidantien wie die Fe-Hydrogenase, das Peroxiredoxin und die Superoxiddismutase in der pathogenen Zelllinie B in differentiell höheren Mengen vorliegen. Außerdem war bemerkenswert, dass Proteine, die mit der

Organisation des Zytoskeletts assoziiert sind, vorwiegend in der apathogenen Zelllinie A differentiell höhere Konzentrationen aufweisen.

Erstmalig wurde darüber hinaus das Membranoberfächen-Proteom von *E. histolytica* anhand der Zelllinien A und B beschrieben. Es wurden 62 Proteine nachgewiesen, die zwischen beiden Zelllinien in differentiell unterschiedlichen Mengen vorliegen. Ungefähr ein Drittel davon beinhalten Sequenzen von Transmembrandomänen und Signalpeptiden, wodurch sie nachweislich an der Zellmembran lokalisiert sind. Über die biologische Funktion der meisten dieser Proteine ist bisher sehr wenig bekannt.

Mit Hilfe der *Microarray*-Technologie wurden vergleichende Transkriptom-Studien zwischen beiden Zelllinien durchgeführt. Insgesamt konnten 87 Gene gefunden werden, die zwischen Zelllinie A und Zelllinie B differentiell exprimiert sind. Auffällig war, dass auch auf der Ebene der Genexpression Moleküle, die an der Stress-Antwort beteiligt sind, wie die Fe-Hydrogenase, die Methionin-gamma Lyase und ein 70 kDa Hitzeschockprotein überwiegend in der pathogenen Zelllinie B differentiell höher transkribiert sind.

Mit Hilfe von Westernblot-Analysen und spezifischen Antikörpern gegen die Superoxiddismutase, das Peroxiredoxin, das Grainin und die Fe-Hydrogenase konnten die DIGE-Ergebnisse bestätigt werden. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse der *Microarray*-Studien durch *Real-time*-PCR-Analysen verifiziert werden.

Durch die weitreichenden Analysen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden konnten zahlreiche neue Moleküle identifiziert werden, die als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* in Betracht gezogen werden können. Die unterschiedlichen Ergebnisse, die auf Transkriptom- und Proteom-Ebene erhalten wurden, weisen auf eine komplexe Regulation post-transkriptioneller und post-translativer Prozesse in *E. histolytica* hin, die noch nicht vollständig verstanden sind. Daher müssen Charakerisierungs-Studien der gefundenen Moleküle, deren Beteiligung an den pathobiologischen Mechanismen von *E. histolytica* weiter aufklären.

1 EINLEITUNG

1.1 Das parasitische Protozoon Entamoeba histolytica

Der einzellige Humanparasit *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) ist Erreger der Amöbiasis, einer Infektionskrankheit, von der weltweit ca. 50 Millionen Menschen pro Jahr betroffen sind (WHO/PAHA/UNESCO, 1997). Die Zahl der Todesfälle wird auf 70.000 pro Jahr geschätzt (Clark *et al.*, 2007). Nach Malaria und Schistosomiasis zählt die Amöbiasis dadurch zu den häufigsten Parasitosen des Menschen (WHO/PAHA/UNESCO, 1997).

E. histolytica durchläuft einen einfachen asexuellen Lebenszyklus (siehe Abbildung 1.1). Bis auf wenige Affenarten ist der Mensch der einzige natürliche Wirt des Erregers (van Lunzen, 1996). Die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme vierkerniger Zysten, die sich im Dünndarm durch Exzystierung in achtkernige Trophozoiten umwandeln, aus denen durch schließlich Plasmateilung einkernige Trophozoiten hervorgehen. Die durch Pseudopodienbildung beweglichen Trophozoiten besiedeln den oberen Dickdarm und ernähren sich dort vor allem von Bakterien der Darmflora und Nahrungsresten. Im unteren Dickdarm erfolgt, nach asexueller Fortpflanzung durch Zweiteilung, die Enzystierung. Die reifen Zysten werden mit dem Stuhl des Wirts ausgeschieden und können abhängig von den Umweltbedingungen über mehrere Wochen infektiös bleiben. Die Übertragung des Erregers erfolgt in der Regel oral über verunreinigtes Trinkwasser.



Quelle: Verändert nach www.med.sc.edu:85/ parasitology/e-histol-life

Abbildung 1.1: Die Zystenform von *E. histolytica* wird oral über verunreinigtes Trinkwasser oder kontaminierte Nahrung vom Menschen aufgenommen (1). Geschützt von ihrer säureresistenten, chitinhaltigen Außenmembran gelangt die vierkernige Zyste über den Magen in den Dünndarm, wo sie sich nach der Exzystierung in achtkernige Trophozoiten umwandelt. Daraus entstehen durch weitere Plasmateilung einkernige, bewegliche Trophozoiten (2 und 3). Diese besiedeln den oberen Dickdarm. Bei nicht-invasiven Verläufen (A) enzystieren sich die Trophozoiten nach asexueller Zweiteilung im unteren Dickdarm und werden mit dem Kot des Wirts ausgeschieden (4). Bei intestinalen Erkrankungen (B) schädigen die Amöben die Darmmukosa und können eine Amöbenkolitis verursachen. Bei extra-intestinalen Erkrankungen durchdringen die Amöben die Darmwand und gelangen mit dem Blutstrom des Wirts in andere Organe, vorzugsweise in die Leber und können dort Abszesse verursachen (C), die unbehandelt zum Tod des Patienten führen können.

1.2 Verbreitung, Krankheitsbilder und Therapie

Die Amöbiasis ist in den meisten tropischen und subtropischen Regionen der Erde endemisch, kann jedoch auch in Fällen verunreinigten Trinkwassers, mangelnder Toilettenhygiene oder kontaminierter Nahrung in gemäßigten Klimazonen auftreten.

Die Infektion kann in verschiedenen Verlaufsformen auftreten, wobei die asymptomatische nicht-invasive Amöbiasis in ca. 90 % aller Fälle in Erscheinung tritt und von der invasiven intestinalen Amöbiasis zu unterscheiden ist (Blessmann *et al.*, 2003). In schätzungsweise 10 % der Krankheitsverläufe werden die Trophozoiten invasiv und dringen unter massiver Gewebszerstörung in die Mukosa und das Darmepithel ein (Stanley, 2003). Typische Symptome sind Bauchschmerzen, eitrige Kolitis und blutige Diarrhöe, die durch Fieber begleitet werden können. Bei extra-intestinalen Verlaufsformen der Amöbiasis gelangen die Trophozoiten nach der Perforation des Darmepithels über den Blutstrom in weitere Organe,

vorzugsweise in die Leber, und verursachen dort Abszesse. Die Letalität bei einem unbehandelten Amöbenleberabszess (ALA) ist sehr hoch.

Asymptomatische intestinale Amöbiasis kann durch die Einnahme von Paromomycin behandelt werden. Dieses Antibiotikum bindet an die Ribosomen der Amöbe und blockiert dadurch ihre Proteinbiosynthese. Invasive *E. histolytica*-Infektionen werden hingegen zunächst mit dem Antibiotikum Metronidazol therapiert, gefolgt von einer Behandlung mit Paromomycin, um intraluminal verbliebene Amöben zu eliminieren. Unter anaeroben Bedingungen werden Elektronen des Ferredoxins der Amöbe auf die Nitrogruppe des Metronidazols übertragen, wodurch hochreaktive Nitroradikale entstehen, die durch die Verursachung von DNA-Strangbrüchen, als auch durch die Zerstörung von Proteinen und Lipiden, den Parasiten schädigen.

1.3 Die Biologie des Parasiten

Taxonomisch wird *E. histolytica* zum Stamm der Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Ordnung Entamoebida, Familie Entamoebidae und Gattung *Entamoeba* gezählt. Sie sind obligate Anaerobier und dadurch an die Lebensweise im Darm des Menschen angepasst. Die Trophozoiten sind von einer einfachen Zellmembran umgeben und zeichnen sich durch ihre amöboide Fortbewegung mit Hilfe von Pseudopodien aus, die aus der Plasmamembran ausgestülpt werden. Die Nahrungsaufnahme erfolgt durch Phagozytose, woran ebenfalls die Plasmamembran beteiligt ist.

Eine weitere Spezies der Gattung *Entamoeba* ist *E. dispar*. Dieser im menschlichen Darm lebenden Kommensalen ist morphologisch von *E. histolytica* nicht zu unterscheiden. Erst durch die Identifizierung spezifischer Isoenzymmuster (Sargeaunt und Williams, 1978) und molekulargenetische Analysen (Clark und Diamond, 1991; Tachibana *et al.*, 1991; Tannich *et al.*, 1989) gelang es, sie als verschiedene Spezies zu identifizieren (Diamond und Clark, 1993). In der Diagnostik können sie anhand von Marker-Genen, die für kleine Untereinheiten von ribosomalen Proteinen kodieren, mittels PCR-Analysen voneinander unterschieden werden.

1.4 Zellbiologische und genetische Organisation von E. histolytica

Das Endoplasma der Trophozoiten besteht zu ca. 40 % aus Vakuolen und Vesikeln, die funktionell das Äquivalent der Lysosomen und der zytotoxischen Vesikel höherer eukaryotischer Zellen darstellen (Scholze und Tannich, 1994). Die Zelle verfügt über ein vom Mitochondrium abgeleitetes Mitosom, wohingegen ein echtes mitochondriales Genom fehlt (Tovar *et al.*, 1999). Die Zelle verfügt über ein Endoplasmatisches Retikulum (ER), bisher gibt es hingegen keinen Nachweis für einen Golgi-Apparat, wie er typischerweise bei eukarytischen Zellen beschrieben ist. Jedoch konnten Golgi-ähnliche Vesikel gefunden werden (Bredeston *et al.*, 2005).

Das Genom von *E. histolytica* umfasst ungefähr 24 Mb und weist mit ca. 78 % einen vergleichsweise sehr hohen AT-Gehalt auf (Loftus *et al.*, 2005; Willhoeft *et al.*, 1999). Die Genom-Analyse lieferte 9.938 vorhergesagte Gene. Mit einer durchschnittlichen Länge von 1,17 kb repräsentieren sie somit ca. 49 % des gesamten Genoms. Nur ein Viertel aller Gene beinhalten eine Intron-Sequenz, wovon ca. 6 % multiple Intron-Bereiche tragen (Loftus *et al.*, 2005). Die genaue Anzahl der Chromosomen und ihre Organisation sind noch unbekannt.

1.5 Kulturisolate von E. histolytica

Amöben können aus Stuhlproben infizierter Patienten isoliert und unter axenischen Bedingungen als Zelllinien in Kultur genommen werden. Diese Isolate weisen, einhergehend mit der unterschiedlichen Symptomatik im Patienten, spezifische Charakteristika auf. Um diese Eigenschaften bzw. den Phänotyp einer Zelllinie genauer zu charakterisieren, werden verschiedene *in vitro* als auch *in vivo* Studien durchgeführt. Wichtige Parameter sind dabei unter anderem die Fähigkeit der Trophozoiten, Leberabszesse im Tiermodell zu induzieren, die zytopathische Aktivität, die Cysteinpeptidase-Aktiviät, die Phagozytose-Rate, die Fähigkeit phagozytierte Zellen zu verdauen und die Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressoren.

Zelllinien, die definierte phänotypische Eigenschaften aufweisen, sind essentiell für die Erforschung von *E. histolytica*. Dabei eignen sich pathogene Zelllinien einerseits und apathogene Zelllinien andererseits besonders für vergleichende Studien, die sich mit der Identifizierung von putativen Pathogenitätsfaktoren des Erregers beschäftigen.

1.6 Pathogenitätsfaktoren von E. histolytica

Die Gründe für die verschiedenen Verlaufsformen der Infektion mit *E. histolytica* sind weitgehend ungeklärt.

Es ist bisher bekannt, dass E. histolytica in einem hohen Maß dazu befähigt ist, Zellen zu lysieren und dadurch Gewebe zu zerstören. Diese namensgebende Eigenschaft trägt zentral zur Pathogenität des Parasiten bei. Ein Trophozoiten eigenes Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal/GalNAc)-spezifisches Lektin ermöglicht es dem Parasiten, sich an den Darm-Epithelzellen des Wirts anzuheften (Petri, 1996; Horstmann et al., 1992). Die Amöbenspezifischen Amoebapores können daraufhin porenbildend wirken und führen somit zur Lyse der Wirtszellen (Leippe und Muller-Eberhard, 1994). Zusätzlich können Cysteinpeptidasen die Extrazelluläre Matrix der Wirtszellen angreifen und dadurch Gewebe auflösen (Olivos-Garcia et al., 2004; Bruchhaus et al., 2003; Que et al., 2002; Stanley et al., 1995; Scholze und Tannich, 1994; Keene et al., 1986). Darüber hinaus ist E. histolytica als Endoparasit dem Immunsystem des Wirts ausgesetzt. Die Moleküle, die sich an der Zelloberfläche des Erregers befinden präsentieren sich dabei zuerst als Epitope, die als Antigene erkannt werden können und dadurch als Kanditatenmoleküle für eine Impfstoffentwicklung von Interesse sein könnten. Außerdem scheint das Set an Oberflächenmolekülen wichtige Hinweise für die Pathogenität der Amöbe zu liefern. Beispielsweise sind auch das als Pathogenitätsfaktor beschriebene Lektin der Amöben, sowie die Cysteinpeptidase A5 an deren Zelloberfläche lokalisiert. Allerdings sind die genannten Moleküle sowohl bei pathogenen als auch apathogenen E. histolytica-Isolaten zu finden. Daher können diese Faktoren nicht alleine für die Virulenz der Amöben verantwortlich sein. Demnach ist die tatsächliche Ursache für ihre Pathogenität noch nicht gefunden.

1.7 Identifizierung putativer Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* mittels vergleichender molekularbiologischer Analysen

Verschiedene Autoren haben vergleichende Transkriptom- als auch Proteom-Studien zwischen pathogenen und apathogenen *E. histolytica*-Isolaten durchgeführt, um neue putative Pathogenitätsfaktoren zu finden (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2006; MacFarlane und Singh, 2006). Diese Arbeiten identifizierten stets eine große Anzahl an Genen oder Proteinen, die differentiell reguliert waren. Darunter fanden sich verschiedene Proteine, die an biochemischen Reaktionswegen, der Reorganisation des Zytoskeletts und

Prozessen der Sekretion beteiligt sind, sowie Moleküle mit antimikrobieller Aktivität, proteolytischer Aktivität und antioxidativer Wirkung (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2006; MacFarlane und Singh, 2006).

1.7.1 Vergleichende Proteom-Studien

Die zweidimensionale differentielle in-Gel Elektrophorese (DIGE) bietet die Möglichkeit, komplexe Proteingemische entsprechend ihrer molekularen Massen und ihres isoelektrischen Punktes (IP) zu separieren. Im Gegensatz zu einer konventionellen 2D-Gelelektrophorese können zwei unterschiedliche Proteinproben selektiv mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 bzw. Cy5 markiert und gemeinsam in einem Gel getrennt und visualisiert werden. Mit Hilfe dieser Technologie können ganze Proteome analysiert werden. Dabei wird das Proteom als die Gesamtheit aller Proteine in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment, unter genau definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt, bezeichnet. Gegenüber der konventionellen zweidimensionalen Gelelektrophorese bietet die DIGE-Technologie dabei den entscheidenden Vorteil, dass Proteine, die exklusiv in einer Probe enthalten sind, erkannt werden, und somit eine Detektion differentieller Proteinregulation zwischen zwei Proben ermöglicht wird. Unter Verwendung eines Cy2markierten internen Standards, bestehend aus einem Gemisch beider Proteinproben, lassen sich statistisch relevante Daten generieren. Außerdem lässt sich dadurch nachvollziehen, ob Unterschiede auf biologische Variationen oder auf technische Probleme des Experiments zurückzuführen sind (Van den Bergh und Arckens, 2005).

Ziel-Proteine können mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert werden. Die *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI TOF MS) ermöglicht die Bestimmung der Molekülmassen (Karas und Hillenkamp, 1988). Das Enzym Trypsin spaltet Proteine in Peptideinheiten, die gebunden an eine Matrix durch *Laser*-Beschuss in die Gasphase desorbiert werden. Durch Protonenübertragung von Matrixmolekülen auf die Peptide entstehen Peptidionen, die in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Durch Messung der Flugzeit der Ionen auf einer Driftstrecke lässt sich auf die Masse der erzeugten Peptidionen schließen, wodurch so genannte *Peptide Mass Fingerprint*-Daten (PMF) generiert werden. Weiterhin kann durch Fragmentierung einzelner Peptid-Ionen die Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptids abgeleitet werden. Die Identifizierung der Proteine erfolgt durch eine kombinierte Suche der PMF-Daten und der MS/MS-Spektren in Protein-Datenbanken.

Die DIGE-Technologie findet bereits in diversen molekularbiologischen Forschungsfeldern erfolgreiche Anwendung. Beispielsweise wurden Experimente zur Osteoklastogenese (Czupalla *et al.*, 2005), Leberfibrose (Spano *et al.*, 2008) und HIV (Ringrose *et al.*, 2008) durchgeführt.

Bisher existiert jedoch nur eine publizierte Arbeit, die sich mit vergleichenden Proteom-Studien bei *E. histolytica* mit Hilfe der DIGE-Technologie beschäftigt. Darin wurden die Proteome der pathogenen *E. histolytica*-Zelllinie HM-1:IMSS und der apathogenen *E. histolytica*-Zelllinie Rahman miteinander verglichen, mit dem Ziel differentiell regulierte Proteine als putative Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren (Davis *et al.*, 2006). Sechs Proteine wurden beschrieben, die zwischen beiden Zelllinien in differentiellen Mengen vorlagen. Ein Zytoskelett-assoziiertes LIM-Domänen-Protein, eine Alkoholdehydrogenase und das an der oxidativen Stressantwort beteiligte Peroxiredoxin waren in der pathogenen Zelllinie HM-1:IMSS vermehrt vorhanden, wohingegen die Superoxiddismutase (SOD) und die Proteine Grainin 1 und Grainin 2 in der apathogenen Zelllinie Rahman in höheren Konzentrationen nachgewiesen wurden.

Generell eignet sich die DIGE-Technologie hervorragend, um Proteom weit differentiell regulierte Proteine hinsichtlich einer bestimmten Fragestellung zu identifizieren. Insbesondere Pathogenitätsfaktoren, Stress-Reaktionen und die Auswirkung von Chemikalien bzw. Medikamenten lassen sich dadurch analysieren.

Die Genauigkeit, Proteome ganzer Organismen mit Hilfe dieser Technik zu untersuchen, wird jedoch durch die Sensitivität der Methode limitiert. Je komplexer ein Proteingemisch ist, desto schwieriger lassen sich stark unterrepräsentierte Proteine detektieren. Darüber hinaus lassen sich bestimmte Proteine nur unzureichend mit dieser Technik trennen und identifizieren. Dazu zählen extrem saure oder basische Proteine, besonders große Proteine und stark hydrophobe Proteine, die mit der Zellmembran assoziiert sind (Renzone *et al.*, 2005).

Diese methodischen Einschränkungen lassen sich in einigen Fällen umgehen. Sofern es das zu untersuchende biologische System zulässt, können beispielsweise komplexe Proteingemische vor der eigentlichen Analyse fraktioniert werden, wodurch unterrepräsentierte Proteine angereichert werden, was eine erhöhte Sensitivität der Protein-Identifizierung zur Folge hat.

Zusätzlich bilden so genannte nicht-Gel-basierte Proteom-Analysen, die vornehmlich auf der Separierung von Peptiden und nicht von Proteinen beruhen, eine wichtige Alternative. Proteingemische werden mit Trypsin in Peptideinheiten gespalten und dieses große Spektrum von Peptiden mit Hilfe der Liquid Chromatography (Nano-LC) fraktioniert, um anschließend, System. beispielsweise durch ein online Elektronenspray *Triple-Quadrupole* massenspektrometrisch analysiert zu werden. Dabei können die zu untersuchenden Protein-Proben mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer molekularen Massen getrennt werden. Anschließend werden die entstandenen Proteinbanden durch Zerschneiden des Gels voneinander separiert, wodurch verschiedene Proteine ähnlicher Größe fraktioniert werden. Diese selektionierten Proteingemische werden tryptisch gespalten und die Peptide für die Nano-LC eingesetzt. Dabei wird die Liquid Chromatography unter Verwendung von Mikrosäulen, die einen Durchmesser von 10-150 µm und einer Durchflussrate von 10-1.000 nl/min aufweist, als Nano-LC klassifiziert. Setzt sich die zu untersuchende Probe aus einer beschränkten Anzahl von Proteinen zusammen, liefert diese Technologie umfangreiche, exakte Daten. Beispielsweise gelang es mit Hilfe dieser Methode ca. 1.500 Proteine aus einem Gesamt-Proteinlysat der Hefe zu identifizieren (Washburn et al., 2001).

1.7.2 Vergleichende Transkriptom-Studien

Die Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit, mit kleinen Mengen eines Probenmaterials innerhalb eines Experiments bis zu mehrere tausend Einzelnachweise durchzuführen. Sie qualifiziert sich dadurch besonders für die Analyse ganzer Genome oder Transkriptome eines Organismus. Prinzipiell dienen repräsentative Bereiche von bekannten Gensequenzen als Sonden, die auf einer Matrix fixiert werden. Für Transkriptom-Analysen wird die mRNA der zu untersuchenden Probe in cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Proben werden mit dem Microarray in Kontakt gebracht, wodurch sich komplementäre Basenpaarungen zwischen Probe und Sonde ausbilden können. Ungebundene cDNA wird nach der Reaktion entfernt. Die fluoreszenzmarkierten, gebundenen Proben können als Hybridisierungssignale detektiert werden. Für vergleichende Transkriptom-Studien lassen sich unter Verwendung verschiedenfarbiger zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen Proben auf einem Microarray kohybridisieren. Differentielle Signale, die auf eine der beiden Probe zurückzuführen sind, lassen sich von Fusionssignalen beider Proben unterscheiden.

Seit den 1990er Jahren wurde diese Technologie immer weiter entwickelt und findet in der biomedizinischen Forschung umfangreiche Anwendung. Mittlerweile gibt es kommerzielle, so genannte Schnelltests, die basierend auf *Microarrays* verschiedene Krankheiten zuverlässig und schnell diagnostizieren. Beispielsweise bietet der finnische Hersteller Mobidiag einen *Microarray*-Schnelltest zum Nachweis von Herpesviren an, der für die Humandiagnostik zum Einsatz kommt. *Microarrays* werden auch für die Krebsforschung eingesetzt (Geyer und Reis-Filho, 2008; Nannini *et al.*, 2008; Bertucci *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieser Technologie konnten ausserdem neue Erkenntnisse über die Genregulation in protozooischen Parasiten wie *Plasmodium* und *Toxoplasma* gewonnen werden (Duncan, 2004).

Für die Erforschung von E. histolytica wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen Microarray-Experimente durchgeführt. Im Zentrum der meisten Studien stand dabei die Identifizierung von Kandidaten-Genen, die mit der Pathogenität des Erregers assoziiert sein könnten. So wurden beispielsweise verschiedene Experimente zwischen der pathogenen E. histolytica-Zelllinie HM-1:IMSS und der apathogenen E. histolytica-Zelllinie Rahman durchgeführt (Davis et al., 2007; Ehrenkaufer et al., 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Unter den am stärksten differentiell exprimierten Genen haben Davis und Kollegen verschiedenste Transkripte gefunden. Neben vielen anderen sind in der pathogenen Zelllinie HM-1:IMSS Gene für die Cysteinpeptidase A4, die Cysteinpeptidase A6, verschiedene AIG 1 Proteine, ein an Oxidationsprozessen beteiligtes Flavoprotein und eine Alkoholdehydrogenase sowie an der Signaltransduktion beteiligte Proteinkinasen differnetiell stärker exprimiert. Im Gegensatz dazu sind beispielsweise Transkripte für die Cysteinpeptidase A3, die Cysteinpeptidase 112. ein C2-Domänen-Protein, sowie verschiedene an der Signaltransduktion beteiligte Rho-GTPasen, als auch eine mit Oxidationsprozessen assoziierte Fe-Hydrogenase differentiell höher in der apathogenen Zelllinie Rahman exprimiert. Die Microarray-Studie von MacFarlane und seiner Arbeitsgruppe fanden unter anderem Gene für das Zytoskelett assoziierte Cortexillin, ein AIG 1 Protein und das an der oxidativen Stressantwort beiteiligte Peroxiredoxin in der virulenten Zelllinie HM-1:IMSS differentiell erhöht exprimiert, während Gene für die Cysteinpeptidase A1 und die Cysteinpeptidase A7, sowie für eine Fe-Hydrogenase stärker in der avirulenten Zelllinie Rahman transkribiert werden.

Neben dem Vergleich von zwei unterschiedlich virulenten Amöben-Isolaten wurde auch durch die Anwendung verschiedener *in vitro*-Experimente versucht, pathogenitätsspezifische Gene zu identifizieren. So wurde die Genexpression von Amöben in Anwesenheit von Gal/GalNAc-Lektin, eukaryotischen Zellen und Bakterien untersucht (Gilchrist *et al.*, 2006; MacFarlane und Singh, 2006; Beck *et al.*, 2005). Die Bakterien-Kokultivierung soll dabei die Situation der Amöben im menschlichen Darm und dem dort existierenden mikrobiellen

EINLEITUNG

Milieu simulieren. Der Einfluss von verschiedenen Stressoren auf Trophozoiten, wie Hitze und Metranidazol, wurde ebenfalls in vergleichenden Transkriptionsstudien mit Hilfe von *Microarrays* analysiert (Tazreiter *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2006). Verlassen die Trophozoiten die ca. 36°C warme Umgebung des Dickdarms und invadieren in das Wirtsgewebe, so sind sie einen Hitzeschock, beispielsweise in der Leber von ca. 42°C ausgesetzt. In der Studie von Weber und Kollegen konnten Gene identifiziert werden, die während eines Hitzeschocks von 42°C, in HM-1:IMSS Trophozoiten im Vergleich zu Standard-Kulturbedingungen erhöht exprimiert werden. Darunter fanden sich Gene für 90 kDa-Hitzeschockproteine, Ubiquitin konjugierte Proteine, die Cysteinpeptidase 4, die Cysteinpeptidase 6, ein Lysozym und ein Gal/GalNAc-Lektin.

Mit einer *in vivo*-Studie wurde die differentielle Genexpression zwischen Trophozoiten, die unter Standard-Kulturbedingungen wuchsen, und Trophozoiten, die aus einem Mäuse-Colon isoliert wurden, analysiert (Gilchrist *et al.*, 2006). In dieser Genom-weiten *Microarray*-Studie wurden beispielsweise eine differentiell erhöhte Expression der Gene für verschiedene Cysteinpeptidasen, an der Signaltransduktion beteiligte Transmembrankinasen und Rho-GTPasen, sowie Lipasen und AIG 1 Proteine in den Trophozoiten gefunden, die aus dem Mäuse-Colon reisoliert wurden. Hingegen waren Gene für zwei verschiedene Gal/GalNAc Lektine differentiell niedriger exprimiert.

Die verschiedenen, hier angeführten *Microarray*-Analysen, die sich besonders mit der Identifizierung putativer Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* beschäftigten, liefern ein großes Spektrum an differentiell exprimierten Genen. Allerdings zeigen sich in vergleichbaren Studien nicht die gleichen Gene übereinstimmend reguliert.

Die Verifizierung der aus der *Microarray*-Technologie gewonnenen Daten mit Hilfe einer unabhängigen Methode ist besonders wichtig. Hierfür bietet sich beispielsweise die quantitative *Real-time* PCR an. Zusätzlich eignet sich diese Art der PCR, die eine Produktentwicklung in Echtzeit dokumentiert und mit Hilfe derer sich relative Quantitäten einer Probe bestimmen lassen, ebenfalls für vergleichende Expressionsstudien.

1.8 Zielsetzung

Betrachtet vom heutigen Zeitpunkt, sind die pathobiologischen Mechanismen, die der Virulenz des Humanparasiten *Entamoeba histolytica* zugrunde liegen, weitgehend unbekannt.

Bisher konnten die Zellkontakt vermittelnden Lektine, die Gewebe lysierenden Cysteinpeptidasen und die Zellporen bildenden *Amoebapores* als Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden. Nach wie vor ist jedoch die Ursache, weshalb die durch den Erreger hervorgerufene Amöbiasis in einigen Fällen einen invasiven oder einen extra-intestinalen Verlauf nimmt, weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung weiterer Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* und darauf aufbauend die Analyse ihrer biologischen Funktion für ausgewählte Kandidaten-Moleküle.

Es sollten zwei *E. histolytica*-Zelllinien des Isolates HM-1:IMSS untersucht werden, die im Tiermodell ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Pathogenität aufweisen. HM-1:IMSS-Zelllinie A ist nicht dazu befähigt Amöbenleberabszesse zu generieren, wohingegen HM-1:IMSS-Zelllinie B große Leberabszesse bildet. Dieser Aspekt sollte genutzt werden, um auf physiologischer, transkriptiver, als auch translativer Ebende Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zu finden, die putative Pathogenitätsfaktoren darstellen und dadurch in den Fokus für weiterführende Untersuchungen gestellt werden sollten.

Zunächst sollten grundlegende phänotypische Unterschiede zwischen beiden Zelllinien hinsichtlich ihres Zellwachstums, ihrer Protease-Aktivität, ihrer zytopathischen Aktivität, ihrer Stress-Resistenz und ihrer Phagozytose untersucht werden. Mit Hilfe der DIGE-Technologie sollte eine vergleichende Proteom-Analyse beider Zelllinien durchgeführt werden, mit dem Ziel differentiell translatierte Proteine anschließend mittels MALDI-TOF MS/MS-Analysen zu identifizieren. Oberflächenmoleküle von Endoparasiten stehen mit dem Wirt in Kontakt und können daher als Pathogenitätsfaktoren in Betracht gezogen werden. Deshalb sollten die Zelloberflächenmoleküle beider Zelllinien mittels Nano-LC-Technologie untersucht, und durch ein *online Elektronenspray-Triple-Quadrupole System* identifiziert werden. Die differentielle Genexpression zwischen Zelllinie A und Zelllinie B sollte mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotid-*Microarrays* dargestellt werden. Die dabei gewonnenen Daten sollten zusätzlich durch quantitative *Real-time* PCR Analysen verifiziert werden.

Ziel war es sowohl auf transkriptiver als auch translativer Ebene erhaltenen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien zu korrelieren, um Moleküle zu identifizieren, die auf beiden Ebenen differentiell reguliert waren. Die Funktion dieser Moleküle sollte mit Hilfe von Überexpressionsstudien genauer beschrieben werden. Darüber hinaus sollten von ihren Aminosäuresequenzen rekombinante Proteine synthetisiert werden, um diese für die Gewinnung polyklonaler Antikörper einzusetzen, die wiederum für Westernblot-Analysen und Lokalisationsstudien mittels IFA genutzt werden sollten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien, die nicht gesondert aufgelistet sind, wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

lpha-cyano-hydroxycinnamic acid matrix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Bind Silane	GE Healthcare, München, Deutschland
Cy2 / Cy3 / Cy5 dye minimal labeling	GE Healthcare, München, Deutschland
Cy3 / Cy5 monoreactive dye	GE Healthcare, München, Deutschland
Destreak-Lösung	GE Healthcare, München, Deutschland
Diamond Vitamin Tween 80	Amimed, Allschwil, Schweiz
Freundsches Adjuvanz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
SYPRO [®] Ruby	BIO-RAD, Hercules, USA
TRIzol [®] Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Enzyme und Enzyminhibitoren

E-64	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fast Digest [®] Enzyme	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pwo-Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase-free DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNaseOut	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
T4-DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Trypsin (10 ×)PAA Laboratories, Pasching, ÖsterreichTrypsin porcinePromega, Mannheim, Deutschland

2.1.3 Immunreagenzien

Humanserum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserum	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Anti-His-tag IgG primärer Ak (Maus)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Anti-mouse-HRP sekundärer Ak	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark
Anti-mouse ALEXA Fluor® 488	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Marker

GeneRuler TM 1 kb Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PageRuler TM Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
6 × Loading Dye (DNA-Ladepuffer)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.5 Kits

BCA Protein Assay	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
2100 Bioanalyzer	Aligent, Palo Alto, USA
Bradford Protein Assay	BIO-RAD, Hercules, USA
Cell Surface Protein Isolation Kit	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
3DNA Array 350 Kit	Genisphere, Hatfield, USA
Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden, Deutschland
660 nm Protein Assay	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA

NucleoBond [®] Xtra Midi/Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Purification Module Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
QIAamp DNA mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RealMasterMix SYBR Green Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Restore TM Westernblot Stripping Assay	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
RNase-free DNase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] -Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScriptIII First Strand Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript TM Indirect Labeling <i>Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die *Microarray*-Analyse I wurden von Illumina (San Diego, USA) synthetisiert, während die Oligonukleotide für die *Microarray*-Analyse II von Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt wurden.

Die übrigen Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer gelöst, um eine Stock-Konzentration von 100 pmol zu erzielen.

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Genotypisierung der *E. histolytica*-Zelllinien und Isolate verwendet wurden, sind der Original-Publikation zu entnehmen (Ali *et al.*, 2005).

Die Liste der Oligonukleotide, die für die *Microarray*-Analyse I eingesetzt wurden, ist der Original-Publikation zu entnehmen (Davis *et al.*, 2007).

Alle verbleibenden Oligonukleotide sind im Anhang dieser Arbeit verzeichnet.

2.2 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien, die nicht gesondert aufgelistet sind, wurden von den Herstellern Biozym (Oldendorf, Deutschland), B. Braun (Melsungen, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), Millipore (Schwalbach, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen.

Advalytic Epoxy AD100 Microarray	Ocimunbio, Ijsselstein, Niederlande
100 Epoxy Microarray	Cel Associates, Santa Clara, USA
Hybridisierungskammer	Amicon über Omnilab, Bremen, Deutschland
Micronon YM-30	Millipore, Schwalbach, Deutschland

2.2.1 Geräte

Ettan DALT 6 Unit	GE Healthcare, München, Deutschland
Ettan spot-picker robot	GE Healthcare, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM BR	Leica, Wetzlar, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
IPGphor 3 1.D Isoelectric Focusing Unit	GE Healthcare, München, Deutschland
4700 Proteomics Analyzer	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Rotor Gene 3000	Corbett, Sydney, AUS
ScanArray Express HT Scanner	PerkinElmer, Boston, USA
Typhoon Trio Imager	GE Healthcare, München, Deutschland

2.2.2 Puffer und Lösungen

Falls nicht abweichend angegeben, wurden für alle Experimente Puffer in Einfach-Konzentrationen (1×) eingesetzt.

Aktivierungspuffer für Gelatine-Gele	100 mM NaAcetat pH 5,2, 20 mM DTT, 1 % Triton X-100 (v/v)
CP-Assay-Puffer	100 mM KH_2PO_4 , 2 mM EDTA, pH 7,0 mit KOH eingestellt
MOPS-Puffer (10 ×)	200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 20 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH eingestellt, autoklaviert
NaPBS (10 ×)	67 mM Na ₂ HPO ₄ , 33 mM KH ₂ PO ₄ , 1,4 M NaCl, pH 6,8 mit HCl eingestellt, autoklaviert
SSC (20 ×)	3 M NaCl, 300 mM NaCitrat, pH 7,0 mit HCl eingestellt, autoklaviert
TBE (10 ×)	890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA, pH 8,0 mit HCl eingestellt, autoklaviert
TBS (10 ×)	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,2 mit HCl eingestellt, autoklaviert
Puffer für DIGE-Analyse	
Äquilibrierungspuffer	6 M Urea, 50 mM Tris, 30 % Glycerol (v/v), 2 % SDS (w/v), 0,5 % DTT (w/v), 0,005 % Bromphenolblau (w/v), pH 8,8 mit HCl eingestellt
Lysis-Puffer	7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS (w/v), 30 mM Tris, pH 8,5 mit HCl eingestellt

Puffer für Microarray-Analyse	
Hybridisierungspuffer	Ocimumbio, Ijsselstein, Niederlande
Blockierungspuffer	4 × SSC, 0,5 % SDS (w/v), 1 % BSA (w/v) ad. 200 mL <i>A. bidest</i> .
Waschpuffer 1	10 × SSC, 0,1 % SDS (w/v), ad 250 mL <i>A. bidest</i> .
Waschpuffer 2	5 × SSC, ad 250 mL <i>A. bidest.</i>
Waschpuffer 3	2,5 × SSC, ad 250 mL <i>A. bidest.</i>
Puffer für Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	
Puffer A	6 M Guanidinhydrochlorid, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 8,0 mit HCl eingestellt
Puffer B	8 M Urea, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 8,0 mit HCl eingestellt
Puffer C	8 M Urea, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 6,3 mit HCl eingestellt
Elutionspuffer	Puffer C, 20–500 mM Imidazol
Puffer für SDS-PAGE	
Elektrophorese-Puffer (10 ×)	0,25 M Tris, 0,5 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3 mit HCl eingestellt, autoklaviert
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris, 0,4 % SDS, ad 500 mL <i>A. bidest.</i> , pH 6,8 mit HCl eingestellt, steril filtriert
SDS-Probenpuffer (2 ×)	125 mM Tris, 20 % Glycerin (v/v), 2 % SDS (w/v), 20 mM DTT, 0,001 % Bromphenolblau (w/v), pH 6,8 mit HCl eingestellt, steril filtriert

Trenngel-Puffer	1,5 M Tris, 0,4 % SDS, ad 500 mL A. bidest.,
	pH 8,8 mit HCl eingestellt, steril filtriert

Puffer für Westernblots und ECL-Detektion

Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver in TBS (w/v)
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % MeOH (v/v), pH 8,3 mit HCl eingestellt
Waschpuffer	0,05 % Tween in TBS (v/v)
Lösung A	0,1 M Tris, 1,25 mM Luminol, ad. 200 mL A. bidest., pH 8,6 mit HCl eingestellt
Lösung B	6,7 mM Parahydroxycoumarinsäure, 10 mL DMSO

Lösungen für Transfektion von E. histolytica

Cytomix-StammLösung	1 M KCl, 1 M CaCl ₂ , 0,5 M K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO 0,5 M HEPES, 0,5 M EGTA, 1 M MgCl ₂ , pH 7, mit KOH eingestellt, steril filtriert	
Komplettierte Cytomix-Lösung	Cytomix-StammLösung, 10,1 mM APS, 9,8 mM Glutathion	
Paraformaldehyd-Lösung (40%)	40 % Paraformaldehyd (w/v), 1 M NaOH (70°C)	
Proteinfärbung		
Coomassie-Entfärbelösung	50 % MeOH, 40 % <i>A. bidest.</i> , 10 % Essigsäure (v/v)	
Coomassie-Färbelösung	50 % MeOH, 40 % A. <i>bidest.</i> , 10 % Essigsäure (v/v), 0,05% Coomassie brilliant blue R-250 (w/v)	

SYPRO Ruby-Proteinfärbung	
Entfärbelösung	10 % MeOH (v/v), 7 % Essigsäure (v/v) in A.
	bidest.
Fixierlösung	50 % MeOH (v/v), 7 % Essigsäure (v/v) in A.
	bidest.

2.2.3 Antibiotika

Ampicillin	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
G418	PAA Laboratories, Pasching, Östereich
Penicillin	Grünenthal, Aachen, Deutschland
Streptomycin	Riemer Arzneimittel, Greifswald, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.1: Antibiotika

Antibiotikum	StammLösung in A. bidest.	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/mL	100 μg/mL in LB-Medium
G418	50 mg/mL	10-50 µg/mL in TYI-S-33-Medium
Kanamycin	50 mg/mL	50 μg/mL in LB-Medium
Penicillin	$2 \times 10^5 $ U/mL	200 U/mL in TY-Medium
Streptomycin	200 mg/mL	200 µg/mL in TYI-S-33-Medium

Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Kulturmedien und Medienzusätze

Ham's F12-Medium	PAA, Pasching, Österreich	
KomLettiertes Ham's F12-Medium	Ham's F12, 10 % FCS (v/v), 1 % 100 × Penicillin/Streptomycin (v/v)	
LB-Agar	32 g Lennox L Broth Agar, ad 1 l A. bidest., autoklaviert	
LB-Medium	20 g Lennox L Broth Base, ad 1 1 A. bidest., autoklaviert	
Einfrier-Medium für E. histolytica	10 mL DMSO, 6 mL 50 % Sucrose, 84 mL komplettes TY-I-SS-Medium	
TYI-S-33-Medium	80 g Trypticase, 40 g Hefeextrakt, 40 g Glukose, 8 g NaCl, 4 g K ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ , 4 g L-Cystein, 0,8 g Ascorbinsäure, 91,2 mg Fe-Ammoniumcitrat, ad. 3.480 mL <i>A. bidest.</i> , pH 6,8 mit NaOH eingestellt, autoklaviert	
Komplettiertes TYI-S-33-Medium	400 mL TY-I-SS-Medium, 50 mL inaktiviertes Rinderserum (2 x 30 min bei 56°C), 15 mL Vitamin-Mix <i>Diamond Vitamin Tween 80</i> , 60 mg Streptomycin, 50 mg Penicillin	

2.3 Organismen und Plasmide

2.3.1 Organismen

2.3.1.1 Bakterien

Tabelle 2.2: Escherichia coli-Stämme

Bakterienstamm	Relevanter Genotyp	Referenz
One Shot Top 10 TM	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 lacX74 deoR rec A1 araD139 Δ(araleu)7697 gal U gal K rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen
pAPlacI ^Q	[pAPlacI ^Q]	O. Fayet, Toulouse

2.3.1.2 Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen

In dieser Arbeit wurden CHO-Zellen des K1-Wildtyps (ATCC-Nr. CCL-61) verwendet.

2.3.1.3 Entamoeba histolytica

Systematik:

Domäne: Eukaryota

Stamm: Amoebozoa

Klasse: Archamoebe

Gattung: Entamoeba

Art: Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903)

E. histolytica-Zelllinie	Anmerkungen	Bezug
HM-1:IMSS-Zelllinie A	1967 aus einem Patienten mit Kolitis isoliert (ATCC-Nr. 30459) Referenz-Zelllinie des Genomprojekts (Loftus <i>et al.</i> , 2005) Seit 2001 am BNI in axenischer Kultur	B. Mann, Universität von Virginia, 2001
HM-1:IMSS-Zelllinie B	1967 aus einem Patienten mit Kolitis isoliert (ATCC-Nr. 30459) Seit 1991 kontinuierlich am BNI in axenischer Kultur	ATCC, 1991
НК-9	Isoliert aus einem Patienten mit Amöbendiarrhöe (ATCC-Nr. 30015)	ATCC
200:NIH	1949 aus einem Patienten mit Amöbenkolitis isoliert (ATCC-Nr. 30458)	ATCC
Rahman	1972 aus einem Patienten mit asymptomatischen Amöbiasis-Verlauf isoliert (ATCC-Nr. 50738)	ATCC

 Tabelle 2.3: Entamoeba histolytica Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei *E. histolytica*-Zelllinien verwendet. Beide stammen von dem Kultur-Isolat HM-1:IMSS, das in der *American Type Culture Collection* (ATCC) unter der Katalog-Nummer 30459 geführt wird. Diese Zellen wurden ursprünglich aus einer Kolon-Biopsie eines adulten, männlichen Amöbenkolitis-Patienten im Jahr 1967 in Mexiko isoliert. HM-1:IMSS-Zelllinie A wurde für die Genom-Sequenzanalyse eingesetzt (Loftus *et al.*, 2005) und ein Teil dieser Kultur wurde im Jahr 2001 durch B. Mann von der Universität von Verginia (Charlottesville, VA, USA) an das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin gesendet und wird dort seitdem axenisch kultiviert. HM-1:IMSS-Zelllinie B hingegen wurde im Jahr 1991 direkt von der ATCC bezogen und wird seitdem im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin unter axenischen Bedingungen kultiviert.

2.3.1.4 Meriones unguiculatus

Systematik:

Stamm: Chordata

Klasse: Mammalia

Ordnung:

Überfamilie: Muroidea

Familie: Muridae

Unterfamilie: Gerbillinae

Gattung: Meriones

Art: Meriones unguiculatus (Mongolische Rennmaus) (MILNE EDWARDS, 1867)

2.3.1.5 Mus musculus

Systematik:

Stamm: Chordata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Rodentia

Überfamilie: Muroidae

Familie: Muridae

Unterfamilie: Murinae

Gattung: Mus

Art: Mus Musculus (Hausmaus) (LINNAEUS, 1758)

In dieser Arbeit wurde mit weiblichen BALB/c-Mäusen gearbeitet. Dieser Albino-Laborstamm entstand aus einer Inzuchtlinie die sich durch eine erhöhte TH₂-Zell-Reaktion des Immunsystems auszeichnet und sich dadurch besonders für die Generierung von polyklonalen Antikörpern eignet.
2.3.2 Plasmide

Plasmid	Größe	Relevante Charakteristika	Referenz
pCR [®] II-TOPO	4,0 kB	Siehe Herstellerangaben	Invitrogen
pJC45	2,4 kB	Amp ^r , colE1 ori, T7-Pol. unter λpL-lac Operator, 10 His, Faktor Xa, Terminator	(Clos und Brandau, 1994)
pNC	6,0 kB	Neo ^r , 5'/3'-Aktin-Bereiche und Lektin-Promotor aus <i>E. histolytica</i>	(Wassmann <i>et al.</i> , 1999)

Tabelle 2.4: Klonierungs- und Expressionsvektoren

Die Plasmide liegen in entsprechenden *E. coli*-Zellen vor und werden als Bakterien-Stocks bei –70°C gelagert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von E. histolytica

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden unter axenischen Bedingungen in komplettem TYI-S-33-Medium (Diamond *et al.*, 1978) bei maximal 5 % O₂ und 35°C in Kulturflaschen aus Polystyrene kultiviert. Die Zellkulturen wurden dreimal pro Woche verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt, um ein logarithmisches Wachstum aufrecht zu erhalten. Die Zelldichte wurde mikroskopisch bestimmt. Das Ablösen der Zellen erfolgte für 5–10 min auf Eis.

Um Amöbenkultur-Stocks anzulegen, wurden Zellen aus einer 75 mL-Kulturflasche zum Zeitpunkt ihrer späten logarithmischen Wachstumsphase in 5 mL Einfrier-Medium für ca. 10 min auf Eis abgelöst und in Kryo-Reaktionsgefäßen für 24 h bei –70°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff überführt wurden.

2.4.2 Zellernte

Vorbereitend für verschiedene Experimente wurden 1×10^6 Trophozoiten 24 h vor Zellernte in eine 75 mL-Kulturflasche gesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Zum Erntezeitpunkt befanden sich die Zellen in der späten logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden für 5–10 min auf Eis abgelöst, bei $200 \times g$ für 5 min bei 4°C sedimentiert und zweimal mit eiskaltem NaPBS gewaschen.

2.4.3 Kultivierung von E. histolytica unter Hitzestress

Im Unterschied zur Standard-Zellkultur wurden 1×10^6 Trophozoiten bei 39°C kultiviert. Die durchschnittliche Überlebensrate wurde nach 24, 48, 72 und 96 h mikroskopisch ermittelt.

2.4.4 Kultivierung von *E. histolytica* in Gegenwart von humanem, aktivem Komplement

Abweichend von der Standard-Zellkultur wurden 1.500 Trophozoiten pro *Well* in komplettem TYI-S-33-Medium unter anaeroben Bedingungen durch Verwendung von *Anaerocult* (Merck) in 24-*Well* Kulturplatten kultiviert. Dabei wurden 10 % ABS in verschiedenen Verdünnungsstufen (2, 4, 6, 8 und 10 %) durch Humanserum mit aktivem Komplementsystem (Invitrogen) ersetzt. Die durchschnittliche Überlebensrate wurde nach 24, 48, 72 und 96 h mikroskopisch bestimmt. Als Kontrolle dienten Amöben, die in komplettem TYI-S-33-Medium kultiviert wurden.

2.4.5 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium (Sambrook und Gething, 1989) erfolgte unter aeroben Bedingungen in Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (150–200 rpm) bei 37°C.

Um Bakterien-Stocks anzulegen, wurden die Zellkulturen nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 15 % (v/v) sterilem Glycerin in LB-Medium versetzt und bei -70° C gelagert.

2.4.6 Kultivierung von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden in 5 mL komplettem Ham's F12-Medium (PAA) unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Die Zellkultur wurde zweimal pro Woche verdünnt und in neue Kulturflaschen überführt, um einen einschichtigen Zellrasen zu erhalten. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 μ L 1 × Trypsin (PAA), dessen Wirkung nach einer Inkubation von 5–10 min bei RT mit 5 mL frischem Ham's F12-Medium gestoppt wurde.

2.4.7 Bestimmung der zytopathischen Aktivität von E. histolytica

Nach einer modifizierten Methode von (Bracha und Mirelman, 1984) wurde anhand der Zerstörung eines CHO-Zellrasens die zytopathische Aktivität von E. histolytica abgeleitet. Dafür wurden 1×10^5 CHO-Zellen pro *Well* für 24 h in komplettem Ham's F12-Medium in 24-Well Kulturplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 37°C warmem Ham's F12-Medium gewaschen und in 37°C warmem Ham's F12-Medium aufgenommen. 1×10^5 E. histolytica Trophozoiten wurden in TYI-S-33-Medium gewaschen und zu den CHO-Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ für 30 min bei 37°C. Die Kulturplatten wurden dann für 15 min auf Eis inkubiert, was das Ablösen der Trophozoiten bewirkte. Im Folgenden wurden die Zellen mit NaPBS gewaschen und für 2 min mit 4 % Formaldehyd in NaPBS (v/v) fixiert. Nach dem erneuten Waschen der Zellen mit NaPBS, wurden sie in 0,1 % Methylenblau in NaPBS (w/v) für 10 min gefärbt. Anschließend wurden sie aufeinander folgend mit 0,01 % Methylenblau in NaPBS (w/v), und mit NaPBS gewaschen. Die CHO-Zellen wurden durch Zugabe von 0,1 M HCl für 30 min bei 37°C lysiert. Die freigesetzte Menge Methylenblau ist proportional zum Anteil verbliebener CHO-Zellen und konnte über die Absorption bei 660 nm photometrisch gemessen werden. Als Kontrolle dienten CHO-Zellen, die ohne Trophozoiten kultiviert wurden.

2.4.8 Bestimmung der Erythrophagozytose-Rate bei E. histolytica

Mit Hilfe von Erythrozyten wurde die Phagozytose-Rate der Trophozoiten ermittelt (Mora-Galindo *et al.*, 1997; Trissl *et al.*, 1978). Zunächst wurden sowohl humane Erythrozyten (Blutgruppe 0, Rhesus positiv) als auch Trophozoiten zweimal mit inkomplettem TYI-S-33-

Medium gewaschen und bei 200 × g für 5 min sedimentiert. Ca. 2×10^7 Erythrozyten und 2×10^5 Amöben (Verhältnis 100:1) wurden anschließend in einem Endvolumen von 400 µL inkomplettem TYI-S-33-Medium gemischt und für 0, 5, 10, 20 und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von *A. bidest.* wurden nicht phagozytierte Erythrozyten lysiert. Die Trophozoiten wurden mit NaPBS gewaschen. Nachdem die Amöben durch 90 % (v/v) Ameisensäure lysiert wurden, konnte die durchschnittliche Anzahl phagozytierter Erythrozyten über die Absorption des intrazellulären Hämoglobins photometrisch bei 397 nm gemessen werden. Amöben, die ohne Erythrozyten inkubiert wurden, dienten als Kontrolle.

2.4.9 Bestimmung der Digestionsrate phagozytierter Zellen bei E. histolytica

Pro *Well* wurden 5×10^4 Trophozoiten in komplettem TYI-S-33-Medium in einer 24-*Well* Kulturplatte für 24 h unter anaeroben Bedingungen durch die Verwendung von *Anaerocult* (Merck) bei 35°C kultiviert. Das Medium wurde entfernt und 1×10^9 humane Erythrozyten in 1 mL TYI-S-33-Medium zu den Amöben gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium erneut entfernt und nicht-phagozytierte Erythrozyten durch die Zugabe von 1 mL 37°C warmem *A. bidest.* lysiert. Für ein Experiment wurden zwei identische 24-*Well* Kulturplatten vorbereitet. In der ersten wurden die Amöben in 100 µL TYI-S-33-Medium resuspendiert und die Anzahl phagozytierter Erythrozyten pro Trophozoit mikroskopisch bestimmt. In der zweiten Platte wurde 1 mL TYI-S-33-Medium zu den Zellen gegeben und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurde erneut die Anzahl phagozytierter Erythrozyten terneut die Anzahl phagozytierter Erythrozyten zu den Zellen gegeben und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurde erneut die Anzahl phagozytierter Erythrozyten pro Trophozoit

2.4.10 Quantifizierung des Rosettings bei E. histolytica

Es wurden 1×10^6 Trophozoiten in komplettem TYI-S-33-Medium bei 35°C kultiviert und nach 24 h durch Abkühlen auf Eis in 1 mL Medium geerntet. 10 µL dieser Zell-Suspension wurden auf einem Objektträger mit 1 µL humanen Erythrozyten (ca. 5×10^6) gemischt. Das Phänomen des *Rosettings* von Erythrozyten konnte mikroskopisch detektiert werden. Dabei wurde definiert, dass eine Rosette aus mindestens fünf Erythrozyten besteht, die an einem Trophozoiten aggregieren.

2.4.11 Induktion von Amöbenleberabszessen in M. unguiculatus

Die Fähigkeit der Trophozoiten, Amöbenleberabszesse (ALA) zu bilden, wurde im Tiermodell untersucht. Hierfür wurden Amöben geerntet (siehe 2.3.2) und 1×10^6 Trophozoiten in einem Endvolumen von 100 µL komplettem TYI-S-33-Medium in den linken Leberlappen eines acht Wochen alten Wüstenrennmaus-Männchens injiziert (Lotter *et al.*, 2000). Nach sieben Tagen wurden die Größe und das Gewicht der Leberabszesse bestimmt. Dieses Experiment wurde unter tierärztlicher Aufsicht von PD Dr. med. vet. H. Lotter durchgeführt.

2.4.12 Immunfluoreszenz-Analyse (IFA) in E. histolytica

Mit Hilfe dieser Technik konnten E. histolytica-Proteine intrazellulär bzw. extrazellulär durch fluoreszierende Antikörper lokalisiert werden. Die Amöben wurden kultiviert und geerntet (siehe 2.3.2), bevor 3×10^6 Trophozoiten in NaPBS gewaschen und bei $200 \times g$ sedimentiert wurden. Das folgende Protokoll wurde bei RT durchgeführt. Dabei erfolgten alle Inkubationsschritte auf einem Schüttler (200-300 rpm) und alle Zentrifugationsschritte wurden bei $200 \times g$ für 3 min durchgeführt. Die Trophozoiten wurden in 3 % Paraformaldehyd in NaPBS (v/v) für 30 min fixiert. Unter permeabilisierenden Bedingungen wurden die Zellen anschließend für 5 min mit 0,05 % Saponin in NaPBS (w/v), bzw. unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen mit NaPBS inkubiert. Freie Aldehydgruppen wurden mit 50 mM NH₄Cl in NaPBS für 15 min blockiert. Die Zellen wurden in NaPBS gewaschen bevor sie für 10 min in 2 % FCS in NaPBS (v/v) inkubierten, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Nachdem die Amöben erneut in NaPBS gewaschen worden sind, wurden sie für 1 h mit dem ersten Antikörper, Anti-EhFe-Hydrogenase (1:300 in NaPBS verdünnt) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in NaPBS gewaschen und für 1 h mit dem DNA-Marker DAPI (1:100 in NaPBS verdünnt) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper, Anti-mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:300 in NaPBS verdünnt), der sich gegen IgG des Primär-Antikörper-Donors richtet, im Dunkeln inkubiert. Erneut wurden die Amöben dreimal mit NaPBS gewaschen und in 100 µL NaPBS resuspendiert. Die Proben waren mehrere Tage im Dunkeln bei 4°C stabil und wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop DM BR (Leica) analysiert und mit Hilfe des Programms Open Lab 4.0.4 (PerkinElmer) bearbeitet.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Isolierung von NaPBS-löslichen und Urea-löslichen Proteinen aus *E. histolytica*

Für die Isolierung von Proteinen wurden die Zellen zunächst wie beschrieben geerntet (siehe 2.4.2). Um autoproteolytische Prozesse zu minimieren wurden die Zellen mit 50 μ M trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamino-(4-Guanodino)butane (E64) (Sigma-Aldrich) versetzt. Die Amöben wurden nach der *"Freeze and Thaw"*-Methode mechanisch aufgeschlossen, indem sie fünfmal alternierend in flüssigem Stickstoff gefroren, bei RT aufgetaut und via *vortexing* gemischt wurden. Die Zellfragmente wurden erneut mit 30 μ M E64 versetzt und bei 40.000 × *g* für 1 h bei 4°C sedimentiert. Der Überstand enthält die NaPBS-löslichen Proteine (LP). Das Zellsediment wurde zweimal mit NaPBS gewaschen und in Lysispuffer gelöst. Das Lysat wurde bei 40.000 × *g* für 1 h bei 4°C sedimentiert. Der Überstand bildet die Urea-lösliche Proteinfraktion (ULP). Die Proteine wurden bei -70°C gelagert.

2.5.2 Isolierung von Membranoberflächen-Proteinen aus E. histolytica

Um Membranoberflächen-Proteine aus *E. histolytica*-Trophozoiten zu isolieren, wurde mit dem *Cell Surface Protein Isolation* Kit (Pierce) gearbeitet. Dabei werden die Oberflächenproteine von vitalen Zellen über ihre Lysin-Reste mit Sulfo-NHS-SS-Biotin markiert. Nicht gebundenes Biotin wird mit einer *Quenching*-Lösung blockiert. Die Zellen werden lysiert und das Lysat wird auf eine Avidin-haltige Säule überführt. Dabei binden die Oberflächenproteine über das Biotin an Avidin, nicht-biotinylierte Proteine werden von der Säule gewaschen. Eine Behandlung der verbleibenden Ziel-Proteine mit SDS-Probenpuffer und 50 mM DTT, ohne Bromphenol, hat die Spaltung der Disulfid-Brücke im Sulfo-NHS-SS-Biotin-Molekül zur Folge und ermöglicht ihre Elution.

Für die Isolierung wurden 1×10^6 Trophozoiten für 24 h bei 35°C in 75 mL-Kulturflaschen kultiviert, in 250 mL-Kulturflaschen überführt und für weitere 24 h bei 35°C inkubiert. Dies wurde in vier parallelen Ansätzen vorbereitet. Die Zellen wurden geerntet (siehe 2.4.2) und ihre Oberflächen-Proteine nach Angaben des Herstellers isoliert. Abweichend vom Protokoll wurden die auf der Avidin-Säule gebundenen Ziel-Proteine mit 0,5 % SDS in Waschpuffer (w/v) behandelt, um bestehende Protein-Komplexe zu zerstören und dadurch ausschließlich Oberflächen-Proteine anzureichern.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.5.3.1 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Dieses Verfahren beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex mit Proteinen bilden. Das so reduzierte Kupfer kann mit BCA reagieren, was einen Farbumschlag der Lösung zur Folge hat. Der BCA-Test (Pierce) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde bei 562 nm photometrisch gegen eine Eichgerade mit BSA (0–1 mg/mL) gemessen.

2.5.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Fähigkeit des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue in sauren Lösungen sowohl mit kationischen als auch hydrophoben Seitenketten von Proteinen Komplexe bilden zu können. Diese Reaktion hat eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zur Folge. Der Proteintest (BIO-RAD) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde bei 595 nm photometrisch gegen eine Eichgerade mit BSA (0–1 mg/mL) gemessen.

2.5.3.3 Proteinbestimmung Detergenzien-haltiger Proben

Mit Hilfe des 660 nm Protein-Tests (Pierce) ist es möglich die Proteinmenge in Detergenzienhaltigen Lösungen zu bestimmen. Bei dieser kolorimetrischen Methode bildet der eingesetzte Farbstoff in sauren Lösungen mit basischen Seitenketten von Proteinen Komplexe aus, was einen Farbumschlag zur Folge hat. Der Test wurde den Vorgaben des Herstellers folgend durchgeführt. Die Absorption wurde bei 660 nm gemessen. Mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden (0–1 mg/mL) konnte der Proteingehalt ermittelt werden.

2.5.4 Bestimmung der proteolytischen Cysteinpeptidase-Aktivität von *E. histolytica*

Die proteolytische Aktivität der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* wurde gegenüber dem synthetischen Peptid Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid (Z-Arg-Arg-pNA) untersucht (Leippe *et al.*, 1995). Bis zu 10 μ L eines in NaPBS-löslichen Amöben-Proteinextrakts (siehe 2.5.1) wurden mit 990 μ L CP-Puffer, dem 1 mM DTT zugegeben

wurde, versetzt. Durch Zugabe von 10 μ L 10 mM Z-Arg-Arg-pNA in MeOH wurde die Reaktion gestartet und für 10 min bei RT inkubiert. Die Absorption, verursacht durch die Abspaltung des p-Nitroanilins, wurde bei 405 nm photometrisch gemessen. 1 Unit (U) enzymatischer Aktivität ist definiert als die Menge Probe, welche die Reduktion von 1 μ mol/min p-Nitroanilins katalysiert. Die Volumenaktivität des Enzyms (mU/mL) wurde nach folgender Formel berechnet:

Volumenaktivität = ($\Delta E \times V_{\text{Messlösung}} \times 1.000$) / (t x $\varepsilon_{\mu mol} \times d \times V_{\text{Probe}}$)

1U	= 1 umol Substratumsatz/min
ΔE	= zeitabhängige Differenz der Absorptionswerte
t	= Zeit (min)
$\epsilon_{\mu mol}$	= 8,8 cm ² / μ mol (Extinktionskoeffizient für Substanz-Stoffkonstante)
d	= Durchmesser der Küvette (cm)
V _{Probe}	= Volumen der eingesetzten Probe (mL)

2.5.5 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von E. histolytica

Humane Erythrozyten (Blutgruppe 0, Rhesus positiv) und Trophozoiten wurden separat in eiskaltem NaPBS gewaschen und bei $200 \times g$ für 10 min bei 4°C sedimentiert. Ca. $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten und $1,25 \times 10^5$ Amöben (Verhältnis 2.000:1) wurden gemischt und für 1 h bei 37° C inkubiert (Ankri *et al.*, 1998). Anschließend wurden die Zellen bei $1.200 \times g$ sedimentiert und die Absorption des im Überstand befindlichen Hämoglobins bei 570 nm photometrisch gemessen. Als Kontrollen dienten reine Erythrozyten- bzw. Trophozoiten-Proben.

2.5.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung und zur Molekulargewichtsbestimmung von komplexen Proteinproben oder einzelnen Proteinen wurde unter denaturierenden Bedingungen eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. In 12 %igen Trenngelen wurden die Proteine in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse getrennt.

Reagenzien	Trenngel	Sammelgel
	(12 % Acrylamid)	(4 % Acrylamid)
4 x Gelpuffer	1,88 mL	1,25 mL
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (37,5:1)	3,0 mL	0,65 mL
A. bidest.	2,6 mL	3,05 mL
25 % APS (w/v)	25 μL	25 μL
TEMED	5 µL	5 µL

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der Gel-Lösungen für SDS-PAGE

Die Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit 2 × SDS-Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in vertikalen Einweg-Gel-Systemen (Invitrogen) in Elektrophoresepuffer bei 20–25 mA/Gel und 120 V.

2.5.7 Coomassie-Proteinfärbung

Zur unspezifischen Färbung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele üN in Coomassie-Färbelösung bei 4°C geschwenkt (Neuhoff *et al.*, 1988). Die Gele wurden unter mehrmaligem Wechsel der Lösungen bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt und abschließend bis zur vollständigen Rehydrierung in *A. bidest.* inkubiert.

2.5.8 Westernblot-Analyse und Detektion

Das Verfahren des Western-Blots ermöglicht den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran. Hierfür wurde die Nassblot-Technik angewendet. Der Transfer erfolgte unter Einsatz des Transferpuffers bei 400 mA für 1h.

Die so auf der Membran fixierten Proteine konnten mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler (200–300 rpm). Zur Sättigung freier unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 30 min und RT in Blockierungspuffer blockiert. Es folgte die Inkubation mit einem primären Antikörper im Verhältnis 1:300–1:2.000 in Blockierungspuffer üN bei 4°C. Die Membran wurde dreimal für 20 min mit Waschpuffer behandelt, um anschließend mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper im Verhältnis 1:2.000–1:10.000 in Blockierungspuffer für 2 h bei RT inkubiert zu werden. Die Membran wurde danach zweimal in Waschpuffer und schließlich in TBS für jeweils 20 min gewaschen. Die ECL-Entwicklerlösung, bestehend aus 5 mL Lösung

A, 500 μ L Lösung B und 1,5 μ L 30 % H₂O₂, wurde frisch angesetzt, auf die Membran pipettiert und für 0,5–5 min bei RT inkubiert; mit *A. bidest.* wurde die Reaktion gestoppt. Ein ECL-Film wurde mit der Membran je nach Signalstärke für 0,5–10 min exponiert und der Film wurde abschließend entwickelt.

Zur Reanalyse derselben Proben wurden die Membranen nach Angaben des Herstellers mit *RestoreTM Westernblot Stripping Puffer* (Thermo Scientific) behandelt.

2.5.9 Zweidimensionale differentielle in-Gel Elektrophorese (DIGE)

Die DIGE-Technologie erlaubt die Trennung von Proteinen entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (IP) während der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) und entsprechend ihrer molekularen Masse während der Elektrophorese in einem vertikalen Acrylamidgel (2. Dimension). Im Gegensatz zu einer konventionellen 2D-Gelelektrophorese können zwei verschiedene Protein-Proben selektiv mit unterschiedlichen Cy-Farbstoffen markiert, und gemeinsam in einem Gel getrennt werden. Die Farbstoffe der markierten Proteine lassen sich mit Hilfe eines *Lasers* entsprechender Wellenlänge detektieren. Dies erlaubt die Zuordnung eines Protein-S*pots* zur entsprechenden Probe. Ganz entscheidend ist dabei der Vorteil, dass dadurch Proteine, die exklusiv in einer Probe enthalten sind, erkannt werden und somit eine Detektion differentieller Proteinregulation zwischen zwei Proben ermöglicht wird.



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines DIGE-Experiments 1. Mischen der fluoreszenzmarkierten Protein-Extrakte 2. Trennen des Proteingemischs mittels isoelektrischer Fokussierung (1. Dimension) und Acrylamidgelelektrophorese (2. Dimension) 3. Detektion der Cy3- und Cy5-Protein-Signale. Die Signale beider Proben wurden in den Falschfarben Grün (Cy3) und Rot (Cy5) dargestellt. Diese Signale wurden rechnerisch übereinander gelegt, was zu einer *Overlay*-Darstellung führt. Fusionssignale beider Proben erscheinen in Gelb. Differentiell synthetisierte Proteine einer Probe erscheinen entsprechend in Grün bzw. Rot

In dieser Arbeit wurden sowohl NaPBS-lösliche als auch Urea-lösliche Proteine beider HM-1:IMSS-Zelllinien mit Hilfe der DIGE-Technologie analysiert. Sie wurden während der isoelektrischen Fokussierung sowohl in einem pH-Gradienten von pH 3–11 (nicht-linear), als auch von pH 4–7 (linear) getrennt. Die Experimente wurden mit drei biologischen Replikaten und einem *Dye-Swap* (probenspezifischer Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe) durchgeführt. Eine der Proben wurde mit Cy3, die andere mit Cy5 markiert. Durch die Wahl eines internen Proteinstandards, der in jedem Gel eingesetzt wurde, ließen sich die Daten aller Gele normalisieren und miteinander vergleichen. Dieser Standard bestand aus einer Mischung der Proteinextrakte aller Proben und wurde mit Cy2 markiert.

2.5.9.1 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die Proteinfraktionen wurden isoliert (siehe 2.5.1) und ihre Konzentration mit Hilfe des Bradford Protein Assays (siehe 2.5.3.2) bestimmt. 50 μ g jeder Probe wurden mit 400 pmol N-hydroxy-succinimidyl-Esterderivaten der Cyanin-Farbstoffe Cy2, Cy3 und Cy5 (GE Healthcare) entsprechend den Herstellerangaben markiert. Die Farbstoffe binden an Lysin-Reste der Probe, statistisch betrachtet werden dadurch ca. 1–3 % der Probe fluoreszenzmarkiert (*minimal labeling*). Ungebundene Cy-Moleküle konnten dadurch mit 1 μ L 10 mM Lysin und einer Inkubation für 10 min auf Eis im Dunkeln blockiert werden.

2.5.9.2 Isoelektrische Fokussierung von Proteinen

Die unterschiedlich markierten Proteine (siehe 2.5.9.1) wurden vereinigt, in einem Endvolumen von 150 µL Lysispuffer (siehe 2.2.2) mit 2 % DTT (w/v) reduziert, anschließend mit 2 % Ampholyten (pH 3–11 bzw. pH 4–7) (v/v) (GE Healthcare) komplettiert und für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die 24 cm langen *Immobilized pH gradient* (IPG) Streifen (GE Healthcare) wurden zuvor in 450 µL *Destreak Lösung* (GE Healthcare) mit 0,5 % der entsprechenden Ampholyte (v/v) für 12 h im Dunkeln rehydriert. Für die isoelektrische Fokussierung wurden die Proben auf die IPG-Streifen geladen und mit Hilfe einer *IPGphor 3 First Dimension Isoelectric Focusing Unit* (GE Healthcare) für 50–55 kVh getrennt.

2.5.9.3 Gelelekrophoretische Trennung von Proteinen

Die isoelektrisch fokussierten Proteine (siehe 2.5.9.2) wurden mit 0,06 M DTT in Äquilibrierungspuffer (w/v) reduziert und in 0,14 M Iodacetamid in Äquilibrierungspuffer (w/v) alkyliert, bevor sie mit Äquilibrierungspuffer gewaschen wurden. Die IPG-Streifen wurden auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.5.6) überführt und die Trennung der Proteine mit Hilfe einer *Ettan DALT 6 unit* (GE Healthcare) bei 10 mA/Gel und 16°C erzielt. Vor Beginn der SDS-PAGE wurden die Glasplatten der Gel-Systeme einseitig mit *Bind-Silane* (GE Healthcare) behandelt, um eine stabile Haftung einer Gel-Seite an ihrem Untergrund zu gewährleisten.

2.5.9.4 Lokalisierung von Protein-Spots mit Hilfe von SYPRO Ruby

Da nur ca. 1-3 % der Proteine einer Probe mit den Cy-Farbstoffen markiert werden, entstehen zwei Proben-Populationen. Die 1-3 % markierten Proteine erhalten je nach verwendetem Cy-Molekül eine zusätzliche Masse von 434–464 Da und unterscheiden sich dadurch von den 97-99 % der übrigen Probe. Besonders im niedermolekularen Bereich bedingt dies erhebliche Verschiebungen der Proteinposition markierter und nicht markierter Proben-Populationen nach ihrer Trennung im Acrylamidgel (Hrebicek, 2007). Bleibt dieser Aspekt unbeachtet, hat dies den Verlust der hohen Sensitivität der DIGE-Technologie zur Folge. Um den Faktor der Verschiebung sichtbar zu machen, wurden DIGE-Gele zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby gefärbt, wodurch alle Proteine eingefärbt werden. Zunächst wurde die Cy-Färbung mit Hilfe eines Typhoon Trio Imager (GE Healthcare) (siehe 2.2.1) und anschließend die SYPRO Ruby-Färbung mit der Exzitations-/EmissionsWellenlänge von 530 nm/590 nm detektiert. Die beobachtete Verschiebung der Proteinposition wurde für die automatische Isolierung der Protein-*Spots* berücksichtigt.

Alle folgenden Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler (50–100 rpm) und RT durchgeführt. Die Gele wurden in Fixier-Lösung für 30 min inkubiert, bevor diese ausgetauscht, und die Gele üN weiter inkubiert wurden. Die Gele wurden einmal mit *A. bidest.* für 5 min gewaschen und dann mit *SYPRO*[®] *Ruby* (BIO-RAD) üN gefärbt. Um das Hintergrundsignal zu minimieren, wurden die Gele zweimal für 30 min mit Entfärbelösung, und zweimal mit *A. bidest.* für 5 min gewaschen. Abschließend wurden die Gele bis zur vollständigen Rehydrierung in *A. bidest.* inkubiert.

2.5.9.5 Auswertung und Normalisierung der DIGE-Daten

Die SDS-Polyacrylamidgele (siehe 2.5.6) wurden nach der Trennung der Proteine mit einem *Typhoon Trio Imager* (GE Healthcare) mit Exzitations-/Emissions-Wellenlängen spezifisch für Cy2 (488 nm/520 nm), Cy3 (532 nm/580 nm) und Cy5 (633 nm/670 nm) detektiert. Die Bilder wurden mit Hilfe der *DeCyder Differential In-Gel Analysis Software* (DIA) (GE Healthcare) analysiert.

Um statistisch relevante Datensätze zu erhalten, wurden die Ergebnisse von drei verschiedenen biologischen Replikaten mit der *DeCyder Biological Variation Analysis Software* (BVA) (GE Healthcare) miteinander vernetzt und abgeglichen. Die Vernetzung der Daten verschiedener Gele wurde über den internen Proteinstandard ermöglicht, der eine Mischung aller Protein-Proben, die in einem Experiment analysiert wurden, repräsentierte.

Differentielle Protein-*Spots* zwischen beiden Proben, definiert durch einen Grenzwert von 2,5, konnten mit Hilfe der *DIA-Software* identifiziert werden. Ihre Position im Gel konnte einem *Ettan Spot-Picker Robot* (GE Healthcare) übermittelt werden, woraufhin die ausgewählten Protein-*Spots* ausgestanzt, und in eine 96-*Well* Kulturplatte überführt wurden. Um die korrekte Isolierung des Protein-*Spots* zu überprüfen, wurden die Gele erneut detektiert. Die isolierten Gelstücke konnten bei –20°C gelagert werden oder direkt für einen tryptischen Protein-Verdau eingesetzt werden.

2.5.10 Tryptischer Verdau von Proteinen für *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI TOF MS)-Analyse

Um die differentiellen Protein-Spots, die aus den DIGE-Analysen gewonnen wurden (siehe 2.5.9.5) identifizieren zu können, wurden sie durch einen Verdau mit Trypsin in Peptidfragmente gespalten. In dieser Form wurden sie für die *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI TOF MS)-Analyse eingesetzt und ihre Aminosäure-Sequenz ermittelt werden. Durch Datenbank-Recherche konnten die Sequenzen identifiziert werden.

Die Gelstücke (siehe 2.5.9.5) wurden dreimal mit HPLC-H₂O und zweimal mit 50 % Acetonitril (ACN) in HPLC-H₂O und 25 mM NH₄HCO₃ in HPLC-H₂O (v/v) für jeweils 3 min gewaschen, um anschließend in ACN für 5–10 min dehydriert zu werden. Die Serinpeptidase Trypsin spalten nach den Aminosäuren Lysin oder Arginin. Um die Proteine in ihre Peptidfragmente zu spalten, wurden die dehydrierten Gelstücke mit 125 ng porcinem Trypsin (Roche) in 5 mM NH₄HCO₃ in HPLC-H₂O (w/v) üN bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,3 % Trifluoressigsäure (TFA) in ACN (v/v) gestoppt, und die Proben wurden für 15 min mit Ultraschall behandelt. Der Peptid-haltige Überstand wurde in eine neue 96-*Well* Kulturplatte überführt und unter Vakuum-Bedingungen getrocknet. Um die Peptide für die MALDI TOF MS Analyse zu ionisieren, wurden sie in 0,9 µL α -cyano-hydroxycinnamic acid matrix solution (Applied Biosystems) rehydriert und schließlich auf eine MALDI-Probenplatte pipettiert.

2.5.11 MALDI TOF MS/MS-Analyse

Diese Methode dient der Bestimmung der Masse von Proteinen und Peptiden. Sie zeichnet sich durch ihre hohe Empfindlichkeit und die Möglichkeit zur Automatisierung aus.

Die Probe wird mit einer Matrix (in diesem Fall Zimtsäure) kokristallisiert und durch *Laser*-Beschuss in die Gasphase desorbiert. Durch die Protonenübertragung von Matrixmolekülen auf die Peptide entstehen Peptid-Ionen, die in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Durch Messung der Flugzeit der Ionen auf einer Driftstrecke lässt sich auf die Masse der erzeugten Peptid-Ionen schließen. Weiterhin kann durch Fragmentierung einzelner Peptid-Ionen die Aminosäuresequenz des jeweiligen Peptids abgeleitet werden. Die MS- und MS/MS-Messungen der aus den DIGE-Experimenten erhaltenen Proben (siehe 2.5.10) erfolgten mit einem MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Die MS-Spektren wurden im Positive Ion Reflector-Modus bei einer Akkumulation von 5.000 konsekutiven Laser-Schüssen erstellt und gegen autolytische Trypsin-Peaks kalibriert. Auf die Generierung der MS-Spektren folgte die Selektion der Vorläufer-Fragment-Ionen entsprechend der gewählten Kriterien, maximal fünf Peaks pro Protein-Spot zuzulassen. Die MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe der Instrument Default-Kalibrierung, mit einem Minimum von 4.000 und einem Maximum von 8.000 Laser-Schüssen erstellt. Die vorhergesagten Massen wurden auf 80, die Kollisionsenergie auf 1 kV eingestellt; Luft wurde als Kollisionsgas angegeben. Die GPS Explorer-Software (Applied Biosystems) ermöglichte eine Grundlinien-Subtraktion der Spektren und eine interne Kalibrierung gegen autolytische Trypsin-Peaks. Zugelassen wurden Peaks mit einer minimalen Signal/Noise-Ratio (S/N) von 12 bei MS und von 10 bei MS/MS. Nach dem Ausschluss bekannter Kontaminanten, wie der Proben-Matrix und humanem Keratin, wurden die jeweils 65 höchsten Peaks und die fünf höchsten MS/MS-Spektren der Vorläufer-Ionen in den MASCOT-Server eingespeist (Matrix Science), um eine In-House-Analyse gegen die NCBI Protein-Datenbank durchzuführen. Akzeptiert wurde maximal eine enzymatische Fehlspaltung und die Massen-Toleranz der Sequenzen wurde auf 100 ppm, die der Vorläufer-Ionen auf 0,15 Da festgelegt. Akzeptierte Modifikationen beschränkten sich auf die Methylierung des Cysteins und der Oxidation des Methionins. Die Identifizierung der Proteine wurde durch eine kombinierte Suche mittels der Peptide Mass Fingerprint-Daten (PMF) und der MS/MS-Spektren erzielt. Dabei wurden die Proteine akzeptiert, die, den Richtlinien von MASCOT folgend, oberhalb des signifikanten Grenzwertes (≥ 80) des Total Protein Score lagen.

2.5.12 Tryptischer Verdau von Proteinen für *Nano Liquid Chromatographie* (Nano-LC)-Analysen

Um das Set von Membranoberflächen-Proteinen der Amöbe zu identifizieren, wurden diese Proteine angereichert (siehe 2.5.2) und mittels SDS-PAGE in einem 12 % Polyacrylamidgel getrennt (siehe 2.5.6). Die separierten Proteine sollten mit Hilfe einer *Nano-Liquid Chromatographie* (Nano-LC) weiter getrennt werden. Dafür wurde die Spur einer Probe im Gel in gleichmäßige 1 mm breite Stücke, parallel zum Verlauf der molekularen Masse, geschnitten. Die in den Gelstücken enthaltenen Proteine wurden mit Trypsin verdaut, bevor sie für die Nano-LC eingesetzt wurden, um anschließend massenspektrometrisch analysiert zu werden.

Zu Beginn des Protokolls fanden alle Inkubationsschritte bei 30°C auf einem Schüttler (300 rpm) statt. Die Gelstücke wurden zweimal mit 100 μ L 50 mM NH₄HCO₃ in HPLC-H₂O und ACN im Verhältnis 1:2 (v/v) für 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 10 min mit 50 mM NH₄HCO₃ in HPLC-H₂O (w/v) äquilibriert und mit 50 μ L ACN für 2–5 min dehydriert. Die Gelstücke wurden in einer *Speed Vac* für ca. 10 min bei 42°C vollständig getrocknet. Durch die Zugabe von 0,05 μ g porcinem Trypsin (Roche) in 20 μ L 50 mM NH₄HCO₃ in HPLC-H₂O (w/v) wurden die Proteine üN bei 37°C in Peptidfragmente gespalten. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 25 μ L 0,5 % TFA in ACN (v/v) abgestoppt. Weiterhin wurden die Proben für 10 min mit Ultraschall behandelt und der Überstand in Glas-Reaktionsgefäße überführt. Die Gelstücke wurden mit 20 μ L ACN nochmals für 2–5 min dehydriert und der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt. Diese wurden für ca. 25 min bei 42°C in der *Speed Vac* eingeengt. Der Rückstand wurde in 6 μ L 5 % ACN in 0,1 % TFA (v/v) gelöst und für 10 min mit Ultraschall behandelt. Die Proben konnten bis zur Messung bei –20°C gelagert werden.

2.5.13 Nano-LC und massenspektrometrische Analyse mittels MS/MS

Die LC-MS/MS-Analyse erfolgte mit Hilfe eines *LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer* (Thermo Fisher) das mit einem *Eksigent 2D nanoflow LC System* (Axel Semrau GmbH) verbunden war. Das LC System wurde über eine Nano-Elektronenspray Quelle (Proxeon), mit einer 10 μ m PicoTip ESI Emissionselektrode (New Objective) an das *LTQ-Orbitrap* gekoppelt. 5 μ L der tryptisch gespaltenen Probe wurden in eine Auffangsäule (PepMap C18, 100 Å, 5 mm x 300 μ m) injiziert, dort konzentriert, um anschließend mit 0,1 % TFA, 2 % ACN in *A. bidest.* (v/v) äquilibriert zu werden. Nachdem die Auffangsäule *inline* geschaltet wurde, startete die LC in einer Kapillarsäule (Atlantis dC18, 3 μ m, 100 Å, 150 mm x 75 μ m) mit einer Durchflussrate von 250 nL/min. Die Massenspektren wurden in einem Daten-abhängigem Modus mit einer MS Übersichtsdetektion (Auflösung von 60.000) im Orbitrap und mehreren MS/MS Detektionen der fünf intensivsten Vorläufer-Ionen im LTQ generiert. Der MS-Übersichtsbereich lag zwischen 300 und 1.500 m/z. Die dynamische Ausschlusszeit für die Vorläufer-Ionen wurde auf 180 s gesetzt und die automatische Verstärkungsregelung wurde auf 3 x 106 und 10.000 jeweils für die Orbitrap-MS und die

LTQ-MS/MS-Detektion eingestellt. Für den Datenbank-Abgleich wurden die Rohdaten mit dem *MASCOT Distiller* (Matrix Science) prozessiert, um *MASCOT generic files* (mgf) zu generieren. Diese Daten (mgf) wurden mit Hilfe des *MASCOT Servers für* eine *In-House* Analyse gegen die NCBI Protein-Datenbank eingesetzt. Es wurden dabei maximal zwei Fehlspaltungen zugelassen. Die Massentoleranz für Vorläufer-Ionen und Sequenz-Ionen wurde jeweils auf 10 ppm und 0,35 Da festgelegt. Darüber hinaus wurden Modifikationen für die Oxidation von Cystein und Methionin toleriert. Proteine galten als identifiziert, wenn der *total MASCOT Score* über dem signifikanten Grenzwert (\geq 80) lag und mindestens zwei Peptide das erste Mal in der Liste erschienen und dabei die erstplatzierten Peptide waren. Mit Hilfe des Programms *Scaffold* (Proteome Software Inc.) wurden die MS/MS-basierten Peptidund Protein-Identifikationen validiert und eine nicht-redundante Liste der Proteine erstellt. Die Peptid-Identifikation wurde akzeptiert, wenn sie eine Wahrscheinlichkeit größer als 50 %, spezifiziert durch den *Peptid Prophet Algorithm* (Keller *et al.*, 2002) zugewiesen bekamen. Die Protein-Identifikation war zulässig, wenn sie mit einer Wahrscheinlichkeit über 99 % ermittelt wurde und mindestens zwei identifizierte Peptide enthielt.

2.5.14 Gewinnung polyklonaler Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen das rekombinante Protein EhFeHyd (siehe 2.4.16) wurden 4 weibliche Balb/c-Mäuse immunisiert. Dafür wurden 50 µg des gereinigten Proteins mit komplettem Freundschem Adjuvanz (Sigma) im Verhältnis 1:2 (v/v) gemischt und intra-peritoneal injiziert. Im Abstand von 2 Wochen erfolgten zur Verstärkung der Immunantwort zwei Booster, bei denen ein Gemisch aus jeweils 50 µL gereinigtes Protein und 50 µL inkomplettem Freundschem Adjuvanz (Sigma) auf die gleiche Weise injiziert wurden. Nach weiteren zwei Wochen wurden die Mäuse getötet und ihr Blut durch eine Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde bis zur vollständigen Gerinnung bei 4°C gelagert und die zellulären Bestandteile wurden anschließend bei $400 \times g$ für 5 min und 4°C sedimentiert. Das Serum wurde als Überstand abgenommen und erneut bei $2.300 \times g$ für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand bildete das gereinigte Serum, welches die polyklonalen Antikörper gegen das rekombinante Protein enthielt. Die Antiseren wurden zum spezifischen Protein-Nachweis Westernblot-Analysen 2.5.8) in (siehe und für Lokalisationsstudien des Proteins mittels IFA (siehe 2.4.12) eingesetzt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung genomischer DNA aus E. histolytica

Die Trophozoiten wurden wie beschrieben geerntet (siehe 2.4.2) und ihre genomische DNA wurde mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini* Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde in 50 μ L *A. bidest.* aufgenommen und bei –20°C gelagert.

2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus E. histolytica

Mit Hilfe des *TRIzol*[®]-Reagenz (Invitrogen), einer monophasischen Lösung bestehend aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, wurde die Gesamt-RNA aus Amöben isoliert. Hierfür wurden die Trophozoiten nach ihrer Ernte (siehe 2.4.2) in 1 mL *TRIzol* aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde mit 200 μ L Chloroform versetzt und für weitere 3 min bei RT inkubiert, bevor sie bei 11.500 × *g* für 15 min und 4°C zentrifugiert wurde. Die Gesamt-RNA befand sich nun in der wässrigen Phase, die als Überstand abpipettiert, und mit 500 μ L Isopropanol für 10 min bei RT gefällt wurde, um anschließend bei 11.500 × *g* für 10 min bei 4°C sedimentiert zu werden. Die RNA wurde mit 70 % EtOH in *A. bidest.* (v/v) gewaschen und bei 56°C getrocknet, bevor sie in 100 μ L *A. bidest.* resuspendiert wurde. Für alle Experimente sollte eine hohe Reinheit der RNA gewährleistet werden. Daher wurde die Probe einer weiteren Reinigung unterzogen, welches den Verdau genomischer DNA einschloss (siehe 2.6.3).

2.6.3 RNA-Reinigung und DNA-Verdau

Die mit *TRIzol* isolierte RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy*[®]-*Mini* Kits (Qiagen) nach einem modifizierten Protokoll gereinigt. Die in 100 μ L eluierte RNA wurde mit 350 μ L Mercaptoethanol-freiem RLT-Puffer versetzt und in 250 μ L EtOH aufgenommen, was das Ausfällen der Probe zur Folge hat. Die RNA wurde auf die Silica-Matrix der Säule pipettiert und dort mit dem *RNase-free DNase* Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers mit DNase behandelt, bevor sie mit dem RW-1 Puffer gewaschen und mit 25 μ L *A. bidest.* eluiert wurde. Die RNA wurde bei –70°C gelagert.

2.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.6.4.1 Mini-Präparation

Die Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte, gemäß den Hersteller-Angaben, mit dem *Fast Plasmid Mini* Kit (Eppendorf). Das Protokoll beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, bei der die Bakterienzelle durch SDS lysiert, und die chromosomale DNA und denaturierte Proteine mit Natriumhydroxid präzipitiert werden. Kalium-Acetat neutralisiert die Lösung anschließend. Die niedermolekulare Plasmid-DNA bleibt in Lösung und kann so isoliert werden. Für die Präparation wurden 1,5 mL Übernacht-Kultur transformierter Bakterien eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde in 30 μ L *A. bidest.* eluiert und bei –20°C gelagert.

2.6.4.2 Maxi-Präparation

Für die Transfektion von *E. histolytica* wurden größere Mengen Plasmid-DNA benötigt. Hierfür wurde das *NucleoBond[®] Xtra Midi/Maxi* Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers angewendet. Dieses Protokoll folgt ebenfalls dem Prinzip der alkalischen Lyse. Es wurden 500 mL Übernacht-Kultur transformierter Bakterien eingesetzt. Die DNA wurde in 800 μ L *A. bidest.* eluiert und bei –20°C gelagert.

2.6.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung, Entsalzung oder stabileren Lagerung von DNA- oder RNA-Lösungen wurde diese mit dem 2,5-fachen Volumen EtOH (v/v) und dem 0,1-fachen Volumen 3 M Na-Acetat (v/v) versetzt. Die Kationen des Salzes lagern sich in Gegenwart des Alkohols an die Nukleinsäuremoleküle an, wodurch diese aus der Lösung ausfallen. Zum Reinigen wurde das Präzipitat bei 11.500 × g für 15 min bei 4°C sedimentiert, zweimal mit 70 % EtOH in *A. bidest.* (v/v) gewaschen und bei 56°C getrocknet. Die Probe konnte dann in *A. bidest.* resuspendiert werden.

2.6.6 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Mit Hilfe eines Oligo(dT7-I)-Oligonukleotids konnte die mRNA aus einer Gesamt-RNA-Probe selektiv in cDNA transkribiert werden. Dabei lagert sich der Primer an das Poly-A-3'-Ende der mRNA an, und die eingesetzte Reverse Transkriptase *SuperScriptIII* (Invitrogen) kann von dort aus die komplementäre cDNA synthetisieren. In einem finalen Volumen von 20 µL wurden 1 µg DNase-behandelte RNA (siehe 2.6.2 und 2.6.3) mit 5 x First-Strand-Puffer, 500 µM dNTPs, 500 nM Oligo(dT7-I)-Oligonukleotid, 2 mM DTT, 40 U *RNaseOut* (Invitrogen) und 200 U/µL *SuperScriptIII* gemischt und für 1 h bei 42°C synthetisiert. Die cDNA wurde bei –20°C gelagert.

2.6.7 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe dieser Technik können DNA-Sequenzen, in Abhängigkeit von der Wahl der Matrizen-DNA und der eingesetzten Oligonukleotide, amplifiziert werden. Dabei besteht die Reaktion aus drei aufeinander folgenden Schritten, die sich zyklisch wiederholen:

- 1. Denaturierung des DNA-Moleküls
- 2. Hybridisierung der Oligonukleotide (Annealing)
- 3. DNA-Synthese (Amplifikation)

In einem finalen Volumen von 50 μ L wurden 0,5-1 μ g cDNA (siehe 2.6.6) mit 5 x PCR-Puffer (Promega), 40mM DTT, 0,4 mM dNTPs, 0,2 pmol/ μ L Oligonukleotid 1, 0,2 pmol/ μ L Oligonukleotid 2, 2,5 mM MgCl₂ und 0,5 μ L *Taq/Pwo*-Polymerase-Mix im Verhältnis 20:1 (Promega, Roche) gemischt. Die Denaturierung erfolgte für 45 s bei 95°C. Die *Annealing*-Temperatur ist empirisch in Abhängigkeit von der Länge und der Sequenz der Oligonukleotide zu ermitteln, sollte dabei aber die Schmelztemperatur T_m nicht überschreiten, die sich näherungsweise aus der Formel T_m = (A+T) x 2 + (G+C) x 4 ableiten lässt. Die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgte für 45 s. Die Synthese der DNA ist abhängig von der Fragmentgröße des Amplifikats. Mit dem verwendeten Enzym-Mix wurde pro 1 Kb Amplifikat 1 min Synthesezeit bei 68°C kalkuliert. Die Reaktion wurde in einem *Thermocycler* durchgeführt und die Zyklen 30-fach wiederholt. Für die Klonierung der Amplifikate in den *TOPO*[®]-Vektor (Invitrogen) mussten diese A-Überhänge enthalten. Dies wurde durch einen abschließenden Syntheseschritt für 10 min bei 68°C erreicht.

2.6.8 *Real-time* PCR

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Produktentwicklung während einer PCR zu detektieren und zu quantifizieren. Der fluoreszierende Farbstoff *SYBR*[®] *Green I* (Absorption bei 498 nm) interkaliert in DNA-Doppelstrang-Moleküle und emittiert dann durch einen *Laser* angeregt ein Signal bei 522 nm. Die Fluoreszenz-Intensität nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu, was durch eine Messung nach jedem Zyklus der PCR in Echtzeit (*real-time*) nachvollzogen wird. Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenz-Signal die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt, wird als Schwellenwert C_T definiert und wurde manuell bestimmt. Der C_T-Wert der Probe wird mit dem C_T-Wert einer Kontrolle korreliert. Zur Bestimmung der relativen Quantität mittels der 2^{- $\Delta\Delta C_T$}-Methode wurde das Zielgen (*gene of interest* = GOI) über ein Referenzgen (*β-aktin*) normalisiert und nach folgender Formel berechnet:

$2^{-\Delta\Delta C}_{T} = 2^{-((C_{T}P_{OOI} - C_{T}P_{Ref}) - (C_{T}K_{OOI} - C_{T}K_{Ref}))}$

- C_{T} = Cycle of threshold
- P = Probe-Zelllinie (HM-1:IMSS-Zelllinie B)
- K = Kalibrator-Zelllinie (HM-1:IMSS-Zelllinie A)
- GOI = Gene of interest (Zielgen)
- Ref = Referenzgen (β -aktin)

Es wurde das *RealMasterMix SYBR Green* Kit (Eppendorf) eingesetzt. Für einen 20 µL Reaktionsansatz wurden 0,5–1 µg cDNA (siehe 2.5.6) mit 2.5 × *RealMasterMix*/20 × *SYBR* (enthält 0,05 U/µL *Hot Master Taq*[®] DNA-Poymerase, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM dNTPs mit dUTPs) und 5 pmol/µL der entsprechenden *Sense-* und *Antisense-*Primer gemischt. *Sense*und *Antisense-*Primer wurden so gewählt, dass spezifische ca. 120 bp lange Amplifikate entstanden. Die Amplifikation erfolgte nach einer initialen Denaturierung für 2,5 min bei 95°C über 35 Zyklen. Die Denaturierungszeit betrug 15 s bei 95°C, die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgte für 20 s bei 58°C (mit 1°C *Touch Down* während der ersten sechs Zyklen) und die Synthese für 20 s bei 68°C. Die Effizienz der PCR \ge 0,95 wurde für die verwendeten Primer und cDNA-Proben empirisch ermittelt. Die Spezifität der Amplifikate wurde über eine Schmelzkurve bestimmt. Dafür wurden die PCR-Amplifikate für 1 min bei 95°C denaturiert und anschließend wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit, in Abhängigkeit eines Temperaturgradienten (von 67°C bis 95°C) in 1°C-Schritten alle 8 s gemessen. Die Reaktion wurde im *Rotor Gene 2000* (Corbett Life Science) durchgeführt und mit der entsprechenden *Software* ausgewertet (Livak und Schmittgen, 2001). Der Grenzwert für eine differentielle Genexpression wurde auf 2,5 festgelegt. Die Experimente wurden mit zwei bioloischen Replikaten wiederholt. Als technisches Replikat wurde jede Probe zweimal parallel pipettiert, um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren.

2.6.9 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentration ($\mu g/\mu L$) von in *A. bidest.* gelöster DNA und RNA wurde photometrisch bei einer Absorption von 260 nm gemessen und mittels der optischen Dichte (OD) nach folgender Formel berechnet:

OD_{260 nm} × Verdünnungsfaktor × 50 (DNA) bzw. 40 (RNA) / 1.000

Für eine OD von 1 wurde eine Konzentration von 50 μ g/mL für doppelsträngige DNA und 40 μ g/mL für RNA angenommen. Durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der Probe bestimmen (Sambrook und Gething, 1989). Reine DNA-Lösung sollte eine OD_{260 nm/280 nm} von \ge 1,8, RNA von \ge 2,0 haben.

2.6.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von negativ geladenen DNA-Molekülen in horizontalen Agarose-Gelen diente analytischen als auch präparativen Zwecken. In Abhängigkeit zur Größe der zu analysierenden Fragmente wurden Konzentrationen von 1–2 % Agarose (w/v) in TBE gewählt. Zur Detektion unter UV-Licht wurde das Gel mit 0,005 % (v/v) EtBr gefärbt. Die Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen Ladepuffer (Fermentas) versetzt und in einem elektrischen Spannungsfeld von 120 V von der Kathode zu Anode hin getrennt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein Größenmarker (siehe 2.1.5) eingesetzt. Bei präparativen Gelen konnten die entsprechenden Fragmente mit Hilfe einer 70 %igen UV-Detektion unter Verwendung eines Skalpells ausgeschnitten werden.

2.6.11 Reinigung von PCR-Amplifikaten aus Agarose-Gelen

Mit Hilfe des *NucleoSpin Extract II* Kits (Macherey-Nagel) können Nukleotid-Fragmente bis zu einer Größe von 65 bp abgeschieden werden, was die Reinigung der PCR-Produkte von Oligonukleotiden ermöglicht. Das Protokoll wurde entsprechend den Hersteller-Richtlinien durchgeführt.

2.6.12 Restriktionsanalyse von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können an spezifischen Palindrom-Sequenzen DNA-Moleküle geschnitten werden. Dies kann zur Identifizierung klonierter DNA-Fragmente und zur Linearisierung von zirkulärer Vektor-DNA genutzt werden. Es wurden *FastDigest*[®] Enzyme (Fermentas) den Hersteller-Angaben folgend, verwendet.

2.6.13 DNA-Sequenzanalyse

Das Sequenzieren von Plasmid-DNA wurde mit den ValueRead Sequencing Service der Firma MWG durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm MacVector 9.2 (Accelrys).

2.6.14 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente konnten durch die T4-DNA-Ligase (Fermentas) in linearisierte Vektoren, wie pNC und pJC45 (siehe Tabelle 2.4) inseriert werden. Die Konzentrationen von DNA-Fragment und Vektor-DNA sollten im Verhältnis 3:1 gewählt werden. Die Reaktion wurde den Hersteller-Angaben entsprechend durchgeführt.

2.6.15 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Fähigkeit von Bakterien, Fremd-DNA aufnehmen zu können, wird dazu genutzt, Plasmid-DNA zum Zweck der Vervielfältigung in die Zellen zu schleusen (Transformation). Im Gegensatz zu einigen Bakterien, sind die verwendeten $pAPlacI^Q$ -Bakterien natürlicherweise nicht in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen. Daher wurden sie durch eine Behandlung mit hohen Konzentrationen CaCl₂, kompetent gemacht. Dafür wurden die Bakterien zunächst in 40 mL LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 350 x g für 5 min sedimentiert, das Zellsediment in 20 mL eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert, bevor sie erneut bei 350 × g für 5 min sedimentiert wurden. Das Sediment wurde in 4 mL 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Zur längeren Lagerung konnten die Zellen mit 50 % Glycerin (v/v) versetzt und bei –70°C aufbewahrt werden.

2.6.16 Transformation von E. coli

Für die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 50 μL kompetente Bakterien mit 2 μL des jeweiligen Ligations-Ansatzes (siehe 2.6.14) für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 s bei 42°C einem Hitzestress ausgesetzt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 250 mL LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C geschüttelt (300–400 rpm). Sofern die Klonierung eine Blau-Weiß-Selektion zuließ, wurden 40 μL 20 % 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galaktopyranosid (X-Gal) in DMSO (w/v) zu den Zellen gegeben. Die Selektion beruht auf dem Prinzip, dass durch die β-Galaktosidase X-Gal gespalten werden kann, wodurch ein Indigofarbstoff als Reaktionsprodukt entsteht. Bei einer erfolgreichen Klonierung wird das auf dem Vektor liegende Gen der β-Galaktosidase unterbrochen, so dass die Bakterienkolonien weiß bleiben. Abschließend wurden die transformierten Bakterien auf einer LB-Amp-Kulturplatte ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert wurden.

2.6.17 Klonierung und Transformation mit TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

Für die Vervielfältigung von PCR-Amplifikaten wurden diese in den *pCR*[®]2.1-TOPO-Vektor des *TOPO TA Cloning* Kits (Invitrogen) kloniert. Die im Kit enthaltene *Vaccinia Virus* DNA Topoisomerase I fungiert beidermaßen als Restriktionsenzym und Ligase und ermöglicht dadurch die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit intakten Poly-A-Überhängen. Die Transformation in TOP 10-Zellen erfolgte nach Hersteller-Angaben.

2.6.18 Rekombinante Expression von Genen in E.coli

Die rekombinante Expression des *E. histolytica*-Moleküls Fe-Hydrogenase (*ehfe-hyd*, XM_647747) erfolgte in pAPlacI^Q-Zellen. Die kodierende Sequenz wurde via PCR aus gDNA amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsverktor pJC45 ligiert (Schluter *et al.*, 2000). Der Vektor enthält ein aus 10 Histidinen bestehendes, N-terminales His*tag*, mit dessen Hilfe sich das rekombinante Protein später reinigen ließ. Das entstandene Plasmid pJC45-EhFeHyd wurde in pAPlacI^Q-Zellen transformiert (siehe 2.6.15) und auf LB-Amp-Kulturplatten üN bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurden die Bakterien-Klone in 500 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin und 50 mL 20 % Glukose in *A. bidest.* (w/v) überführt und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 bei 37°C auf einem Schüttler (200–300 rpm) kultiviert. Die Synthese der Proteine wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Bakterien wurden für weitere 4 h unter den genannten Bedingungen inkubiert, bevor sie bei 5.000 × *g* für 20 min und 4°C sedimentiert wurden. Die geernteten Zellen wurden bei –20°C gelagert, bevor die rekombinanten Proteine daraus gereinigt wurden, um sie für die Gewinnung polyklonaler Antikörper einzusetzen.

2.6.19 Reinigung rekombinanter Proteine durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Die rekombinanten Proteine konnten über ihre N-terminale His-Markierung mit Hilfe einer Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei binden die Proteine über ihre Histidine an die Ni²⁺-Ionen, die über Nitrilotriessigsäure an Agarose als Matrix in einer Säule verankert sind. Die Proteine können mit unterschiedlichen Konzentrationen des Kompetitors Imidazol von der Säule eluiert werden. Die Bakterien (siehe 2.6.18) wurden in 15 mL Puffer A aufgenommen, mit Ultraschall auf Eis aufgeschlossen und schließlich bei 15.000 × g für 45 min bei 4°C sedimentiert. Nachdem 2 mL der Matrix *Ni-NTA-SuperflowTM* (Qiagen) auf die *Ni-NTA-Superflow-Säule* (Qiagen) gegeben und diese mit Puffer A äquilibriert wurde, konnte der Zellüberstand auf die Säule überführt werden. Es folgten Waschschritte mit Puffer A, Puffer B und Puffer C, bevor die Proteine in Puffer C mit zunehmender Konzentration Imidazol (20, 100, 500 mM) in 1 mL Aliquots eluiert wurden. Die Proteinfraktionen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe 2.4.6) und einer anschließenden Westernblot-Analyse (siehe 2.5.8) mit einem *anti-Histidin-*Antikörper

überprüft. Positiv getestete Eluate mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt und für die Immunisierung von Mäusen eingesetzt.

2.6.20 Transfektion von E. histolytica

Durch das Prinzip der Elektroporation wurde die Zellmembran von *E. histolytica* temporär permeabilisiert, wodurch Plasmid-DNA in die Trophozoiten geschleust werden konnte (Hamann *et al.*, 1995). Dafür wurden ca. 1×10^7 Trophozoiten geerntet (siehe 2.4.2) und in 5 mL inkomplettem Cytomix gewaschen, bevor sie in 3,6 mL komplettem Cytomix resuspendiert wurden. Pro Reaktion wurden 800 µL Amöbensuspension mit 100 µL Plasmid-DNA in einer Elektroporationsküvette (Durchmesser von 0,4 cm) versetzt und bei 1,2 kV, 25 µF und einer Zeitkonstanten von 0,4 ms zweimal elektroporiert. Danach wurden die Zellen sofort in mit 35°C warmem TYI-S-33-Medium gefüllte 75 mL-Kulturflaschen überführt und für 48 h bei 35°C inkubiert. Die verwendeten Plasmide (pNC) enthielten eine Neomycin-Resistenz. Eine Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde mit 10 µg/mL des Neomycin-Analogons *G418* (PAA) begonnen. Der Selektionsdruck wurde schrittweise bis auf 50 µg/mL *G418* gesteigert, sobald die Amöben wieder einen einschichtigen Zellrasen ausbildeten.

2.6.21 Microarray-Analyse I

Die *Microarray*-Technologie bietet den Vorteil, eine große Menge an Daten innerhalb eines Experiments zu generieren. Sie qualifiziert sich dadurch besonders für die Analyse ganzer Genome oder Transkriptome eines Organismus. Die differentielle Genexpression zwischen beiden HM-1:IMSS-Zelllinien wurde daher mit Hilfe dieser Methode studiert.

Prinzipiell werden Sonden in Form von cDNA (cDNA-*Array*) oder Oligonukleotiden (Oligonukleotid-*Array*) über kovalente Bindung an eine definierte Position (*Spot*) eines Rasters (*Array*) auf einer Matrix fixiert (Maskos und Southern, 1992). In dieser Arbeit wurden ausschließlich Oligonukleotid-*Arrays* verwendet. Die Matrix besteht in der Regel aus Glas, die Sonden entsprechen der komplementären Sequenz der zu untersuchenden Gene. Für Transkriptom-Studien wird die mRNA einer Probe in cDNA transkribiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Kallioniemi *et al.*, 1992), bevor sie mit den Sonden des *Arrays* hybridisiert wird. Hybridisierungssignale können mit Hilfe eines *Scanners* detektiert

werden, wobei die Intensität eines Signals proportional zur Menge des entsprechenden Transkripts ist. Für differentielle Transkriptom-Studien werden zwei Proben verschiedenfarbig markiert und auf einem *Array* kohybridisiert. Fusions-Signale repräsentieren Gene, die in beiden Proben gleichermaßen exprimiert sind. Einzel-Signale verweisen hingegen auf Gene, die exklusiv in einer Probe exprimiert sind. Um auszuschließen, dass Unterschiede der Hybridisierungssignale auf spezifische Eigenschaften der verschiedenen Cy-Farbstoffe zurückzuführen ist, wurden *Dye-Swap* Experimente durchgeführt (probenspezifischer Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe).

Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten, wurden die Daten durch Normalisierung und Wiederholung der Experimente abgesichert. Je Probe wurden zwei biologische Replika eingesetzt.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines *Microarray*-Experiments 1. Isolierung der Proben-RNA 2. cDNA-Synthese und indirekte Fluoreszenzmarkierung der Proben 3. Kohybridisierung beider Proben auf einen Oligonukleotid-*Microarray* 4. Detektion der Cy3- und Cy5-Hybridisierungssignale. Die Signale beider Proben wurden in den Falschfarben Grün (Cy3) und Rot (Cy5) dargestellt. Diese Signale wurden rechnerisch übereinander gelegt, was zu einer *Overlay*-Darstellung führt. Fusionssignale beider Proben erscheinen in Gelb. Differentiell exprimierte Gene einer Probe erscheinen entsprechend in Grün bzw. Rot.

2.6.21.1 Microarray I-Gestaltung

Für den Vergleich der Transkriptome beider *E. histolytica* HM-1-Zelllinien wurde der *Entamoeba histolytica 70-base oligonucleotide two-channel Microarray* (Davis *et al.*, 2007) verwendet, mit dem sich 6.242 *E. histolytica*-Gene analysieren lassen. Der *Array* repräsentiert damit ca. 60 % des Amöben-Genoms. Die Oligonukleotide, die eine durchschnittliche Schmelztemperatur von $T_m = 80,8^{\circ}C$ auf (± 2,73, 70,5–95°C) aufweisen, wurden von der Firma Illumina synthetisiert und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Samuel L. Stanley an der Universität von Washington, in Triplikaten auf *100 Epoxy Glasobjektträgern* (Cel Associates) fixiert.

2.6.21.2 cDNA-Synthese und indirekte Fluoreszenzmarkierung

Für die Herstellung der Proben wurde die RNA aus Trophozoiten isoliert (siehe 2.6.2) und gereinigt (siehe 2.6.3). Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.6.9) und ihre Qualität mit Hilfe des *2100 Bioanalyzer* (Aligent) nach Angaben des Herstellers geprüft. Die RNA wurde unter Verwendung des *3DNA array 350* Kits (Genisphere), den Hersteller-Empfehlungen folgend, in cDNA transkribiert und mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 markiert.

2.6.21.3 Hybridisierung

In einem Endvolumen von jeweils 48 μ L wurden die beiden unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proben gemischt, auf den *Microarray* pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte für 16–20 h bei 70°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Dunkeln.

Für die Minimierung von Hintergrundsignalen wurden die *Microarrays* nach der Hybridisierung gewaschen. Alle Waschschritte erfolgten für 11 min in einer Glaswanne, wobei die Arrays durch Auf- und Ab Bewegungen geschwenkt wurden, nacheinander mit Waschpuffer 1 bei 70°C, Waschpuffer 2 und Waschpuffer 3 bei RT. Abschließend wurden die *Arrays* mit *A. bidest.* gewaschen und getrocknet.

2.6.21.4 Auswertung und Normalisierung der Microarray I-Daten

Nach der Hybridisierung wurde jeder *Microarray* mit Hilfe des *ScanArray HT Scanners* (PerkinElmer) bei 550 nm für Cy3, bzw. bei 650 nm für Cy5, analysiert. Die Erfassung und die Auswertung der Daten erfolgte durch die *ScanArray Software* (PerkinElmer). Für die Analyse der Daten wurde die mittlere Signalintensität (Pixel) abzüglich des mittleren lokalen Hintergrundes (Pixel) für jeden *Spot* herangezogen, dabei wurden als fehlerhaft markierte *Spots* ausgeschlossen. Für die Auswertung wurde die Ratio von HM-1:IMSS Zelllinie A versus HM-1:IMSS Zelllinie B für jeden *Spot* mit Hilfe der *DecisionSite Software* (Spotfire) kalkuliert und der Loess-Normalisierung unterzogen. Transkripte, die in einer der beiden Proben nach der Normalisierung eine Ratio von \geq 2,0 aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert bezeichnet.

Dieses Experiment erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Paul Davis aus der Arbeitsgruppe von Samuel L. Stanley Jr. an der Universität von Washington (*Department of Medicine, Washington University School of Medicine*, St. Louis, MO, USA). Dabei wurden die cDNA-Synthese und die Hybridisierung der Proben von den Kooperationspartnern in den USA durchgeführt.

2.6.22 Microarray-Analyse II

In Ergänzung zu dem Set der Gene, die mittels des *Microarray I* analysiert werden konnten, wurde ein zweiter *Microarray* entworfen. Dieser *Array* umfasst ca. 170 Gene, die verschiedene putative Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* repräsentieren.

2.6.22.1 Microarray II-Gestaltung

Die Oligonukleotide, die als Sonden für den *Microarray* II ausgewählt wurden, verfügen über ein GC-Verhältnis von 35 % und einer durchschnittlichen Schmelztemperatur von $T_m = 71,6$ °C (± 1,17, 66–74°C). Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec synthetisiert. Über Epoxygruppen wurden sie in Vierfach-Replikaten in einer Konzentration von 50 µM auf *Advalytic Epoxy AD100* Glasobjektträger fixiert. Der *Microarray* wurde von der Firma Ocimumbio hergestellt.

2.6.22.2 cDNA-Synthese und indirekte Fluoreszenzmarkierung

Die RNA wurde aus Trophozoiten mittels *Trizol-Reagenz* isoliert (siehe 2.6.2), anschließend gereinigt und mit DNase behandelt (siehe 2.6.3). Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des *SuperScriptTM Indirect cDNA Labeling System* Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Je Probe wurden 7 µg RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Nach der Gewinnung der cDNA wurde die RNA durch eine Behandlung mit der im Kit enthaltenen RNase H denaturiert. Die cDNA wurde mittels der *S.N.A.P.TM Column Purification* des *Purification Module* Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben gereinigt. Die cDNA wurde in 300 µL EtOH mit 10 µL 3 M Na-Acetat und 2 µL 20 mg/mL Glykogen für 45 min bei -20° C präzipitiert. Die Probe wurde anschließend für 15 min bei $11.500 \times g$ und 4°C sedimentiert

und mit 75 % EtOH in *A. bidest.* gewaschen, bevor sie in 5 μ L 2 × *Coupling*-Puffer (Invitrogen) resuspendiert wurde.

Vorbereitend für die Kopplungsreaktion der cDNA mit den *Cy3/Cy5-monoreactive Farbstoffen* (GE Healthcare), wurden diese pro Aliquot in 40 μ L DMSO gelöst. Die cDNA wurde mit 10 μ L des entsprechenden Farbstoffs gemischt und für 60 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Dabei lagern sich die Cy-Farbstoffe an die UTP-Moleküle der cDNA an, was als indirekte Fluoreszenzmarkierung bezeichnet wird. Um ungebundene Cy-Moleküle zu entfernen, wurden die Proben erneut mit Hilfe der *S.N.A.P.TM Column Purification* gereinigt und in 50 μ L HPLC-H₂O eluiert. Die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung wurde spektrophotometrisch ermittelt. Die Absorption der Cy3-markierten Proben wurden dafür bei einer Wellenlänge von 550 mm (A_{550 nm}) und die der Cy5-markierten Proben bei 650 mm (A_{650 nm}) gemessen. Die Menge der gekoppelten Farbstoffmoleküle konnte mit Hilfe der folgenden Formeln berechnet werden:

pmol Cy3 = $A_{550 nm}$ × Probenvolumen (µL) / 0,15 pmol Cy5 = $A_{650 nm}$ × Probenvolumen (µL) / 0,25

Alle Proben sollten einheitlich 250 pmol gekoppelte Farbstoffe enthalten. Ihre errechneten Volumina wurden dementsprechend angepasst und mit Hilfe des *Microcon Zentrifugationsfilter YM-30* (Millipore) durch Zentrifugation bei 11.500 × g für 8–10 min auf ein Endvolumen von 20 μ L konzentriert.

2.6.22.3 Hybridisierung

Während der Prähybridisierung der *Microarrays* wurden diese für 30 min bei 42°C in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die *Microarrays* fünfmal mit *A. bidest.* gewaschen und getrocknet.

Die *Arrays* wurden in Hybridisierungskammern (Amicon) gebettet und der Sondenbereich mit Hilfe eines Kunststoffrahmens abgegrenzt. Die Proben wurden in 120 μ L 42°C warmem Hybridisierungspuffer (Ocimumbio) aufgenommen, für 3 min bei 95°C inkubiert und schließlich luftblasenfrei auf den *Microarray* pipettiert. Um ein Austrocknen während der Hybridisierung zu verhindern, wurde die Hybridisierungskammer mit 10 μ L *A. bidest.* befeuchtet und verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 42°C unter leichtem Schwenken.

Um Hintergrundsignale zu minimieren, wurden die *Microarrays* nach der Hybridisierung gewaschen. Dafür wurden alle verwendeten Waschpuffer auf 30°C erwärmt. Alle Waschschritte erfolgten für 5 min in einer Glaswanne, wobei die Arrays durch Auf- und Ab Bewegungen geschwenkt wurden, nacheinander mit Waschpuffer 1, Waschpuffer 2 und Waschpuffer 3. Abschließend wurden die *Arrays* mit *A. bidest.* gewaschen und getrocknet.

2.6.22.4 Auswertung und Normalisierung der Microarray II-Daten

Jeder *Microarray* wurde mit Hilfe des *ScanArray Express HT Scanners* (PerkinElmer) bei 550 nm für Cy3 bzw. bei 650 nm für Cy5, bei einer Auflösung von 5 µm analysiert. Die Erfassung und die Auswertung der Daten erfolgte durch die *ScanArray Software* (PerkinElmer). Für die Analyse der Daten wurde die mittlere Signalintensität (Pixel) abzüglich des mittleren lokalen Hintergrundes (Pixel) für jeden *Spot* herangezogen, dabei wurden als fehlerhaft markierte *Spots* ausgeschlossen. Für die Auswertung wurde die globale Mittelwert-Normalisierung eingesetzt (Quackenbush, 2006). Diese Methode geht von der Annahme aus, dass die Mehrzahl der auf dem *Microarray* repräsentieren Gene unter den verschiedenen Bedingungen gleich exprimiert wurden. Der Normalisierungsfaktor wurde nach folgender Formel berechnet:

Normalisierungsfaktor = $\sum_{Spot-Intensitäten der Probe 1} / \sum_{Spot-Intensitäten der Probe 2}$

Die Werte für die *Spot*-Intensitäten aller *Spots* der Probe 2 (HM-1:IMSS-Zell-Line A) wurden mit dem errechneten Normalisierungsfaktor multipliziert. Gene, die in einer der beiden Proben nach der Normalisierung eine Ratio von ≥ 2 aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert bezeichnet.

2.7 In silico Methoden

Mit Hilfe des Programms *Mac Vector 9.2* (Accelrys, San Diego, USA) wurden Nukleinsäure-Sequenzen analysiert und Oligonukleotide entworfen.

Das Programm *Open Lab 4.0.4* (PerkinElmer, Boston, USA) ermöglichte die Bearbeitung der IFA-Daten und wurde zusätzlich für die *Deconvolution*-Analyse verwendet.

Mit den Programmen *DeCyder Differential In-Gel Analysis* und *DeCyder Biological Variation Analysis* (GE Healthcare, München, Deutschland) wurden die Daten der DIGE-Experimente bearbeitet und ausgewertet.

Die Daten der *Microarray*-Analysen wurden mit Hilfe der Programme *ScanArray 3.0* (PerkinElmer, Boston, MA, USA) und *DecisionSite* (Spotfire, Somerville, USA) ausgewertet.

Mit Hilfe des Programms GPS Explorer (Applied Biosystems) wurden die MS/MS-Daten bearbeitet.

Mit dem Programm *MASCOT Distiller 2.2.1* (Matrix Science, Boston, USA) wurden die MS/MS-Rohdaten der Nano-LC-Analyse prozessiert, um *MASCOT generic files* zu erhalten, die für einen Datenbank-Abgleich genutzt werden konnten.

Das Programm *Scaffold 2.1.3* (Proteome Software, Portland, USA) ermöglichte die Erstellung einer nicht-redundanten Liste von Proteinen und deren Sortierung nach gewählten Parametern.

Der *Server ExPASy Tools* (Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, Schweiz) wurde für verschiedene Aminosäure-Sequenz Analysen verwendet.

Mit Hilfe des *Servers MASCOT* (Matrix Science, Boston, USA) wurden Peptid-Sequenzen, die aus MALDI-TOF MS/MS Analysen gewonnen wurden, mit bekannten Aminosäure-Sequenzen der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Phänotypische Charakterisierung der *E. histolytica*-Zelllinien HM-1:IMSS A und HM-1:IMSS B

Beide E. histolytica-Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden ursprünglich zu unterschiedlichen Zeitpunkten als HM-1:IMSS-Isolat (Katalog-Nr. 30459) von der ATCC bezogen. Zelllinie A wurde für die E. histolytica-Genomanalyse eingesetzt (Loftus et al., 2005), und ein Teil dieser Zellen wird seit dem Jahr 2001 kontinuierlich unter axenischen Bedingungen am Bernhard-Nocht-Institut kultiviert. Zelllinie B wurde im Jahr 1991 direkt von der ATCC bezogen und seitdem unter entsprechenden Bedingungen im gleichen Labor des Bernhard-Nocht-Instituts kultiviert. Von Beginn an, unterschieden sich beide Zelllinien unter Standard-Kulturbedingungen in ihrer Zellgröße und in ihrer Wachstumsrate. Im Vergleich zu Zelllinie A sind Zellen der Zelllinie B durchschnittlich um ein Drittel größer (siehe Abbildung 3.4 A und Tabelle 3.1), und die Teilungsrate der Trophozoiten ist um ca. 30 % erhöht (siehe Tabelle 3.1). Als beide Zelllinien separat für Infektions-Experimente an mongolischen Wüstenrennmäusen Meriones unguiculatus für die Induktion von Amöbenleberabszessen (ALA) eingesetzt wurden, produzierte Zelllinie A nur sehr kleine oder gar keine Läsionen, wohingegen Zelllinie B signifikant große Abszesse verursachte, die bis zu 30 % der Leber betreffen konnten (siehe Abbildung 3.1 und Tabelle 3.1). Der pathogene Phänotyp von Zelllinie B bezüglich der ALA-Induktion wird im Abstand von fünf Monaten überprüft und ist seit mindestens fünf Jahren stabil.



Abbildung 3.1: Abszess-Bildung in *M. unguiculatus*-Lebern verursacht durch die Infektion mit *E. histolytica*-Trophozoiten der HM-1:IMSS-Zelllinie A und HM-1:IMSS-Zelllinie B sieben Tage nach Infektion (siehe 2.3.11). Zelllinie A ist nahezu unfähig ALAs zu induzieren, wohingegen Zelllinie B große, eitrige Abszesse hervorruft. Abgebildet sind repräsentative Beispiele von jeweils drei Lebern, die mit Zelllinie A oder B infiziert wurden. Die Anteile abszessierter Leber wurden in Prozent für jeweils 15 infizierte Tieren bestimmt.

3.1.1 Genotypisierung der *E. histolytica*-Zelllinien HM-1:IMSS A und HM-1:IMSS B

Um die genetische Verwandtschaft der Zelllinien A und B und deren Abstammung vom *E. histolytica*-Isolat HM-1:IMSS zu prüfen, wurden von der DNA *tRNA-linked short tandem repeat* (STR)-Sequenzen von sechs verschiedenen genomischen *Loci* mit Hilfe einer PCR analysiert. Diese hoch polymorphen genomischen Marker-Sequenzen zeigen Variationen zwischen verschiedenen *E. histolytica*-Isolaten und können daher für die Bestimmung genetischer Verwandtschaftsverhältnisse herangezogen werden (Ali *et al.*, 2005). Zum Vergleich wurde die DNA weiterer *E. histolytica*-Isolate wie Rahman, HK-9 und 200:NIH auf die gleiche Weise untersucht. Die Ergebnisse zeigen identische DNA-Bandenmuster zwischen Zelllinie A und B, unterscheiden sich hingegen von denen der anderen untersuchten *E. histolytica*-Isolate (siehe Abbildung 3.2). Insofern werden Zelllinie A und Zelllinie B als syngenisch betrachtet.



Abbildung 3.2: Genotypisierung der HM-1:IMSS Zelllinie A und B und verschiedener *E. histolytica*-Isolate mittels *tRNA-linked short tandem repeat* (STR)-Sequenzen von sechs verschiedenen chromosomalen *Loci*. Die identischen DNA-Bandenmuster zwischen Zelllinie A und B weisen auf denselben genetischen Ursprung hin. Sie grenzen sich von den STRs der anderen *E. histolytica*-Isolate deutlich ab.

3.1.2 *In vitro*-Studien an *E. histolytica*-Zelllinien HM-1:IMSS A und HM-1:IMSS B

Zusätzlich zur Zellgröße der Trophozoiten, ihrer Wachstumsrate unter Standard-Kulturbedingungen und ihrer Fähigkeit ALAs in Wüstenrennmäusen zu induzieren, wurden weitere Eigenschaften beider HM-1:IMSS Zelllinien in verschiedenen *in vitro*-Experimenten untersucht und miteinander verglichen. Dabei standen Eigenschaften, die möglicherweise mit der Pathogenität von *E. histolytica* assoziiert werden können, im Mittelpunkt der Analysen. Es wurden die Cysteinpeptidase-, die zytopathische-, und die hämolytische Aktivität (siehe 2.4.4, 2.3.4 und 2.4.5), sowie die Bindung von Erythrozyten (*Rosetting*), deren Phagozytose und Verdau durch die Amöben untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Stressoren, wie Hitze und Human-Komplement (siehe 2.3.3 und 2.3.4) auf die Trophozoiten analysiert.

Zwischen beiden Zelllinien konnten signifikante Unterschiede in der Cysteinpeptidase-Aktivität und der hämolytischen Aktivität gefunden werden, wobei Zelllinie A eine ca. zweifach höhere hämolytische Aktivität und eine ca. siebenfach geringere Cysteinpeptidase-Aktivität im Vergleich zu Zelllinie B aufweist (siehe Tabelle 3.1). Westernblot-Analysen mit Antikörpern gegen die Cysteinpeptidase A1 (EhCP-A1), EhCP-A2 und EhCP-A5 zeigen, dass die verminderte Cysteinpeptidase-Aktivität, die in Zelllinie A beobachtet wurde, auf geringere Mengen der EhCP-A1 und EhCP-A2 in Zelllinie A zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigt die Reaktion mit dem EhCP-A5-Antikörper keine Unterschiede zwischen Zelllinie A und B (siehe Abbildung 3.3).



Abbildung 3.3: Westernblot-Analysen mit NaPBS-löslichen Proteinfraktionen von HM-1:IMSS Zelllinie A (A-LP) und B (B-LP). Es wurden jeweils 40 µg der Proteine in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mit der Nassblot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden mit polyklonalen Antikörpern (Ak) gegen EhCP-A1 (1:500), EhCP-A2 (1:500), bzw. EhCP-A5 (1:500) inkubiert. Mit Hilfe eines HRP-konjugierten sekundärem Antikörpers (1:5.000) und einer ECL-Entwicklung wurde die Reaktion sichtbar gemacht. Das Coomassie-gefärbte Gel belegt, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden. Die Antikörper gegen die Cysteinpeptidasen EhCP-A1 und EhCP-A2 zeigen ein deutlich intensiveres Signal bei dem Proteinextrakt der Zelllinie B, wohingegen kein Unterschied zwischen beiden Zelllinien in Bezug auf den Antikörper gegen die EhCP-A5 besteht.

Die Wachstumsrate bei Hitzstress sinkt zwar um ca 16 %, jedoch gilt diese Beobachtung für beide Zelllinien. Alle übrigen Ergebnisse, wie die lethale Komplement-Dosis, die zytopathische Aktivität, die Erythrophagozytose-Rate, der Erythrozyten-Verdau und das *Rosetting* zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen HM-1:IMSS-Zelllinie A und HM-1:IMSS-Zelllinie B (siehe Abbildung 3.4 B-D).
Phänotyp	HM-1:IMSS-Zelllinie A	HM-1:IMSS-Zelllinie B	
Größe der Trophozoiten	33 + 5	<i>4</i> 5 + 9***	
(μm)	55 ± 5	45 ± 7	
Wachstumsrate	10.3 ± 1.4	7 32 ± 0 2**	
(Verdopplung der Zellzahl/h)	10,5 ± 1,4	$7,52 \pm 0,2^{++}$	
Hitzstress	12 + 2 2	8 4 + 2 1*	
(Verdopplung der Zellzahl/h)	$12 \pm 2,2$	0,7 ± 2,1	
Lethale Komplement-Dosis ¹	8	6	
(% aktives Human-Serum)	0	0	
Zytopathische Aktivität	715+57	67 + 8 5	
(% CHO-Zellrasenzerstörung)	/1,5 ± 5,7	07 ± 0,5	
Erythrophagozytose ²	0.6 + 0.1	0.6 + 0.1	
(OD _{397 nm})	0,0 = 0,1	0,0 = 0,1	
Erythrophagozytose ³	100	100	
(% Erythrozyten-haltige Amöben)	100	100	
Digestion phagozytierter Zellen ⁴	25	29	
(% Erythrozyten-haltige Amöben)	20	27	
Erythrozyten- <i>Rosetting</i> ⁵	93	89	
(% Rosetten-Formation/Amöbe)	,,,		
Amöbenleberabszess-Bildung	01+02	28 8 + 14 7**	
(% abszessierte Leber)	0,1 ± 0,2	20,0 ± 14,7	
Cysteinpeptidase-Aktivität	15 + 5	110 + 25***	
(mU/mg)	10 - 0	110 - 20	
Hämolytische Aktivität	0.4 + 0.1	02+01***	
(OD _{570 nm})	·,· = ·,·	$0,2 \pm 0,1$	

Tabelle 3.1: Phänotypische Charakterisierung der HM-1:IMSS-Zelllinie A und HM-1:IMSS-Zelllinie B

- * = P-Wert ≤ 0.05
- ** = P-Wert $\leq 0,001$
- *** = P-Wert $\leq 0,0001$
- ¹ = nach 7 Tagen Kultivierung in Gegenwart von aktivem Human-Komplement
- ² = Messung der phagozytierten Erythrozyten über den intrazellulären Hämoglobingehalt der Trophozoiten nach 20 min Inkubation
- ³ = Anzahl (in Prozent) der phagozytierten Erythrozyten nach 45 min Inkubation
- ⁴ = 2 h Inkubation, nachdem nicht-phagozytierte Erythrozyten lysiert wurden
- ⁵ = Bindung von \ge 5 Erythrozyten/Amöbe





Abbildung 3.4: A veranschaulicht den Größenunterschied zwischen Zelllinie A und B Trophozoiten unter Standard-Kulturbedingungen. Die Zellen von HM-1:IMSS B sind mit durchschnittlich 45 μ m um ca. 30 % größer als Zellen von HM-1:IMSS A. Es wurden in 2 biologischen Replikaten jeweils 50 Zellen vermessen. B zeigt Trophozoiten, die für 45 min Erythrozyten phagozytieren konnten (siehe 2.3.8) im Vergleich zwischen Zelllinie A und B. Nicht phagozytierte Erythrozyten wurden lysiert. Die durch das Hämoglobin bräunlich erscheinenden, inkorporierten Erythrozyten sind deutlich zu erkennen und wurden im gleichen Maß (100 % der Trophozoiten) von beiden Zelllinien aufgenommen.





Abbildung 3.4: C zeigt Trophozoiten, die für 45 min mit Erythrozyten inkubiert wurden, um diese zu phagozytieren. Anschließend wurden nicht-inkorporierte Erythrozyten lysiert und die Amöben für weitere 2 h inkubiert. In dieser Zeit konnten die Trophozoiten die phagozytierten Erythrozyten digestieren (siehe 2.3.9). Im Vergleich zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien. Von ursprünglich 100 % Amöben, die Erythrozyten inkorporiert haben, sind 25 % in Zelllinie A und 29 % in Zelllinie B verblieben. D dokumentiert das *Rosetting* der Erythrozyten an Trophozoiten der Zelllinie A und B im Vergleich (siehe 2.3.10). Eine Rosette besteht hierbei aus mindestens fünf adhärenten Erythrozyten. Der prozentuale Anteil an Amöben, die eine Rosette tragen, beträgt bei Zelllinie A 93 %, bei Zelllinie B 89 %, wodurch sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden.

Die auf diese Weise genotypisch und phänotypisch charakterisierten *E. histolytica*-Zelllinien HM-1:IMSS A und HM-1:IMSS B wurden in dieser Arbeit für vergleichende Proteom- und Transkriptom-Studien eingesetzt, um mit ihrer Hilfe potentielle Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* zu identifizieren.

3.2 Differentielle Proteom-Analysen

3.2.1 Differentielle Proteom-Analyse mittels DIGE-Technologie

Zur Charakterisierung der molekularen Unterschiede zwischen beiden HM-1:IMSS-Zelllinien wurden vergleichende Proteom-Analysen mit Hilfe der DIGE-Technologie durchgeführt. Hierbei werden die Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle synthetisiert werden, isoliert und zunächst entsprechend ihres isoelektrischen Punktes und anschließend entsprechend ihrer molekularen Massen elektrophoretisch separiert. Unter Verwendung verschiedenfarbiger Fluoreszenzmarkierungen werden die Proben beider Zelllinien in einem Gel getrennt und können bei der Auswertung miteinander verglichen werden. Differentiell regulierte Proteine lassen sich auf diese Weise identifizieren.

Die Qualität der Proben ist essentiell für das Resultat des Experiments. Für die statistische Relevanz der Daten müssen biologische Replikate, mit denen die Experimente wiederholt werden, die gleiche Qualität aufweisen. Daher wurden die Zellen der verschiedenen biologischen Proben zum gleichen Zeitpunkt ihrer Wachstumsphase geerntet, die verschiedenen Proteinfraktionen zeitnah gewonnen und mit dem Cysteinpeptidase-Inhibitor E-64 behandelt, um Degradationsprozesse zu verhindern. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt, damit exakt gleiche Mengen der Proben für die verschiedenen Gele eingesetzt werden konnten.

In dieser Arbeit wurden sowohl die NaPBS-löslichen Proteine, als auch die Urea-löslichen Proteine der Trophozoiten beider Zelllinien A und B parallel untersucht. Um ein möglichst großes Spektrum der Proteine in einem Gel zu trennen, wurde für die isoelektrische Fokussierung zunächst ein nicht-linearer (NL) pH-Gradient von 3–11 ausgewählt (siehe Abbildung 3.5 A und B). Bei einem nicht-linearen IPG-Streifen nimmt der Bereich zwischen pH 4–8 einen größeren Raum in Anspruch als der Bereich von pH 3–4 bzw 8–11. In der Region von pH 4–8 sind bei vielen Proben die meisten Proteine zu erwarten und können dadurch sensitiver separiert werden. Tatsächlich war auf diesen Gelen deutlich zu erkennen,

dass die meisten Proteine bei einem isoelektrischen Punkt von ca. pH 4-8 lokalisiert sind. Um eine hochauflösendere Trennung dieser Proteine zu erzielen, wurden daher weitere Experimente mit linearen pH-Gradienten von 4-7 während der isoelektrischen Fokussierung durchgeführt (siehe Abbildung 3.5 C und D). Jedes Experiment wurde mit drei biologischen Replikaten wiederholt. Für die Identifizierung differentieller Protein-Spots wurde jedes Gel in der Overlay-Darstellung, bestehend aus einer rechnerischen Übereinanderlagerung beider Cy-Farbstoff spezifischen Kanäle, ausgewertet. Fusionssignale erscheinen gelb, differentielle Spots sind grün (Cy3) oder rot (Cy5). Ausschließlich differentielle Protein-Spots wurden aus dem Gel isoliert. Nur ca. 1-3 % der Proteine werden mit den Cy-Farbstoffen markiert und erhalten dadurch eine zusätzliche Masse von 434-464 Da. Um die Verschiebungen der Proteinposition markierter und nicht markierter Proben-Populationen nach ihrer Trennung im Acrylamidgel sichtbar zu machen, wurden die fertigen DIGE-Gele zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby behandelt (siehe 2.4.10.4). Exemplarisch ist in Abbildung 3.5 E ein solches Gel abgebildet. Die Cy-Fluoreszenzmarkierung ist rot, die SYPRO Ruby-Fluoreszenzmarkierung grün dargestellt. Die Verschiebung der Proteinposition beider Probenpopulationen ist deutlich sichtbar und wurde während die Isolierung der Zielproteine entsprechend berücksichtigt.



Abbildung 3.5: DIGE-Analyse der *E. histolytica*-Zelllinie A versus Zelllinie B. Die Proteinextrakte wurden mit Cy3 oder Cy5 fluoreszenzmarkiert, bevor sie gemischt und in der ersten Dimension entsprechend ihrer molekularen Massen separiert wurden. Exemplarisch ist von den 3 biologischen Proben der verschiedenen Experimente jeweils ein repräsentatives Gel abgebildet. A zeigt NaPBS-lösliche Proteine von Zelllinie A und Zelllinie B in einem Gel mit nicht-linearem pH-Gradienten von 3–11. **B** zeigt Urea-lösliche Proteine von Zelllinie A und Zelllinie B in einem Gel mit nicht-linearem pH-Gradienten von 3–11.



Abbildung 3.5: C zeigt NaPBS-lösliche Proteine beider Proben in einem Gel mit einem pH-Gradienten von 4–7. **D** zeigt Urea-lösliche Proteine beider Proben in einem Gel mit einem pH-Gradienten von 4–7. Das jeweils linke Bild stellt eine *Overlay*-Ansicht beider Zelllinien-spezifischen Farbkanäle dar. Differentielle Proteine von HM-1:IMSS A sind grün, die von HM-1:IMSS B rot. Fusionssignale entstehen durch die Anwesenheit eines Proteins in beiden Proben und erscheinen gelb. Die mittleren und rechten Bilder zeigen die spezifischen Farbstoff-Kanäle von Zelllinie A oder Zelllinie B aus denen sich eine *Overlay*-Darstellung zusammensetzt. Ausschließlich differentiell synthetisierte Proteine wurden aus den Gelen isoliert, um sie für die MALDI-MS/MS-Analyse einzusetzen. **E** zeigt ein DIGE-Gel, das mit *SYPRO Ruby* gefärbt wurde. Dadurch wird die Verschiebung der Proteinposition zwischen Cy-markierten Molekülen und nicht markierten Molekülen sichtbar. Die Cy-Markierung erscheint hier rot, die SYPRO Ruby-Färbung grün. Insgesamt 97–99% des Proteins eines Spots befinden sich in dem grün eingefärbten Bereich. Dies wurde bei der automatischen Isolierung der Zielproteine aus dem Gel berücksichtigt. Der rote Pfeil verweist auf die Cy-Markierung, jedoch zeigt der grüne Pfeil auf die durch *SYPRO Ruby* sichtbare Stelle, wo sich die meisten Proteine dieses Spots befinden. Das Loch im Gel belegt, dass das Zielprotein an der richtigen Stelle aus dem Gel ausgestanzt wurde.

In jedem DIGE-Gel konnten durchschnittlich 1747 Protein-*Spots* detektiert werden. Nachdem der Grenzwert für differentiell regulierte Proteine auf $\geq 2,3$ festgelegt wurde, erfolgte die Rekalkulation der Daten. Dementsprechend konnten durchschnittlich 50 *Spots* gefunden werden, die differentiell erhöhte Mengen des Proteins in Zelllinie A im Vergleich zu Zelllinie B aufwiesen, sowie 28 Protein-*Spots*, die über differentiell geringere Mengen des Proteins in Zelllinie A verfügten (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Durchschnittliche Anzahl der Protein-*Spots*, die sich in drei biologischen Replikaten übereinstimmend in den DIGE-Experimenten zeigten

DIGE-Experiment	LP, pH 3–11	ULP, pH 3–11	LP, pH 4–7	ULP, pH 4–7	Ø
(Probe, pH-Gradient)			<i>,</i> 1		
Detektierte Spots	1860	1909	1576	1643	1747
Erhöhte Mengen in A ¹	54	51	42	54	50
Geringere Mengen in A ²	32	38	19	27	28

LP = NaPBS-lösliche Proteinfraktion

ULP = Urea-lösliche Proteinfraktion

 \varnothing = Durchschnittliche Anzahl der Protein-Spots aller DIGE-Gele

¹ = Proteine, die differentiell in höheren Mengen in Zelllinie A vorkommen

² = Proteine, die differentiell in geringeren Mengen in Zelllinie A gefunden wurden

Nachdem diese Proteine massenspektrometrisch mittels MALDI-MS/MS analysiert und die Sequenzen mit einer Protein-Datenbank abgeglichen wurden (siehe 2.4.11 und 2.4.12), verblieben 33 *E. histolytica*-spezifische Proteine, die in Zelllinie A und B differentiell synthetisiert werden. Davon sind in der NaPBS-löslichen oder Urea-löslichen Proteinfraktion 21 Proteine mit höheren Konzentrationen in Zelllinie A, und zehn Proteine mit höheren Konzentrationen in Zelllinie B zu finden. Zusätzlich sind die Moleküle Grainin 1 und Grainin 2 in beiden Zelllinien vertreten, jedoch in unterschiedlichen Proteinfraktionen. Von diesen 33 Proteinen konnten 23 entsprechend ihrer biologischen Funktionen, wie Stress-Antwort, Zytoskelettstruktur, Transport, Signaltransduktion, Translation und Zellmetabolismus gruppiert werden. Die übrigen zehn wurden als Proteine unbekannter Funktion klassifiziert (siehe Tabelle 3.3 und Tabelle-A3 im Anhang).

Proteinname	Accession-Nr.	DIGE-Date	n (≥ 2,3)	
		Zelllinie A	Zelllinie B	
Stress-Antwort	-			
Hitzeschockprotein 90	XP_653162	LP, pH 3-11		
Fe-Hydrogenase	XP_652839		LP, pH 3-11*	
Peroxiredoxin	XP_649510		LP, pH 3-11	
Superoxiddismutase	XP_648827		ULP, pH 3-11	
Zytoskelettstruktur		I	I	
EhABP-ähnliches Protein	XP_650575	LP, pH 4-7		
Villin	XP_654808	ULP, pH 3-11		
Paxillin	XP_653490	LP, pH 3-11		
LIM-Domänen-Protein	XP_656918	ULP, pH 3-11		
ARP2/3 Komplex 34 kDa Untereinheit	XP_650569		LP, pH 3-11	
Cortexillin	XP_648643		LP, pH 4-7	
Transport	1	I	I	
Phospholipid-transportierende P-Typ ATPase	XP_656938		ULP, pH 4-7	
Signaltransduktion	1	I	I	
C2-Domänen-Protein	XP_655299	LP, pH 3-11*		
C2-Domänen-Protein	XP_654499	LP+ULP, pH 3-11		
14-3-3 Protein 3	XP_654465	LP, pH 4-7		
Rho-Familie GTPase	XP_652995		LP, pH 4-7	
Translation		I	I	
Translations-Elongationsfaktor EF-1 α	XP_651869	LP, pH 3-11		
Polyadenylat-bindendes Protein	XP_650099	LP+ULP, pH 3-11		
Zellmetabolismus	1	I	I	
Acetyl-CoA Synthetase	XP_656290	LP, pH 4-7		
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	XP_648981	LP, pH 3-11		
Adenylatzyklase-assoziiertes Protein	XP_655240	LP, pH 4-7		
Galaktokinase	XP_649045	LP, pH 4-7		
Pyruvat-Phosphat Dikinase	XP_657332	LP, pH 4-7		
Dipeptidylpeptidase	XP_655473		ULP, pH 3-11	
Proteine ungekannter Funktion		I	I	
Grainin 1	XP_650372	LP, pH 3-11	ULP, pH 3-11	
Grainin 2	XP_650357	LP, pH 3-11	ULP, pH 3-11	
PIWI-ähnliches Protein	XP_656514	ULP, pH 3-11		
SH3-Domänen-Protein	XP_652077	ULP, pH 4-7		
SH3-Domänen-Protein	XP_649085	ULP, pH 3-11		

Tabelle 3.3: Proteine, die in differentiellen Mengen in drei biologischen Replikaten in Zelllinie A und Zelllinie B mittels DIGE und MALDI-MS/MS identifiziert wurden.

Proteinname	Accession-Nr.	DIGE-Date	en (≥ 2,3)
		Zelllinie A	Zelllinie B
Proteine ungekannter Funktion			
cdc48-ähnliches Protein	XP_650911	ULP, pH 3-11	
Hypothetisches Protein	XP_648503	LP, pH 3-11	
Hypothetisches Protein	XP_657012	ULP, pH 3-11	
Hypothetisches Protein	XP_647891		LP, pH 4-7
Hypothetisches Protein	XP_651863		ULP, pH 3-11

* = differentiell höhere Expression des entsprechenden Gens mittels *Real-time* PCR nachgewiesen.

Mit Hilfe von *Real-time* PCR-Experimenten sollte untersucht werden, ob verschiedene Konzentrationen der Proteine, die mittels der DIGE-Analyse zwischen Zelllinie A und B detektiert wurde, auch für die Transkriptmengen des entsprechenden Gens beobachtet werden können. Für die 33 Sequenzen wurden Oligonukleotide synthetisiert (siehe Tabelle-A1 im Anhang) und für die *Real-time*-PCR verwendet. Als Proben wurde die mRNA in Form von cDNA von Zelllinie A und Zelllinie B untersucht (siehe 2.5.6). Als Referenzgen diente β -*aktin* und Zelllinie A wurde als Kalibrator verwendet (siehe 2.5.8). Der Grenzwert für eine differentielle Genexpression wurde auf \geq 2,5 festgelegt. Die Experimente wurden mit zwei biologischen Proben wiederholt.

Von allen 33 untersuchten Genen konnte nur für zwei Moleküle eine differentielle Transkriptmenge nachgewiesen werden. Das *c2-domänen-protein* (XM_650207) weist mit einem $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ -Wert von 999 eine differentiell höhere Transkriptmenge in Zelllinie A auf, wohingegen die *fe-hydrogenase* (XM_647747) mit einem $2^{-\Delta\Delta C}_{T}$ -Wert von 3,23 in differentiell höheren Konzentrationen in Zelllinie B exprimiert wird (siehe Tabelle 3.3). Die gemessenen Transkriptmengen aller verbleibenden Gene liegen außerhalb des definierten Grenzwertes.

3.2.2 Westernblot-Analysen

Von einigen wenigen Proteinen, die mittels der DIGE-Studie als differentiell in einer der beiden Zelllinien nachgewiesen wurden, standen Antikörper zur Verfügung. Mit dem Ziel, durch eine unabhängige Technik einige der DIGE-Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Antikörper für Westernblot-Analysen eingesetzt. Es wurden dafür die gleichen Proteinfraktionen wie für die DIGE-Experimente verwendet. Der Grainin-Antikörper richtet sich gegen beide Isoformen des Moleküls und reagierte daher erwartungsgemäß mit allen Proteinfraktionen. Die DIGE-Daten zeigten für das Peroxiredoxin eine differentiell höhere Konzentration in der NaPBS-löslichen Proteinfraktion von Zelllinie B und für die SOD eine differentiell höhere Konzentration in der Urea-löslichen Proteinfraktion. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Westernblot-Analysen wider. Der Peroxiredoxin-Antikörper zeigt ein deutlich intensiveres Signal bei der Zelllinie B, und der SOD-Antikörper reagiert ausschließlich mit dem Proteinextrakt der Zelllinie B. Die Ergebnisse, die aus den Westernblot-Analysen gewonnen wurden, bestätigen somit die Daten der DIGE-Studie (siehe Abbildung 3.6).



Abbildung 3.6: Westernblot-Analysen mit NaPBS-löslichen bzw. Urea-löslichen Proteinfraktionen von HM-1:IMSS Zelllinie A (A-LP bzw. A-ULP) und B (B-LP und B-ULP). Es wurden jeweils 40 µg der Proteine in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mit der Nassblot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden mit polyklonalen Antikörpern (Ak) gegen Grainin (1:500), Peroxiredoxin (1:500), bzw. SOD (1:500) inkubiert. Mit Hilfe eines HRP-konjugierten sekundärem Antikörpers (1:5.000) und einer ECL-Entwicklung wurde die Reaktion sichtbar gemacht. Das Coomassiegefärbte Gel belegt, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden. Der Grainin-Ak reagiert mit allen Proteinextrakten. Der Peroxiredoxin-Ak sowie der SOD-Ak zeigen ein stärkeres Signal für den Proteinextrakt von Zelllinie B. Die Ergebnisse der Westernblot-Analysen bestätigen damit die Daten der DIGE-Studie.

3.2.3 Vergleichende Analyse des Membranoberflächen-Proteoms von *E. histolytica-*Zelllinie A und Zelllinie B

Um die Membranoberflächen-Proteome von *E. histolytica*-Zelllinie A und Zelllinie B zu identifizieren und miteinander zu vergleichen, wurden diese Proteine angereichert (siehe 2.4.2) und für eine *Nano-Liquid Chromatographie* (Nano-LC) mit einer anschließenden MS/MS-massenspektrometrischen Analyse vorbereitet.

Die Nano-LC-Technologie ermöglicht es, einzelne Proteine aus heterogenen Proteingemischen zu separieren, wodurch eine exakte Identifizierung aller Proteine einer komplexen Probe mittels massenspektrometrischen Analysen begünstigt wird. Dies gelingt umso effektiver, je sorgfältiger die Probe vorfraktioniert werden kann. Durch die Anreicherung der Membranoberflächen-Proteine wurde bereits eine Subpopulation aller Proteine der Zelle ausgewählt. Die Membranoberflächen-Proteine wurden mittels SDS-PAGE in einem 12 % Polyacrylamidgel getrennt (siehe 2.4.6). Die Spur einer Probe im SDS-Gel wurde anschließend in gleichmäßige 1 mm breite Stücke geschnitten, was eine weitere Vorfraktionierung der Probe bewirkte. Die in den Gelstücken enthaltenen Proteine wurden mit Trypsin in Peptide gespalten, bevor sie für die Nano-LC eingesetzt wurden, um anschließend massenspektrometrisch analysiert zu werden. Da es sich bei dieser Verfahrensweise um eine hoch sensitive Technik handelt, ist es wichtig sauber zu arbeiten und auf eine hohe und vergleichbare Qualität der Proben zu achten. Keratin-Verunreinigungen der Proben, verursacht durch den Experimentator sind dabei besonders zu vermeiden, da sie die Proben-Signale bei der massenspektrometrischen Analyse überlagern können.

Um die Membranoberflächen-Proteine von Zelllinie A und B miteinander vergleichen und differentielle Proteine identifizieren zu können, müssen exakt gleiche Mengen beider Proben für die SDS-PAGE eingesetzt werden. Für den Versuch wurden jeweils 40 µg der Proteine eingesetzt (siehe Abbildung 3.7).



Abbildung 3.7: Präparatives 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit jeweils 40 µg der Membranoberflächen-Proteine von Zelllinie A und Zelllinie B. Für die unspezifische Färbung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung behandelt. Die Spur einer Probe wurde in 1 mm-breite Stücke geschnitten. Die Proteine wurden auf diese Weise entsprechend ähnlicher molekularen Massen vorfraktioniert, bevor sie mit Trypsin in Peptide gespalten wurden.

Die Peptide einer Probe wurden separat von der zweiten Probe massenspektrometrisch analysiert und mit Hilfe der NCBI-Proteindatenbank identifiziert. Aus den Daten wurde durch die Anwendung des Programms *Scaffold 2.1.3* (Proteome Software) eine nicht-redundante Liste aller identifizierten Proteine angelegt. Dabei konnte zwischen Proteinen, die in beiden Proben vorkommen, und Proteinen, die differentiell ausschließlich in Zelllinie A oder Zelllinie B synthetisiert sind, unterschieden werden.

Es wurden 62 differentielle Proteine identifiziert, wovon 23 exklusiv in Zelllinie A gefunden und 39 ausschließlich in Zelllinie B nachgewiesen wurden. Die Anwendung von ExPASy-Tools (Swiss Institute of Bioinformatics) ermöglichte die Vorhersage von Signalpeptid-Sequenzen und Transmembrandomänen in den einzelnen Proteinen (siehe Tabelle 3.4). Von den 62 identifizierten Proteinen wurden 29 als putative Membranproteine vorhergesagt. Davon verfügen elf über Transmembrandomänen und teilweise auch über Signalpeptide oder Signalanker, wodurch sie sehr wahrscheinlich an der Zellmembran lokalisiert sind. Weitere sieben Proteine haben Signalpeptide, wodurch sie exportiert und möglicherweise zur Zellmembran oder Organell-Membranen transportiert werden. Von den Proteinen, die keine Transmembrandomänen und Signalpeptide in ihrer Sequenz beinhalten, deuten bei acht Proteinen Sequenzhomologien auf deren Lokalisation an der Membran von Zellorganellen, wie der ER-Membran hin. Durch weitereHomologievergleiche mit den genannten Vorhersage-Programmen konnten insgesamt drei Proteine mit der Zytoskelett-Struktur assoziiert werden und fünf Proteine weisen auf eine Lokalisation an der Zellkern-Membran hin. Von den verbleibenden Proteinen können ausgehend von ihrer Struktur keine Rückschlüsse auf deren Lokalisation in der Zelle getroffen werden (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Differentielle Proteine, die mittels Nano-LC und anschließender MS/MS-Analyse aus Zelloberflächen-Protein-angereicherten Proben in *E. histolytica*-Zelllinie A oder Zelllinie B gefunden wurden

Proteinname	Accession-Nr.	SP/SA	TMD	Lokalisation	Funktion	Zelllinie
Plasmamembran Ca-transportierende ATPase	XP_651287	-	8	Zellmembran	Transport	А
CAAX Prenylpeptidase	XP_648770	SA	7	Zellmembran	Protein- Hydrolyse	А
Glycerophosphoryl- Diesterphosphodiesterase	XP_649476	SA	2	Zellmembran	Membran- Aufbau	А
Protein-Tyrosinkinase- Domänen-Protein	XP_651511	18–19	2	Zellmembran	Signal- transduktion	А
CoA-Biosynthese bifunktionelles Protein	XP_001913449	-	1	Zellmembran	Signal- transduktion	А
Chitobiosyldiphosphodolichol beta-Mannosyltransferase	XP_650919	-	2	ER-Membran	unbekannt	А
ATP-Bindungskassette	XP_654896	-	11	Zellmembran	Multidrogen- Resistenz	В
Gal/GalNAc-Lektin	XP_650534	14–15	1	Zellmembran	Zell/Zell- Kontakt	В
Fettsäure-Elongase	XP_656100	-	2	Zellmembran	Membran- Aufbau	В
Hypothetisches Protein	XP_650460	17–18	1	Zellmembran	unbekannt	В
Hypothetisches Protein	XP_653170	-	1	Zellmembran	unbekannt	В
ADP-Ribosylierungsfaktor	XP_654690	-	-	Zellmembran	unbekannt	В
Geranylgeranyl Pyrophosphatsynthetase	XP_001913825	26–27	-	Export/ Organellen	Post-transl. Modifikation	А
Proteindisulfidisomerase	XP_657045	15–16	-	ER-Membran	Protein- Organisation	А
Hypothetisches Protein	XP_656607	13–14	-	Export/ Organellen	unbekannt	А
Clathrin-Adaptor mittlere K ette	XP_654291	-	-	Export/ Organellen	Transport	А
Chromosomen Strukturprotein	XP_656581	-	-	Kern- Membran	DNA- Interaktion	А
Hypothetisches Protein	XP_653961	17–18	-	Export/ Organellen	unbekannt	В
Adenylatzyklase	XP_649500	20–21	-	Export/ Organellen	Signal- transduktion	В
Hypothetisches Protein	XP_656871	19–20	-	Export/ Organellen	unbekannt	В
60 S saures ribosomales Protein	XP_652637	26–27	-	ER-Membran	Ribosomen- Organisation	В
60 S ribosomales Protein L34	XP_654784	-	-	ER-Membran	Ribosomen- Organisation	В

Proteinname	Accession-Nr.	SP/SA	TMD	Lokalisation	Funktion	Zelllinie
60 S ribosomales Protein L35a	XP_651074	-	-	ER-Membran	Ribosomen- Organisation	В
Delta Untereinheit	BAE94790	-	-	Golgi- Membran	unbekannt	В
Hypothetisches Protein	XP_650677	-	-	ER-Membran	Ribosomen- Organisation	В
Hypothetisches Protein	XP_652587	-	-	Export/ Organellen	Signal- transduktion	В
Hypothetisches Protein	XP_653204	-	-	Export/ Organellen	Signal- transduktion	В
Rab-Familie GTPase	XP_649046	-	-	Export/ Organellen	Transport	В
Ran-bindendes Protein	XP_654676	-	-	Kern- Membran	Transport	В
Importin beta-Familie Protein	XP_653615	-	-	Kern- Membran	Transport	В
Importin beta	XP_651571	-	-	Kern- Membran	Transport	В
Hypothetisches Protein	XP_653110	-	-	Kern- Membran	Transport	В
Aktinin-ähnliches Protein	XP_648375	-	-	Zytoskelett	Zytoskelett- Organisation	А
Akto-bindendes Protein	O15602	-	-	Zytoskelett	Zytoskelett- Organisation	А
Aktin-bindendes Protein, Cofilin, Tropomyosin-Familie	XP_656437	-	-	Zytoskelett	Zytoskelett- Organisation	В
Rab-Familie GTPase	XP_651915	-	-	unbekannt	Signal- transduktion	А
C2-Domänen-Protein	XP_654499	-	-	unbekannt	Signal- transduktion	А
C2-Domänen-Protein	XP_655299	-	-	unbekannt	Signal- transduktion	А
C2-Domänen-Protein	XP_648781	-	-	unbekannt	Signal- transduktion	А
Transketolase	XP_001913844	-	-	unbekannt	Meta- bolismus	А
RNA-Helikase	XP_655794	-	-	unbekannt	RNA- Organisation	А
ATPase, AAA-Familie Protein	XP_651910	-	-	unbekannt	unbekannt	А
tRNA-Methyltransferase, katalytische Untereinheit	XP_653764	-	-	unbekannt	unbekannt	А
Hypothetisches Protein	XP_655518	-	-	unbekannt	unbekannt	А
Hypothetisches Protein	XP_001913915	-	-	unbekannt	unbekannt	Α
RhoGAP-Domänen-Protein	XP_655159	-	-	unbekannt	Signal- transduktion	В

Proteinname	Accession-Nr.	SP/SA	TMD	Lokalisation	Funktion	Zelllinie
Glycyl-tRNA-Synthetase	XP_656678	-	-	unbekannt	Meta- bolismus	В
Aldose 1-Epimerase	XP_649046	-	-	unbekannt	Meta- bolismus	В
(2r)-Phospho-3-Sulfolactat- Synthase	XP_656622	-	-	unbekannt	Meta- bolismus	В
SNF 7-Familie Protein	XP_656010	-	-	unbekannt	Transport	В
Fe-Hydrogenase	XP_652839	-	-	unbekannt	Stress- Antwort	В
Thioredoxin	XP_656726	-	-	unbekannt	Stress- Antwort	В
26s Peptidase-regulierende Untereinheit	XP_655230	-	-	unbekannt	Protein- Organisation	В
Aminopeptidase	XP_652558	-	-	unbekannt	Protein- Hydrolyse	В
HEAT-Domänen-Protein	XP_648597	-	-	unbekannt	unbekannt	В
Leucin-reiches Protein	XP_651490	-	-	unbekannt	unbekannt	В
Glucosamin 6-Phosphat N- Acetyltransferase	XP_648703	-	-	unbekannt	unbekannt	В
Bakterielle Transferase Hexapeptid-Familie Protein	XP_650707	-	-	unbekannt	unbekannt	В
Hypothetisches Protein	XP_650600	-	-	unbekannt	unbekannt	В
Hypothetisches Protein	XP_655054	-	-	unbekannt	unbekannt	В
Erythrozyten-Bindungsprotein	XP_650383	-	-	Zytoskelett	Zytoskelett- Organisation	В
Hypothetisches Protein	XP_653430	-	-	unbekannt	unbekannt	В

SP = vorhergesagte Position (Aminosäure-Nummer), an der das Signalpeptid vom Protein abgespalten wird

- SA = Signalanker
- TMD = vorhergesagte Anzahl der Transmembrandomänen
- A = Protein wurde exklusiv in Zelllinie A identifiziert
- B = Protein wurde exklusiv in Zelllinie B identifiziert

3.3 Differentielle Transkriptom-Analysen

3.3.1 Microarray I und Microarray II

Um weite Bereiche des gesamten Transkriptoms von *E. histolytica* zu untersuchen wurden Oligonukleotid-*Microarrays* eingesetzt. Sie ermöglichen eine große Anzahl von Genexpressionen innnerhalb eines Experimentes zu analysieren. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *Microarrays* für dieselbe Fragestellung verwendet. *Microarray I* repräsentiert mit 6.242 Genen ca. 60 % aller Gene von *E. histolytica* (Davis *et al.*, 2007). Die Gene wurden

zufällig, basierend auf den Daten der im Jahr 2005 publizierten Genomanalyse von *E. histolytica* (Loftus *et al.*, 2005), ausgewählt. *Microarray II* umfasst ca. 170 Gensequenzen von putativen Amöben-Pathogenitätsfaktoren. Neben den Peptidasen zählen dazu die Amoebapores, die strukturell zu den Saponin-ähnlichen Proteinen (SAPLIPs) gehören. Darüber hinaus sind weitere SAPLIPs und verschiedene Antioxidantien auf diesem *Microarray* II vertreten (siehe Tabelle-A2 im Anhang). Es sollten die Expressionsprofile von HM-1:IMSS Zelllinie A und B mit Hilfe der *Microarrays* untersucht und miteinander verglichen werden, um Moleküle zu finden, die als mögliche Pathogenitätsfaktoren in Betracht kommen.

Bei den verwendeten *Microarrays* dienen die komplementären Sequenzen der zu untersuchenden Gene als Sonden, die auf einer Glasmatrix fixiert sind. Für vergleichende Transkriptom-Studien wird parallel die mRNA beider miteinander zu vergleichenden Proben isoliert und in cDNA transkribiert. Beide Proben werden dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, bevor sie mit den Sonden des *Arrays* kohybridisiert werden. Hybridisierungssignale können mit einem *Scanner* detektiert werden, wobei die Intensität eines Signals proportional zur Menge des entsprechenden Transkripts ist. Gelbe Fusions-Signale repräsentieren Gene, die in beiden Proben gleichermaßen exprimiert sind. Einzel-Signale in Grün bzw. Rot verweisen hingegen auf Gene, die exklusiv in einer der beiden Proben exprimiert sind.

Um statistisch relevante Daten zu erhalten, müssen die Experimente mit biologischen Replikaten wiederholt werden. Auf eine vergleichbare Qualität der Proben ist daher besonders zu achten. Deshalb wurden die Zellen der verschiedenen biologischen Proben zum gleichen Zeitpunkt ihrer Wachstumsphase geerntet und ihre mRNA unter RNase-freien Bedingungen isoliert, um Degradationsprozesse der RNA zu vermeiden. Die Experimente wurden jeweils mit zwei biologischen Proben und einem probenspezifischem Austausch der Fluoreszenzfarbstoffe durchführt (*Dye-Swap*). Transkripte, die in einer der beiden Proben nach der Normalisierung in allen biologischen Replikaten und *Dye-Swap*-Experimenten übereinstimmend eine Ratio von ≥ 2 aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert bezeichnet.

Mit Hilfe des *Microarray I* wurden 87 Gene gefunden, die zwischen Zelllinie A und Zelllinie B differentiell transkribiert sind. Davon weisen 47 Gene differentiell höhere Transkriptmengen in Zelllinie A, und 40 Gene differentiell höhere Transkriptmengen in Zellline B auf. Von den 87 differentiell exprimierten Gene konnten 38 gemäß ihrer unterschiedlichen biologischen Funktion, wie Stress-Antwort, Zytoskelettstruktur, Transport, Signaltransduktion, Zellmetabolismus, enzymatische Prozesse und Proteindegradation, sowie Adhärenz-Prozesse klassifiziert werden. Zusätzlich wurden vier Gene den AIG-Proteinen zugeordnet (AIG = avrRpt2-induced gene). Die übrigen 45 Gene wurden als Proteine unbekannter Funktion kategorisiert (siehe Tabelle 3.5). Unter Verwendung des *Microarray II* wurden nur zwei Gene als differentiell transkribiert nachgewiesen. Die Metallopeptidase CAAX-Prenylpeptidase ist in erhöhten Mengen in Zelllinie A exprimiert, wohingegen die Cysteinpeptidase A4 erhöht in Zelllinie B transkribiert wird (siehe Tabelle 3.5*). Diese Gene wurden auch mit Hilfe des *Microarray I* untersucht. Die Ergebnisse beider *Arrays* bestätigen sich gegenseitig.

Stichprobenartig wurden einige der differentiellen Ergebnisse der *Microarray*-Analysen durch die unabhängige Methode der *Real-time* PCR verifiziert werden. Insgesamt wurden 26 der differentiellen Gene mit dieser Technik untersucht. Dabei wurde β -aktin als Referenzgen ausgewählt, und Zelllinie A diente als Kalibrator. Der Grenzwert für eine differentielle Genexpression lag bei \geq 2,5 (siehe 2.5.8). Die Oligonukleotide, die für die *Real-time* PCR eingesetzt wurden, sind im Anhang Tabelle-A1 aufgelistet.

Alle Ergebnisse, die mittels der *Real-time* PCR gewonnen wurden, bestätigen die Daten der *Microarray*-Experimente (siehe Tabelle 3.5).

Genname	Accession-Nr.	<i>Microarray</i> -Daten (≥ 2,0)		RT-PCR-Daten (≥ 2,5)	
		Zelllinie A	Zelllinie B	Zelllinie A	Zelllinie B
Stress-Antwort					
Fe-Sufat-Flavoprotein	XM_650038	2,09		-	-
Fe-Hydrogenase	XM_647747		2,44		3,22
Methionin-gamma Lyase	XM_643675		2,38	-	-
70 kDa Hitzeschockprotein	XM_648787		2,27		2,78
Zytoskelettstruktur			•		
Erythrozyten-Bindungsprotein	XM_645291		14,28		50,00
Virales A-Typ-Einschlussprotein	XM_649962		5,26		980,00
Transport			•		
Vakuolares Protein Sortierung 35	XM_646067	2,56		-	-
Beige/BEACH-Domänen-Protein	XM_646695		5,26		4,55
Vermittler-Superfamilie Protein	XM_651348		2,17	-	-
Signaltransduktion					
Rab-Familie GTPase	XM_646110	62,00		743,45	
Rab-Familie GTPase	XM_648456	25,37		125,00	
C2-Domänen-Protein	XM_650207	16,65		1000,00	
C2-Domänen-Protein	XM_650951	6,62		33,35	
Rab-Familie GTPase	XM_651385	14,5		50,00	
Ras-Familie GTPase	XM_644490	3,12		-	-
Kasein-Kinase	XM_643682	3,09		-	-
Rab-Familie GTPase	XM_650116	2,23		-	-
Ras-Guaninnukleotidfaktor	XM_646718	2,00		-	-
Rab-Familie GTPase	XM_646823	25,37		125,00	
Exosomkomplex Exonuklease 1	XM_646062	3,14		5,34	
Aktivator 140 kDa-Untereinheit	XM_646064	3,02		3,15	
Mitose-induzierend Phosphatase	XM_644512	2,87		-	-
Chromosomentruktur Protein	XM_645549		2,38	-	-
Zellmetabolismus					
Alkylsulfatase	XM_646063	2,80		-	-
Ornithinzyklodeaminase	XM_646653		2,56	-	-
Karboanhydrase	XM_651594		2,00	-	-
Hydrolasen	· · ·				
Lipase	XM_644468	3,47		4,41	
Metall-abhängige Hydrolase	XM_646973	2,14		-	-
Amidohydrolase	XM_644478		2,22	-	-
P-Schleife-Nukleosidtriphosphat	XM_648447		2,12	-	-

Tabelle 3.5: Ergebnis der differentiellen Genexpression von Zelllinie A und Zelllinie B, analysiert mittels vergleichender *Microarray*-Technologie und *Real-time* PCR (RT-PCR).

Genname	Genname Accession- Microarray-Daten (≥ 2,0)		Daten (≥ 2,0)	RT-PCR-Daten (≥ 2,5)	
	Nr.	Zelllinie A	Zelllinie B	Zelllinie A	Zelllinie B
Transferasen		1	1	1	1
IP:PROFILE:CPASE_2	XM_651246		3,45		3,03
Nukleosiddiphosphat Kinase	XM_649912		2,08	-	-
Proteindegradation		1		1	1
Metallopeptidase 8-2	XM_647540	21,44		70,58	
CAAX-Prenylpeptidase	XM_643678	2,36/3,22*		4,00	
Cysteinpeptidase A4	XM_651510		2,56/2,27*	-	-
Adherenz-Proteine	1	1		1	I
Lgl3	XM_649244	2,09		-	-
Gal/GalNAc-Lektin, schwere UE	XM_651089	2,05		-	-
ENTH-Domänen-Protein	XM_645367		2,12	-	-
AIG-Proteine	•		•	•	•
AIG1-Familie Protein	XM_648725		14,29		100,00
AIG1-Familie Protein	XM_648115		12,50		100,00
AIG1-Familie Protein	XM_645223		12,50		4,76
AIG1-Familie Protein	XM_643009		4,34		100,00
Proteine unbekannter Funktion				1	1
IP:PFAM:XYPPX, Annexin	XM_648445	52,11		866,52	
NHL-wiederholendes Protein	XM_644469	3,52		5,71	
IP:PFAM, Tetraspanin	XM_643681	3,46		7,53	
START-Domänen-Protein	XM_649195	2,03		-	-
IP:PROFILE:PA2_HIS	XM_645260	3,68		3,74	
IP:SUPERFAMILIE:PI-binde-N	XM_644044	2,03		-	-
Hypothetisches Protein	XM_646065	3,23		-	-
Hypothetisches Protein	XM_642874	3,06		-	-
Hypothetisches Protein	XM_650614	2,57		-	-
Hypothetisches Protein	XM_647743	2,54		-	-
Hypothetisches Protein	XM_646719	2,47		-	-
Hypothetisches Protein	XM_643680	2,36		-	-
Hypothetisches Protein	XM_649953	2,30		-	-
Hypothetisches Protein	XM_647486	2,28		-	-
Hypothetisches Protein	XM_648775	2,27		-	-
Hypothetisches Protein	XM_646066	2,23		-	-
Hypothetisches Protein	XM_646972	2,22		-	-
Hypothetisches Protein	XM_643672	2,13		-	-
Hypothetisches Protein	XM_651312	2,05		-	-
Hypothetisches Protein	XM_647129	2,00		-	-

Genname	Accession-	<i>Microarray</i> -Daten (≥ 2,0)		RT-PCR-Daten (≥ 2,5)	
	Nr.	Zelllinie A	Zelllinie B	Zelllinie A	Zelllinie B
Proteine unbekannter Funktion					
Hypothetisches Protein	XM_651187	2,43		-	-
Hypothetisches Protein	XM_649398	2,36		-	-
Hypothetisches Protein	XM_646587	5,52		-	-
Hypothetisches Protein	XM_646717	2,64		-	-
Hypothetisches Protein	XM_651117	2,64		-	-
Hypothetisches Protein	XM_645298		2,08	-	-
Hypothetisches Protein	XM_644818		2,04	-	-
Hypothetisches Protein	XM_646245		2,50	-	-
Hypothetisches Protein	XM_651365		2,22	-	-
Hypothetisches Protein	XM_651628		2,00	-	-
Hypothetisches Protein	XM_647746		2,22	-	-
Hypothetisches Protein	XM_642828		2,22	-	-
Hypothetisches Protein	XM_644703		2,08	-	-
Hypothetisches Protein	XM_645139		9,09		5,00
Hypothetisches Protein	XM_646072		2,22	-	-
Hypothetisches Protein	XM_645300		2,13	-	-
Hypothetisches Protein	XM_648447		2,13	-	-
Hypothetisches Protein	XM_647137		8,33		7,14
Hypothetisches Protein	XM_648869		6,25		3,85
Hypothetisches Protein	XM_649025		3,13	-	-
Hypothetisches Protein	XM_643923		2,33	-	-
Hypothetisches Protein	XM_649961		2,27	-	-
Hypothetisches Protein	XM_645369		2,04	-	-
Hypothetisches Protein	XM_647745		2,00	-	-
Hypothetisches Protein	XM_647807		2,00	-	-

* = Ergebnis der *Microarray*-Analyse II

= es wurde keine Messung mittels *Real-time* PCR durchgeführt

3.3.2 Differentielle Transkriptom-Analyse der *aig*-Gene von *E. histolytica* mittels *Real-time* PCR

Auf dem *Microarray I* befinden sich Sequenzen, die für vier verschiedene *E. histolytica*spezifische *aig*-Gene kodieren. Da alle vier Gene differentiell erhöht in der pathogenen Zelllinie B exprimiert sind, wurde diese Genfamilie genauer untersucht. Das *aig1*-Gen wurde ursprünglich in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde eine Gruppe von Genen in *E. histolytica* als putative *aig*-Gene annotiert. Durch eine Sequenz-Analyse mit Hilfe der NCBI Protein-Datenbank konnten 54 *aig*-homologe Gene im Genom von *E. histolytica* gefunden werden, die mindestens eine 60 %ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz mit der des AIG1-Proteins von *Arabidopsis thaliana* aufweisen. Darüber hinaus konnten durch die Anwendung von *in silico*-Techniken wie *ExPasy Tools* Vorhersagen über die Struktur dieser Proteine getroffen werden. So ließen sich putative Transmembrandomänen, Signalpeptide und *Coiled-Coil*-Strukturen identifizieren. Abhängig von der Anzahl ihrer Transmembrandomänen, lassen sich die *E. histolytica aig*-Gene (*ehaig*) in vier Gruppen einteilen (siehe Abbildung 3.8).



Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Genstruktur der *aig*-Gene von *E. histolytica* im Vergleich zu der *aig1*-Genstruktur von *Arabidopsis thaliana*. Das *aig1*-Gen von *A. thaliana* ist charakterisiert durch fünf konservierte GTP-Bindungsstellen (GTPasen G1–G5), einer konservierten Box (CB), einer *Coiled-coil*-Struktur (Cc) eines immun-assoziierten Nukleotid-Motivs (IAN) und einer Transmembrandomäne (TM). Die Struktur der *ehaig*-Gene ist homolog zu diesem *aig1*-Gen, unterscheidet sich davon jedoch durch das Fehlen der G4 und G5 Motive. Stattdessen werden sie durch zwei neue hochkonservierte Bereiche (C4 und C5) ersetzt. Die konservierte Box ist teilweise modifiziert, jedoch zwischen allen *E. histolytica aig*-Genen hochkonserviert. Darüber hinaus können sie bis zu drei Transmembrandomänen besitzen.

Mittels *Real-time* PCR sollten vergleichende Transkriptom-Studien der *aig*-Gene zwischen Zelllinie A und B durchgeführt werden. Da zwischen den Sequenzen der *aig*-Gene stark konservierte Bereiche auftreten, gelang es nur für 31 der 54 *aig*-Gene spezifische Oligonukleotide für die *Real-time* PCR zu synthetisieren. Um relative Mengen des jeweiligen Transkripts in beiden Zelllinien bestimmen zu können, wurde gegen das Referenzgen β -*aktin* normalisiert. Als Kalibrator wurde Zelllinie A eingesetzt. Der Grenzwert für eine differentielle Genexpression wurde auf \geq 2,5 festgelegt. Die Experimente wurden mit zwei biologischen und zwei technischen Replikaten wiederholt (siehe 2.5.8). Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang Tabelle-A1 verzeichnet.

Von den 31 *aig*-Genen sind 15 Gene differentiell in erhöhten Mengen in der pathogenen Zelllinie B transkribiert, wohingegen nur ein Gen in der apathogenen Zelllinie A differentiell höher exprimiert ist. Die übrigen 15 Gene liegen mit ihren Transkriptmengen in einer der beiden Zelllinien außerhalb des definierten Grenzwertes für eine differentielle Genexpression (siehe Tabelle 3.6).

Genname	Accession-Nr.	TMD	RT-PCR-D	aten (≥ 2,5)
			Zelllinie A	Zelllinie B
AIG 1-Familie Protein	XM_643035	0	12,50	
AIG 1-Familie Protein	XM_643240	0		2,63
AIG 1-Familie Protein	XM_643194	1		2,63
Putatives AIG-Protein	XM_643099	0		2,70
Putatives AIG-Protein	XM_643163	0		2,94
Putatives AIG-Protein	XM_643164	0		3,57
Putatives AIG-Protein	XM_648115	0		3,70
AIG 1-Familie Protein	XM_648140	0		5,55
AIG 1-Familie Protein	XM_649824	0		10,00
Putatives AIG-Protein	XM_643798	1		10,00
AIG 1-Familie Protein	XM_645021	0		11,11
Putatives AIG-Protein	XM_642923	0		11,11
AIG 1-Familie Protein	XM_644114	1		12,50
AIG 1-Familie Protein	XM_643379	1		16,67
Putatives AIG-Protein	XM_643380	2		20,00
Putatives AIG-Protein	XM_643637	2		20,00
Putatives AIG-Protein	XM_643100	0	n.d.	n.d.
Putatives AIG-Protein	XM_643463	0	n.d.	n.d.

 Tabelle 3.6: Real-time PCR-Analyse zur Untersuchung der differentiellen Genexpression von aig-Genen zwischen E. histolytica-Zelllinie A und Zelllinie B

Genname	Accession-Nr.	TMD	RT-PCR-Daten (≥ 2,5)	
			Zelllinie A	Zelllinie B
Putatives AIG-Protein	XM_643195	3	n.d.	n.d.
Putatives AIG-Protein	XM_648158	0	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_643735	0	n.d.	n.d.
Putatives AIG-Protein	XM_643097	0	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_643462	0	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_643464	0	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_642959	3	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_644115	0	n.d.	n.d.
Putatives AIG-Protein	XM_644113	0	n.d.	n.d.
Putatives AIG-Protein	XM_643102	0	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_643721	0	n.d.	n.d.
AIG 1-Familie Protein	XM_643063	3	n.d.	n.d.
Putatives AIG-Protein	XM_642922	3	n.d.	n.d.

TMD = vorhergesagte Anzahl der Transmembrandomäne

n.d. = nicht differentiell

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse, die durch differentielle Proteom-Studien und Transkriptom-Studien gewonnen wurden

Mit dem Ziel Moleküle zu identifizieren, die zur Pathogenität von *E. histolytica* beitragen, wurden die apathogene HM-1:IMSS-Zelllinie A und die pathogene HM-1:IMSS-Zelllinie B auf Proteom- und Transkriptom-Ebene miteinander verglichen. Die DIGE-Daten liefern Informationen über die Proteine, die in NaPBS löslich sind, als über die Proteine, die durch Urea in Lösung gebracht werden konnten. Das Oberflächen-Proteom von *E. histolytica* wurde bisher noch nicht genauer charakterisiert. Jedoch könnten diese Proteine für die Virulenz des Erregers von spezieller Bedeutung sein, da *E. histolytica* als Endoparasit mit dem Immunsystem des Menschen konfrontiert wird. Bestimmte Oberflächenmoleküle werden möglicherweise als Antigene erkannt, andererseits befinden sich bereits bekannte Pathogenitätsfaktoren, wie das Gal/LalNAc-Lektin an der Zelloberfläche, so dass sich dort noch weitere Proteine befinden könnten, die zur Pathogenität von *E. histolytica* beitragen. Daher war es in dieser Arbeit von besonderem Interesse, dieses Set von Proteinen zu analysieren. Mit Hilfe der *Microarray*-Studie und der *Real-time* PCR wurden vergleichende Transkriptom-Analysen durchgeführt. Um statistisch abgesicherte Datensätze zu erhalten,

wurden Wiederholungsexperimente mit biologischen und technischen Replikaten gemacht. Einige der gewonnen Daten wurden durch die Anwendung einer unabhängigen Technik, wie der Real-time PCR und der Westernblot-Analyse verifiziert.

Bisher existiert keine publizierte Arbeit, die sich sowohl auf Proteom- als auch auf Transkriptom-Ebene mit der Pathogenität von E. histolytica beschäftigt. In der vorliegenden Arbeit wurden neben den Informationen, die aus den einzelnen Analysen erhalten wurden, alle Daten miteinander korreliert, um die biologischen Zusammenhänge in dem Erreger besser interprätieren zu können. Dabei bestand die Herausforderung darin, die große Datenmenge von vielen hundert Molekülen zu sortieren, auszuwerten, zu identifizieren und schließlich die differentiellen Moleküle die in Zelllinie A oder Zelllinie B gefunden wurden herauszufiltern. Bei der Betrachtung der Ergebnisse liegt der Fokus auf den Molekülen, die in differentiell höheren Mengen bzw. exklusiv in der pathogenen Zelllinie B gefunden wurden, da sie als Pathogenitätsfaktoren von E. histolytica in Betracht gezogen werden können. In der DIGE-Studie wurden die Antioxidantien Fe-Hydrogenase, Peroxiredoxin und SOD in erhöhten Mengen in Zelllinie B gefunden. Sie sind an der oxidativen Stress-Antwort beteiligt, wenn der mikroaerophile Erreger während der Gewebe-Invasion mit dem sauerstoffreichen Milieu konfrontiert wird. Die Analyse des Membranoberflächen-Proteoms mit Hilfe der Nano-LC identifizierte viele Moleküle, die in der DIGE-Studie in der Urea-löslichen Proteinfraktion unentdeckt geblieben sind. Dadurch zeigt sich der Vorteil einer so hochsensitiven Technik wie der Nano-LC. Interessanterweise konnte das als Pathogenitätsfaktor beschriebene Gal/GalNAc-Lektin bei dieser Analyse ausschließlich in der pathogenen Zelllinie B nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden viele Proteine gefunden, die durch die Anwesenheit von Transmembrandomänen und Signalpeptiden nachweislich an der Zellmembran lokalisiert sind, über ihre Funktion in E. histolytica ist jedoch bisher sehr wenig bekannt. Die Transkriptom-Studien lieferten insofern ein außergewöhnliches Ergebnis, als dass die aig-Gene vorwiegend in der pathogenen Zelllinie B und Gene der rab- und rho-Familien hauptsächlich in der apathogenen Zelllinie A differentiell höher exprimiert sind. Die aig-Gene und auch die rab- und rho-Familien-Gene kodieren für GTPasen, die an der Signaltransduktion in der Zelle beteiligt sind. Moleküle, die das Zytoskelett strukturieren oder damit assoziiert werden können wurden interessanterweise vorzugsweise in der apathogenen Zelllinie A in differentiell höheren Mengen gefunden.

Beim Vergleich der verschiedenen Studien fällt besonders auf, dass viele unterschiedliche differentielle Moleküle in Zelllinie A oder Zelllinie B detektiert wurden jedoch nur sehr wenige Moleküle sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf Protein-Ebene in allen

87

Studien übereinstimmende Resultate zeigten. Sowohl die Membranoberflächen-Proteom-Analyse als auch die Transkriptom-Studie dokumentierten differentiell höhere Mengen der CAAX-Prenylpeptidase (XP_648770), dem C2-Domänen Protein (XP_654499) und der Rab-Familie GTPase (XP_651915) in der apathogenen Zelllinie A. Ausserdem konnten ein hypothetisches Protein (XP_653961) und das Erythrozyten Bindungsprotein (XP_650383) in beiden Studien in der pathogenen Zelllinie B in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Explizit sind nur zwei Moleküle in allen Analysen mit übereinstimmenden Ergebnissen gefunden worden. Dazu zählen die Fe-Hydrogenase (XP_652839), die vermehrt in der pathogenen Zelllinie B vorliegt und das C2-Domänen-Protein (XP_655299), das in differentiell höheren Konzentrationen in der apathogenen Zelllinie A vorkommt. Über die Funktion beider Moleküle in *E. histolytica* ist bisher sehr wenig bekannt. Mit dem Ziel einen Hinweis auf ihre biologische Funktion zu erhalten, wurden die Fe-Hydrogenase und das C2-Domänen-Protein durch weiterführende Experimente genauer untersucht werden (siehe 3.5).

3.5 Überexpressionsstudien

Die Moleküle, die anhand der Ergebnisse der vergleichenden Proteom- und Transkriptom-Studien übereinstimmend in einer der beiden Zelllinien eine differentielle Regulation zeigten, sollten genauer untersucht werden, um ihre Funktion und ihre mögliche Beteiligung an der Pathogenität von *E. histolytica* besser zu verstehen. Im Rahmen dieser Arbeit war dies nur beispielhaft für zwei ausgewählte Moleküle möglich.

Die Fe-Hydrogenase (*ehfe-hyd*, XM_647747) zeigte sich sowohl in der *Microarray*-Studie I, als auch in der DIGE-Studie und der Analyse der Membranoberflächen-Proteome in der pathogenen Zelllinie B differentiell höher reguliert, wohingegen das C2-Domänen-Protein (*ehc2-dp*, XM_650207) in der apathogenen Zelllinie A in höheren Mengen vertreten ist (siehe Tabelle 3.3 und 3.5). Die Fe-Hydrogenase sollte mit Hilfe des Expressionsvektors Neokassette in Trophozoiten der apathogenen Zelllinie A überexprimiert werden. Das C2-Domänen-Protein sollte hingegen mit dem gleichen Vektor-System in der pathogenen Zelllinie B überexprimiert werden.

Der Vektor pNC leitet sich von dem Vektor pEhNEO/CAT ab (Hamann *et al.*, 1995) und besitzt eine für Neomycin-Phosphotransferase kodierende Sequenz, flankiert von 480 Bp des 5'-untranslatierten und 600 Bp des 3'-untranslatierten Bereichs eines *aktin*-Gens von

E. histolytica. In die Schnittstelle für die Restriktionsenzyme *Kpn* I und *BamH* I wurde das *ehfe-hyd*-Gen mit einer Größe von 1515 bp, bzw. das *ehc2-dp*-Gen mit einer Größe von 567 bp kloniert, so dass das Zielgen durch 485 Bp des 5'-untranslatierten Bereichs eines *lektin*-Gens und 600 Bp des 3'-untranslatierten Bereichs eines *aktin*-Gens von *E. histolytica* flankiert wird. Die Expressionsvektoren wurden als pNC-EhFe-Hyd und pNC-EhC2-DP bezeichnet. Der Vektor pNC diente in allen Experimenten als Kontrolle (siehe Abbildung 3.9). Die Überexpressionsvektoren pNC-EhFe-Hyd und pNC-EhC2-DP wurden unabhängig voneinander in *E. histolytica*-Trophozoiten transfiziert. Die Selektion erfolgte mit dem Neomycin-Analogon *G418* (siehe 2.5.20).

Unerwarteterweise gelang es auch nach mehreren Wiederholungen des Experiment nicht, das *ehc2-dp*-Gen erfolgreich in Trophozoiten der Zelllinie A zu transfizieren. Sobald die Zellen dem Selektionsdruck mit *G418* ausgesetzt waren, starben sie ausnahmslosab. Insofern scheint der Vektor pNC-EhC2-DP nicht von den Zellen aufgenommen worden zu sein. Aus diesem Grund konnte nur mit den pNC-EhFe-Hyd-Transfektanten weiter gearbeitet werden.



Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der *E. histolytica* Expressionsvektoren pNC, pNC-EhC2-DP und pNC-EhFe-Hyd. Die Sequenzen der farbig dargestellten Zielgene wurden jeweils über die *Kpn I/BamH* I-Schnittstelle in pNC eingefügt. Die Pfeile verweisen auf die Orientierung des Transkripts.

Durch *Real-time* PCR-Analysen konnte der Anstieg der Transkriptmenge der Fe-Hydrogenase gegnüber der Kontrolle (pNC), die als Kalibrator eingesetzt wurde, gemessen werden. Als Referenzgen diente β -aktin. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang Tabelle-A1 verzeichnet. Für die Fe-Hydrogenase wurde ein 130,8-facher Anstieg der Transkriptmenge gegenüber der Kontrolle gemessen werden, wodurch eine erfolgreiche Überexpression dieses Gens in Zelllinie A belegt werden konnte.

3.6 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen die rekombinante Fe-Hydrogenase

Um die Fe-Hydrogenase genauer zu untersuchen, wurde sie mit einem N-terminalen His-*Tag* in pAPlacI^Q-Bakterien rekombinant synthetisiert. Dafür wurde sie über die *EcoR I/BamH* I Schnittstelle in den pJC45-Vektor kloniert und dieser während der Transformation in die pAPlacI^Q-Zellen geschleust. Das rekombinante Protein konnte mit Hilfe seiner His-Markierung über eine Nickelsäule aus der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenisats gereinigt werden, was in einem Westernblot mit einem Antikörper gegen das Histidin überprüft wurde. Das gereinigte Protein zeigt in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 58 kDa. Nach Berücksichtigung das Molekulargewicht der His-Markierung von 3 kDa stimmt das Gewicht mit dem theoretisch erwartetem Gewicht von 55,1 kDa überein (siehe Abbildung 3.10).



Abbildung 3.10: Westernblot-Analyse der rekombinanten Fe-Hydrogenase. Das Protein konnte indirekt über seine His-Markierung mit einen Anti-Histidin Antikörper in der löslichen Fraktion des Bakterienhomogenisats nachgewiesen werden. Ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel, mit dem die Qualität und Menge der Proben geprüft wurde, zeigte ebenfalls eine saubere 55 kDa-Bande in dem löslichen Proteinextrakt (Ergebnis nicht gezeigt). LP = lösliche Proteinfraktion, ULP = unlösliche Proteinfraktion

Anschließend wurden polyklonale Antikörper gegen die rekombinante Fe-Hydrogenase gewonnen werden. Weibliche BALB/c-Mäuse wurden daher mit dem rekombinanten Protein immunisiert und durch zwei *Booster*-Injektionen die Antikörperbildung maximiert. Aus dem Blut der Mäuse wurde das Antiserum gewonnen, welches in einer Westernblot-Analyse auf seine Spezifität geprüft wurde. Dabei wurden die NaPBS-löslichen Proteinfraktionen von Zelllinie B, Zelllinie A, Zelllinie A-pNC und Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd eingesetzt (siehe Abbildung 3.11). Der Antikörper zeigt ein spezifisches Signal bei allen Proben bei ca.

55 kDa. Erwartungsgemäß sind die Signale bei Zelllinie B und Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd bei vergleichbaren Proteinkonzentratinen am stärksten.



Abbildung 3.11: Westernblot-Analyse zur Überprüfung der Spezifität des polyklonalen Antikörpers gegen die rekombinante Fe-Hydrogenase (Anti-EhFe-Hyd). Es wurden jeweils 40 µg des Proteins der Zelllinie B (B), der Zelllinie A (A), den Zelllinie A-pNC-Transfektanten (A-pNC) und den Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd-Transfektanten (A-pNC-EhFe-Hyd) in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und anschließend mit der Nassblot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden mit dem polyklonalen Anti-EhFe-Hyd Antikörper (1:2.000) inkubiert. Mit Hilfe eines HRP-konjugierten sekundärem Antikörpers (1:5.000) und einer ECL-Entwicklung wurde die Reaktion sichtbar gemacht. Das Coomassie-gefärbte Gel belegt, dass verleichbare Konzentrationen der verschiedenen Proteine eingesetzt wurden. Zelllinie B zeigte in den DIGE- und *Microarray*-Studien differentiell höhere Konzentrationen der Fe-Hydrogenase im Vergleich zu Zelllinie A. Dieses Ergebnis spiegelt auch der Westernblot wider. Erwartungsgemäß zeigt auch die Fe-Hydrogenase überexprimierende Zelllinie eine höhere Proteinkonzentration im Vergleich zu beiden Kontroll-Zelllinien (A und A-pNC).

3.6.1 Lokalisations-Studien der Fe-Hydrogenase in *E. histolytica*-Trophozoiten mittels IFA

Mit Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Fe-Hydrogenase in *E. histolytica*-Trophozoiten der Zelllinie B, Zelllinie A, Zelllinie A-pNC und Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd lokalisiert werden. Dafür wurden die Zellen geerntet, fixiert und parallel mit dem Poren-bildenden Saponin und ohne Saponin behandelt, bevor sie mit dem Antikörper gegen die rekombinante Fe-Hydrogenase inkubiert wurden. Zur Detektion wurde ein sekundärer Alexa 488-markierter anti-Maus-IgG Antikörper eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellkerne der Trophozoiten mit DAPI gefärbt.

Saponin verursacht eine Porenbildung in der Zellmembran. Mit Saponin behandelte Zellen werden dadurch für den eingesetzten Antikörper durchlässig, welcher dadurch mit zytosolischen Epitopen reagieren kann. Werden die Zellen higegen ohne Saponin inkubiert,

kann ein Antikörper nur mit Antigenen reagieren, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigt intrazelluläre Signale für den anti-Fe-Hydrogenase Antikörper bei allen Proben, die mit Saponin behandelt wurden. Bei Zellen, die nicht mit Saponin inkubiert wurden, ist keine Reaktion nachweisbar (Ergebnis nicht gezeigt). Dies belegt, dass die Fe-Hydrogenase sich nicht an der Zelloberfäche der Trophozoiten befindet. Die Intensität der Signale lässt auf die Konzentration der intrazellulär vorhandenen Fe-Hydrogenase rückschließen. Zelllinie B und Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd zeigen dabei die stärksten Signale, wohingegen die Kontrolle (Zelllinie A-pNC) und Zelllinie A vergleichsweise schwächere Signale liefern (siehe Abbildung 3.12 A). Um die komplexe Struktur des Zytoplasmas optisch detailierter aufzulösen, wurde eine Deconvolution-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe des Programms Open Lab 4.0.4 wurde eine mikroskopierte Zelle in 0,3 µm-durchmessenden Abständen fotografiert, bevor alle anderen Ebenen rechnerisch aus einem optischen Schnitt herausgenommen wurden. Jeweils ein Einzelschnitt von Zelllinie B und Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd wurde in Abbildung 3.12 B dargestellt. Die Ebene des Schnitts durchläuft ungefähr den Mittelpunkt der Zelle. Dabei verdeutlichen diese Aufnahmen, dass der Antikörper gegen die Fe-Hydrogenase im Zytoplasma beider Proben reagiert, die Zellvakuolen davon aber unberührt bleiben. Wichtig ist dabei die Beobachtung, dass die Lokalisation der Fe-Hydrogenase in Zelllinie B und pNC-EhFe-Hyd-Transfektanten identisch ist, und somit das Protein in den Transfektanten offensichtlich funktionell intakt synthetisiert werden konnte. Um ausschließen zu können, dass der Sekundär-Antikörper Kreuzreaktionen mit den Präparaten bildet, wurde er in einer Kontrolle ohne den Primär-Antikörper direkt mit den Zellen inkubiert. Die Reaktion verlief negativ (Ergebnis nicht gezeigt).



Abbildung 3.12: A Immunfluoreszenz-Analyse (IFA) zur Lokalisierung der Fe-Hydrogenase in *E. histolytica*-Trophozoiten. Abgebildet sind fixierte, Saponin-behandelte Trophozoiten der Zelllinie B, Zelllinie A, Zelllinie A-pNC und der Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd. Für jede Zelllinie wurde beispielhaft eine repräsentative Zelle abgebildet. Die Bindung des Anti-Fe-Hyd Antikörper (1:300) wurde über einen Alexa 488-markierten sekundären Anti-Maus-IgG Antikörper (1:400) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (1:100) angefärbt. Die *Overlay*-Darstellung zeigt rechnerisch übereinandergelegt die Alexa 488- und die DAPI-Färbung gemeinsam. Die Mikroskopien wurden bei 630-facher Vergößerung unter Verwendung von Immersionsöl aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden mit gleicher Belichtungszeit erstellt. Dies ermöglicht es einen Zusammenhang zwischen der Intensität des Fluoreszenz-Signals und der Konzentration der Fe-Hydrogenase in der jeweiligen Zelle herzustellen. Alle Zellen zeigen intrazelluläre Signale, wobei die Vakuolen ausgespart bleiben. Zelllinie B und Zelllinie A-pNC-EhFe-Hyd zeigen die stärksten Signale. Dies bestätigt die Ergebnisse, die aus den vorhergehenden Versuchen gewonnen wurden. Zelllinie A und Zelllinie A-pNC zeigen dagegen deutlich schwächere Signale und unterscheiden sich nicht in ihrer Signal-Intensität. Dadurch erweist sich die Kontrolle (pNC) als geeignet.



Abbildung 3.12: B Die *Deconvolution*-Analyse der Mikroskopien ermöglicht es optische Schnitt-Ebenen durch die Zelle zu legen. Es entstanden auf diese Weise 0,3 µm-dicke Schnitte, die die Antikörper-Färbung im Zytoplasma der Zelle sehr deutlich zeigen. Der Fe-Hydrogenase-Antikörper bindet intrazellulär in Trophozoiten der Zelllinie B und der pNC-EhFe-Hyd-Transfektanten, ausgespart bleiben hingegen die Zellvakuolen. Dadurch konnte dokumentiert werden, dass die Transfektanten nicht nur die Fe-Hydrogenase verstärkt exprimieren, sondern auch das Protein in der Weise synthetisiert und lokalisiert ist, wie es unter natürlichen Bedingungen geschieht.

4 DISKUSSION

4.1 Pathogenitätsfaktoren von E. histolytica

Die Infektion mit dem Humanparasiten *E. histolytica* kann in verschiedenen Verlaufsformen auftreten. Bei invasiven Krankheitsverläufen müssen die Parasiten sehr unterschiedliche Bedingungen im Wirt überleben können, und sind zusätzlich den Abwehrmechanismen des Menschen ausgesetzt. Die Gründe, weshalb eine Infektion mit *E. histolytica* wie in den meisten Fällen asymptomatisch oder wie in manchen Fällen invasiv verlaufen, sind weitgehend ungeklärt. Es sind zwar verschiedene Proteine, wie Cysteinpeptidasen, *Amoebapores* und Lektine als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* beschrieben worden, jedoch sind die genannten Proteine sowohl bei pathogenen als auch apathogenen *E. histolytica*-Isolaten zu finden (Davis *et al.*, 2007). Diese Faktoren können deshalb nicht alleine für die Virulenz der Amöben verantwortlich sein. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von *Microarray*-Analysen und Proteom-Studien weitere Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* identifiziert werden. Davon sollten ausgewählte Moleküle weiterführend untersucht werden, um deren biologische Funktion und eine mögliche Beteiligung an der Pathogenität von *E. histolytica* aufzuklären.

4.2 Charakterisierung der HM-1:IMSS-Zelllinie A und der HM-1:IMSS-Zelllinie B

Um auf molekularer Ebene Faktoren zu identifizieren, die mit der Virulenz von *E. histolytica* in Verbindung gebracht werden können, bieten sich vergleichende Analysen zwischen verschiedenen *E. histolytica*-Zelllinien an, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden. Verschiedene Studien haben diesen Ansatz thematisiert (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2006; MacFarlane und Singh, 2006). Dabei wurden vorwiegend das Isolat HM-1:IMSS und das Isolat Rahman miteinander verglichen. HM-1:IMSS stammt aus einem Amöbenkolitis-Patienten und wurde für die Genom-Sequenzanalyse von *E. histolytica* eingesetzt (Loftus *et al.*, 2005). Nach mehrmaligen Leber-Passagen der HM-1:IMSS-Trophozoiten in Versuchstieren gelang es den genannten Arbeitsgruppen phänotypisch aggressive Zellen zu erzeugen, die Amöbenleberabszesse (ALA) im Tiermodell induzieren können. Rahman wurde aus einem Patienten mit einer asymptomatisch verlaufenden Amöbiasis isoliert. Dieses Isolat ist apathogen und nicht dazu befähigt, Amöbenkolitis oder

ALAs im Tiermodell hervorzurufen. Verwendet man diese beiden Isolate für vergleichende Studien, die Hinweise auf Pathogenitätsfaktoren liefern sollen, so hat diesen System einen entscheidenden Schwachpunkt: HM-1:IMSS und Rahman haben einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Zudem zeigt Rahman verschiedene Defekte. Unter anderem zeigen diese Zellen in *in vitro*-Experimenten eine stark verminderte zytopathische Aktivität und weisen eine Dysfunktion in ihrer Phagozytose auf (Davis *et al.*, 2006). Es bleibt daher zu vermuten, dass diese Defekte für die verminderte Virulenz von Rahman verantwortlich sind, und sich dieses System deshalb nicht dafür eignet tatsächliche Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* identifizieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die vergleichenden Pathogenitätsstudien mit zwei Zelllinien durchgeführt, die beide von dem Isolat HM-1:IMSS abstammen. Um sicherzustellen, dass sie auf denselben genetischen Hintergrund zurückgehen, wurden sie genotypisch analysiert, bevor sie für alle übrigen Experimente eingesetzt wurden.

4.2.1 Genotypische Charakterisierung

Von beiden HM-1:IMSS-Zelllinien wurden zur Überprüfung ihrer genetischen Abstammung *tRNA-linked short tandem repeat* (STR)-Sequenzen ihrer DNA von sechs verschiedenen chromosomalen *Loci* mit Hilfe einer PCR analysiert. Nach Kenntnisstand, repräsentieren diese höchst polymorphen Sequenzen die am besten geeigneten genomischen Marker in *E. histolytica* um deren genetischen Hintergrund zu dokumentieren. Normalerweise zeigen sie Variationen zwischen verschiedenen Amöben-Isolaten (Ali *et al.*, 2005). Als Kontrollen wurde in dieser Analyse die DNA von anderen *E. histolytica*-Isolaten, wie Rahman, HK-9 und 200:NIH eigesetzt. Die DNA-Bandenmuster, die nach der Amplifikation mit den spezifischen Oligonukleotiden für die STR-Sequenzen in einem Agarosegel detektiert wurden, waren zwischen beiden HM-1:IMSS-Zelllinien identisch, wohingegen die anderen Isolate davon abweichende DNA-Bandenmuster zeigten (siehe Abbildung 3.2). Aufgrund dieses Ergebnisses konnte belegt werden, dass beide HM-1:IMSS-Zelllinien denselben genetischen Ursprung aufweisen und sich von den anderen Isolaten abgrenzen. Die Zelllinien wurden als HM-1:IMSS-Zelllinie A und HM-1:IMSS-Zelllinie B bezeichnet.

DISKUSSION

4.2.2 Phänotypische Charakterisierung

Um die beiden HM-1:IMSS-Zelllinien A und B phänotypisch, besonders hinsichtlich ihrer Pathogenität, zu charakterisieren, wurden sie verschiedenen *in vitro*-Experimenten unterzogen.

Die Fähigkeit von Amöben Leberabszesse zu bilden ist ein wichtiger Indikator für die Pathogenität von *E. histolytica*. Wurden Trophozoiten der Zelllinie A bzw. der Zelllinie B in Lebern von *Meriones unguiculatus* injiziert, so verursachten die Amöben der Zelllinie B große Abszesse, die bis zu 30 % des ganzen Organs betreffen konnten. Dabei ist hervorzuheben, dass die Trophozoiten ohne vorherige Leberpassagen dieses aggressive Verhalten zeigten. Dagegen waren Trophozoiten der Zelllinie A kaum oder gar nicht dazu befähigt, ALAs hervorzurufen (siehe Abbildung 3.1). Die Pathogenität von Trophozoiten der Zelllinie A ließ sich auch nach wiederholten Leberpassagen kaum steigern (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch Wiederholungsexperimente wurde ausserdem gezeigt, dass der beschriebene Phänotyp über mehrere Jahre stabil ist.

Cysteinpeptidasen sind in E. histolytica als wichtige Pathogenitätsfaktoren bereits beschrieben worden (Olivos-Garcia et al., 2004; Bruchhaus et al., 2003; Que et al., 2002; Stanley et al., 1995; Scholze und Tannich, 1994; Keene et al., 1986). Das Maß der Cysteinpeptidase-Aktivität in Trophozoiten wird daher als ein Indikator für deren Pathogenität betrachtet. Darüber hinaus steht das Ausmaß der hämolytischen Aktivität im Verdacht, an der Pathogenität von E. histolytica beteiligt zu sein (Mora-Galindo et al., 1997; Keller et al., 1988). Neben der Potenz ALAs zu induzieren, unterschieden sich Zelllinie A und B signifikant in ihrer Cysteinpeptidase-Aktivität und ihrer hämolytischen Aktivität. Die Cysteinpeptidase-Aktivität war in der pathogenen Zelllinie ca. siebenfach erhöht, wohingegen die hämolytische Aktivität in der apathogenen Zelllinie A um das ca. Zweifache höher war (siehe Tabelle 3.1). Die nicht übereinstimmenden Ergebnisse zwischen beiden Zelllinien implizieren, dass die durch die Amöben verursachte Hämolyse primär nicht von der Cysteinpeptidase-Aktivität abhängig sein kann. Dies wurde auch schon in einer anderen Studie gezeigt, in der bei Cysteinpeptidase-inhibierten Amöben, im Vergleich zu Kontroll-Zellen kein Einfluss auf deren hämolytische Aktivität festgestellt werden konnte (Ankri et al., 1998). Bisher weisen verschiedene Arbeiten darauf hin, dass die Virulenz von E. histolytica mit deren Cysteinpeptidase-Aktivität assoziiert ist (zur Übersicht siehe Clark et al., 2007). Insofern war es interessant, dass die pathogene Zelllinie B eine höhere Cysteinpeptidase-Aktivität aufwies. Das Genom von E. histolytica enthält 36 Gene, die für Cysteinpeptidasen

(EhCP) kodieren. Nur drei von ihnen, nämlich die EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 werden unter Standard-Kulturbedingungen stark exprimiert (Tillack et al., 2007). Westernblot-Analysen mit Proteinextrakten beider Zelllinien, die mit spezifischen Antikörpern gegen diese drei Enzyme behandelt wurden implizieren, dass die Unterschiede der gemessenen Cysteinpeptidase-Aktivität auf die vergleichsweise höheren Mengen der EhCP-A1 und EhCP-A2 in Zelllinie B zurückzuführen sind. Hingegen konnten keine unterschiedlichen Mengen der EhCP-A5 zwischen beiden Zelllinien gefunden werden (siehe Abbildung 3.3). Es wurde gezeigt, dass EhCP-A5-überexprimierende E. histolytica-Trophozoiten aussergewöhnlich große ALAs im Tiermodell induzieren können (Tillack et al., 2006), die Abszessgröße durch die Überexpression von EhCP-A1 und EhCP-A2 jedoch unbeeinflusst bleibt (Tillack et al., 2006) (Hellberg et al., 2001). Die vorliegenden Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass neben der EhCP-A5 weitere Moleküle an der Entwicklung von ALAs beteiligt sein müssen, und dass dabei den Enzymen EhCP-A1 und EhCP-A2 möglicherweise eine größere Bedeutung beigemessen werden muss, als es bisher der Fall war. Beispielsweise könnten Überexpressionsstudien der EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 in der apathogenen Zelllinie A und die Infektionsexperimente zur ALA-Induktion mit diesen Cysteinpeptidaseüberexprimierenden Transfektanten neue Erkenntnisse liefern.

Um die Situation der Amöben während der Leber-Invasion im Wirt zu simulieren, wurden die Trophozoiten einem Hitzestress von 42°C ausgesetzt. Ausserdem wurden sie in einem zweiten Versuch mit verschiedenen Konzentrationen von humanem Serum mit aktivem Komplement kultiviert, um die Reaktion des Immunsystems im Gewebe des Wirts nachzustellen. Zwischen beiden Zelllinien zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Stress-Antwort. Die Überlebensrate war vergleichbar (siehe Tabelle 3.1). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Pathogenität des Erregers nicht notwendigerweise mit der Fähigkeit zusammenhängt, sich an Zell-Stress zu adaptieren.

Frühere Studien weisen darauf hin, dass die Pathogenität von *E. histolytica* im direkten Zusammenhang mit deren Phagozytose von Zellen und der zytopathischen Aktivität stehen (Hirata *et al.*, 2007; Petri *et al.*, 1987; Orozco *et al.*, 1983). Dies konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weder die Bindung von Erythrozyten an die Amöben-Zelloberfläche, noch die Rate der Phagozytose von Erythrozyten unterschieden sich zwischen beiden Zelllinien. Zudem konnten auch keine Unterschiede in der Rate der Digestion von Erythrozyten und der Fähigkeit Zellrasen zu zerstören zwischen beiden Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.4).

98
Resümierend ist festzustellen, dass Zelllinie B im Vergleich zu Zelllinie A große Leberabszesse hervorrufen kann und auch über eine erhöhte Cysteinpeptidase-Aktivität verfügt. Somit korrelieren die Ergebnisse der *in vivo*-Induktion von ALAs und der Cysteinpepidase-Aktivität sehr gut. Demnach eignen sich diese Experimente zur Überprüfung der Pathogenität von *E. histolytica*. Im Gegensatz dazu zeigen die durchgeführten *in vitro*-Experimente, die dazu beitragen sollen, bestimmte Situationen des Erregers während der Wirts-Infektion zu simulieren, keine differentiellen Ergebnisse zwischen der apathogenen Zelllinie A und der pathogenen Zelllinie B. Es ist daher fraglich, ob diese artifitiellen Experimente überhaupt dazu geeignet sind, die Virulenz von *E. histolytica* aufzuklären.

4.3 Proteom-Analysen

Die durchgeführten *in vivo-* und *in vitro-*Experimente, die für die phänotypische Charakterisierung der beiden HM-1:IMSS-Zelllinie herangezogen wurden, können Hinweise liefern, welche Molekülgruppen, wie beispielsweise die Gruppe der Peptidasen, für die Pathogenität von *E. histolytica* von Bedeutung sind. Im Gegensatz dazu bieten Technologien wie die zweidimensionale differentielle in-Gel Elektrophorese (DIGE) und die Nano-*Liquid Chromatography* (Nano-LC) die Möglichkeit, das vollständige Proteom beider Zelllinien auf differentiell regulierte Moleküle hin zu untersuchen, und der damit verbundenen Möglichkeit, sehr viel mehr Informationen aus einem einzelnen Experiment zu gewinnen.

4.3.1 Vergleichende Proteom-Analyse mittels DIGE-Technologie

Gegenüber konventionellen zweidimensionalen Gel-Elektrophoresen bietet die DIGE-Technologie den Vorteil, zwei unterschiedliche Proben innerhalb eines Experimentes zu untersuchen um dadurch vergleichende Analysen durchführen zu können. Ausserdem können Gele mit verschiedenen biologischen Replikaten unter Verwendung eines internen Proteinstandards qualitativ miteinander verglichen werden, wodurch die Gewinnung statistisch relevanter Daten gewährleistet wird. Da diese Technik komplex ist und eine Vielzahl von experimentellen Schritten erfordert, können die Ergebnisse zahlreichen Schwankungen unterliegen. Daher ist es von ausserordentlicher Bedeutung, eine konstante Qualität der Proben und des experimentellen Ablaufs sicherzustellen. Für die Untersuchungen wurden die Proteine der *E. histolytica-*Zelllinien A und B in eine NaPBS-lösliche- und eine Urea-lösliche Proteinfraktion separiert. Sobald ein Proteinlysat gewonnen wurde, bestand die Gefahr von autolytischen Prozessen, die durch die hohe Peptidase-Aktivität von *E. histolytica* selbst verursacht werden. Dadurch wurden alle Proben mit dem Cysteinpeptidase-Inhibitor E64 behandelt. In Vorversuchen konnte die Proben-Qualität überprüft und zusätzlich die Bedingungen für den experimentellen Ablauf optimiert werden. Ausserdem musste empirisch ermittelt werden, in welchem pH-Gradienten die Proteine sich während der isoelektrischen Fokussierung bestmöglich separieren ließen. Zuerst wurde ein nicht-linearer pH-Gradient von 3–10 ausgewählt. Die Proteine konnten auf diese Weise sehr gut getrennt werden, wobei die meisten Proteine in einem Bereich von pH 4–8 zu finden waren (siehe Abbildung 3.3 A und B). Daher wurden in weiteren Experimenten pH-Gradienten von 4–7 verwendet, so dass alle Proteine über das gesamte Gel verteilt waren und dadurch sehr klar voneinander separiert werden konnten (siehe Abbildung 3.3 C und D).

Bisher gibt es nur eine weitere veröffentlichte Studie, die mit Hilfe der DIGE-Technologie Proteom-Analysen von *E. histolytica* durchgeführt hat (Davis *et al.*, 2006). Zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren wurden in der genannten Arbeit Gesamt-Proteinextrakte des pathogenen Isolates HM-1:IMSS und des apathogenen Isolates Rahman miteinander verglichen. Die Proben wurden in einem pH-Grandienten von 3–11 während der ersten Dimension separiert. Es konnten insgesamt nur sechs *E. histolytica*-spezifische Proteine identifiziert werden, die in HM-1:IMSS bzw. in Rahman in differentiellen Mengen synthetisiert waren.

In der vorliegenden Arbeit konnten in jedem Gel ca. 1.700 Protein-*Spots* identifiziert werden. Davon waren durchschnittlich nur ca. 50 Proteine differentiell in Zelllinie A bzw. Zelllinie B repräsentiert (siehe Tabelle 3.2). Nach der massenspektrometrischen Identifizierung verblieben insgesamt 33 *E. histolytica*-spezifische differentiell synthetisierte Proteine, die in allen drei biologischen Proben gleichermaßen nachgewiesen werden konnten. Die identifizierten Proteine konnten entsprechend ihrer biologischen Funktionen in verschiedene Gruppen sortiert werden (siehe Tabelle 3.3). Hinsichtlich dessen, Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* identifizieren zu wollen, war es besonders interessant, dass die Proteine Fe-Hydrogenase (XP_652839), Peroxiredoxin (XP_649510) und Superoxiddismutase (SOD) (XP_648827) in der pathogenen Zelllinie B in differentiell höheren Konzentrationen nachgewiesen wurden. Diese Proteine sind an der oxidativen Stress-Antwort beteiligt, wenn die anaeroben bzw. mikroaerophilen Amöben invasiv werden, das sauerstoffarme Milieu des Wirtsdarms verlassen und dem erhöhten Sauerstoffgehalt im Gewebe ausgesetzt sind. Die Fe-Hydrogenase katalysiert die Oxidation von molekularem Wasserstoff. In einigen

100

Bakterien-Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Fe-Hydrogenase in oxidative Stress-Reaktionen involviert ist (Fournier *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass die Antioxidantien Peroxiredoxin und SOD an der Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid und Superoxid-Radikalen beteiligt sind (Bruchhaus *et al.*, 1997; Bruchhaus *et al.*, 1992). Beide Enzyme sind im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Darüber hinaus konnte das Peroxiredoxin auch an der Zelloberfläche von Trophozoiten nachgeweisen werden (Choi *et al.*, 2005). In der DIGE-Studie von Davis und Kollegen wurde das Peroxiredoxin ebenfalls in höheren Konzentrationen in dem pathogenen Isolat HM-1:IMSS nachgewiesen, wohingegen die SOD in dem apathogenen Isolat Rahman in differentiell größeren Mengen gefunden wurde (Davis *et al.*, 2006). Einmal mehr stellt sich dadurch die Frage, inwiefern sich das Isolat Rahman dazu eignet, die Virulenz von *E. histolytica* zu untersuchen. Das ebenfalls an der Stress-Antwort beteiligte Hitzeschockprotein 90 wurde in der apathogenen Zelllinie A in höheren Konzentrationen synthestisiert. Es handelt sich dabei um ein molekulares Chaperon, dass eines der häufigsten Proteine in der Zelle überhaupt darstellt.

Es konnten verschiedene differentiell regulierte Proteine zwischen beiden Zelllinien gefunden werden, die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Die Proteine ARP2/3 Komplex 34 kDa Untereinheit (XP_650569) und das Aktin-bindende Cortexillin (XP 648643) wurden in größeren Mengen in der pathogenen Zelllinie B nachgewiesen. Das LIM-Domänen-Protein (XP 656918) und das Paxillin (XP 653490) wurden dagegen in höheren Konzentrationen in der apathogenen Zelllinie A detektiert. Die LIM-Domäne ist in Protein-Protein-Interaktionen involviert (Kadrmas und Beckerle, 2004; Dawid et al., 1998). In E. histolytica wurde für das LIM-Domänen-Protein eine Beteiligung an der Zytoskelett-Struktur nachgewiesen (Wender et al., 2007). Dies bestätigt das Ergebnis, dass das LIM-Domänen-Protein in der Urea-löslichen Proteinfraktion der Zelllinie A nachgewiesen wurde. Das Paxillin zählt zu den Gruppe-3 LIM-Domänen-Proteinen von E. histolytica, die typischerweise im Zytoplasma der Zelle lokalisiert sind (Wender et al., 2007). Das Paxillin wurde übereinstimmend damit in der NaPBS-löslichen Proteinfraktion der Zelllinie A gefunden. Die Beteiligung des LIM-Domänen-Proteins an der Virulenz von E. histolytica ist unklar, zumal Davis und Kollegen im Gegensatz zu der vorliegenden Studie dieses Protein in dem pathogenen Isolat HM-1:IMSS in differentiell höheren Mengen nachgewiesen haben (Davis et al., 2006). Die gefundenen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien könnten möglicherweise die Stabilität der Zytoskeletts beieinflussen, was sich wiederum auf die Wachsumsrate, die Größe der Trophozoiten und die Fähigkeit ALAs zu induzieren, auswirken könnte.

Weiterhin wurden verschiedene differentiell synthetisierte Proteine zwischen Zelllinie A und B gefunden, über deren Funktion in E. histolytica bisher sehr wenig oder gar nichts bekannt ist. Dazu zählen beispielsweise zwei verschiedene, an der Signaltransduktion beteiligte C2-Domänen-Proteine (XP 655299 und XP 654499), die in höheren Konzentrationen in der apathogenen Zelllinie A gefunden wurden. Ausserdem wurden die Calcium-bindenden Proteine Grainin 1 (XP 650372) und Grainin 2 (XP 650357) in differentiellen Mengen nachgewiesen. Hierbei war interessant, dass in Zelllinie A beide Proteine in größeren Mengen in der NaPBS-löslichen Proteinfraktion detektiert wurden, wohingegen in Zelllinie B beide Proteine differentiell in der Urea-löslichen Proteinfraktion ermittelt wurden (siehe Tabelle 3.3). Davis und Mitarbeiter fanden beide Isoformen des Grainins in dem apathogenen Isolat Rahman (Davis et al., 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass Trophozoiten, die aus ALAs reisoliert wurden, vergleichsweise über geringere Mengen des Proteins Grainin 1 verfügten als Trophozoiten, die unter Standard-Bedingungen kultiviert wurden (Bruchhaus et al., 2002). Dies korrespondiert mit Ergebnissen von Studien, bei denen Trophozoiten aus einem zuvor infizierten Mäuse-Darm bzw. aus humanen Darm-Transplantaten reisoliert wurden. Sie wiesen im Vergleich zu axenisch gehaltenen Kontroll-Zellen eine verminderte Grainin-Konzentration auf (Davis et al., 2006; Gilchrist et al., 2006). Diese Resultate deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Menge oder der Lokalisation von Grainin in Amöben und deren Virulenz hin.

Mit Hilfe von *Real-time* PCR-Experimenten wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Proteinmengen, die in der DIGE-Analyse zwischen Zelllinie A und B detektiert wurden, auch auf differentielle Transkriptmengen des entsprechenden Gens zurückzuführen sind. Hierbei zeigte sich nur für zwei der insgesamt 33 untersuchten Proteine eine übereinstimmende Regulation auf Proteom- als auch auf Transkriptom-Ebene. Dies galt für die Fe-Hydrogenase und eines der beiden C2-Domänen-Proteine (siehe Tabelle 3.3*). Im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, verdeutlichen die unterschiedlichen Ergebnisse, die auf Transkriptom-und Proteom-Ebene erhalten wurden, dass aufgrund der Menge eines Transkripts in *E. histolytica* nicht auf die Menge des entsprechend synthetisierten Proteins geschlossen werden kann, sondern deren Regulation komplexeren Prozessen unterliegt.

Um die DIGE-Daten durch eine unabhängige Technik zu verifizieren wurden stichprobenartig Westernblots mit NaPBS-löslichen und Urea-löslichen Proteinextrakten beider Zelllinien und spezifischen Antikörpern gegen Peroxiredoxin, SOD, Grainin und Fe-Hydrogenase durchgeführt. Alle Ergebnisse konnten die der DIGE-Studie bestätigen (siehe Abbildung 3.6 und Abbildung 3.11). Insofern lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich die DIGE-Technologie hervorragend eignet, um das Proteom von *E. histolytica* zu analysieren. Werden die Parameter für den Versuchsablauf optimal ausgewählt, lassen sich sehr präzise und reproduzierbare Datensätze erzeugen.

4.3.2 Vergleichende Analyse des Membranoberflächen-Proteoms von *E. histolytica*

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Membranoberflächen-Proteom von *E. histolytica* beschrieben. Die Oberflächen-Proteine von *E. histolytica* stellen interessante Kandidaten für Pathogenitätsfaktoren dar und könnten darüber hinaus für die Entwicklung neuer Medikamente und Impfstoffe eingesetzt werden.

Die Schwierigkeit des Experiments bestand darin, Membranoberflächen-Proteine von Trophozoiten beider Zelllinien in reiner Form anzureichern. Die Oberflächen-Proteine wurden mit Biotin markiert, bevor die Zellen lysiert und die markierten Proteine selektiv über das Biotin an eine Avidin-haltige Säule gebunden wurden. Die Oberflächen-Proteine konnten, nachdem alle anderen Proteine abgewaschen wurden, von der Säule eluiert werden. Dadurch, dass E. histolytica als phagozytierender, amöboider Organismus eine sehr hohe Membranumsatz-Rate aufweist, bestand die Gefahr, dass das Biotin während der Inkubation inkorporiert wurde. Dementsprechend wären auch zytoplasmatische Proteine markiert worden. Dadurch, dass bisher sehr wenig über die Zelloberflächen-Proteine von E. histolytica bekannt ist, war es nicht möglich mit Hilfe verschiedener Referenz-Proteine die Reinheit der Probe zu überprüfen. So wurden die gewonnenen Proben zunächst für das Experiment eingesetzt und die mit der Nano-LC separierten Proteine massenspektrometrisch analysiert, bevor sie durch einen Datenbank-Abgleich identifiziert werden konnten. Anhand des Sets der ermittelten Proteine konnten am besten Rückschlüsse über deren Eigenschaften und ihre mögliche Lokalisation an der Zellmembran getroffen werden. In Folge dessen wurden die Bedingungen für die Isolierung der Membranoberflächen-Proteine in der Weise modifiziert, dass die Inkorporation des Biotins stärker verhindert und bestehende Proteinkomplexe von Membranoberflächen-Proteinen zerstört wurden. Resultierend wurde eine vergleichsweise kleinere Gruppe von Proteinen identifiziert, von denen ein sehr viel größerer Anteil durch *in silico*-Berechnungen als putative Membranproteine klassifiziert werden konnten.

Es wurden insgesamt 62 Proteine gefunden, die entweder in der Zelllinie A oder in der Zelllinie B synthetisiert werden. Ungefähr ein Drittel dieser Proteine tragen Transmembrandomänen bzw. Signalpeptide, wodurch sie sehr wahrscheinlich an der Membran lokalisiert sind. Darunter befanden sich die CAAX-Prenylpeptidase, die in Zelllinie A nachgewiesen wurde, sowie interessanterweise das als Pathogenitätsfaktor von E. histolytica bekannte Gal/GalNAc-Lektin, das in der pathogenen Zelllinie B identifiziert wurde. Die CAAX-Prenylpeptidase ist eine Metallopeptidase, die als integrales Membran-Protein in der Zellmembran von E. histolytica lokalisiert ist. In anderen Organismen steht sie im Verdacht, an Prozessen der Protein- bzw. Peptid-Modifikation, sowie der Sekretion von Proteinen beteiligt zu sein (Pei und Grishin, 2001). Ihre Funktion in E. histolytica ist bisher nicht geklärt. Das Clathrin-Adaptor-Protein (XP 654291) wurde in Zelllinie A nachgewiesen. Clathrine sind als integrale Membranproteine von E. histolytica beschrieben, die an der Pinozytose der Zelle beteiligt sind (de Chassey, 2001). Weiterhin wurden zwei C2-Domänen-Proteine, übereinstimmend mit Ergebnissen der übrigen Experimente, in Zelllinie A detektiert. Erstaunlicherweise wurde die Fe-Hydrogenase in der pathogenen Zelllinie B gefunden. Der Vorhersage nach, und auch den Beobachtungen der Lokalisationsstudie folgend (siehe Abbildung 3.12), ist dieses Protein zytoplasmatisch und sollte in der Membranoberflächen-Proteinprobe nicht gefunden werden. Entweder spricht das dafür, dass die Probe noch mit zytosolischen Proteinen kontaminiert war oder dass die Fe-Hydrogenase beispielsweise mit Molekülen der Zellmembran assoziiert vorliegt.

Weiterhin wurden relativ viele ribosomale Proteine bzw. Proteine, die mit der ER-Membran assoziiert sind, gefunden. Auch hier bestand zunächst bestand der Verdacht, dass es sich dabei um eine Kontamination der Probe handelt, da ribosomale Proteine gewöhnlich zytoplasmatisch und zahlreich in der Zelle vertreten sind. Jedoch konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die ER-Mambran mit der Zellmembran fusionieren kann. Dabei wird die Hypothese vertreten, dass die Ribosomen und damit assoziierten Proteine des rauen ER mit der ER-Membran verbunden bleiben (Okada *et al.*, 2005; Desjardins, 2003; Gagnon *et al.*, 2002). In diesem Fall könnten solche Proteine berechtigterweise in der Fraktion von Zelloberflächen-Proteinen nachgewiesen werden.

Die Funktion der meisten der identifizierten Proteine dieser Studie ist unbekannt. Ausserdem kann nicht ohne Weiteres von der Funktion eines Proteins auf seine Lokalisation in der Zelle geschlossen werden und umgekehrt. Es kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass bei der Isolierung der Membranoberflächen-Proteine auch zytoplasmatische Proteine biotinyliert wurden, jedoch ergaben BLAST-Analysen und *in silico*-Vorhersageprogramme,

dass ca. 50 % der identifizierten Proteine sehr wahrscheinlich Membran-assoziiert vorliegen. Zudem konnte in *E. histolytica* bereits nachgewiesen werden, dass auch Proteine, wie beispielsweise die Cysteinpeptidase A5, die keine Sequenzen für Signalpeptide oder Transmembrandomänen beinhalten, an der Zelloberfläche der Trophozoiten lokalisiert sein können (Jacobs *et al.*, 1998). Insofern gilt es, die gefundenen Proteine in weiterführenden Experimenten genauer zu studieren, um sie zu charakterisieren und ihre Beteiligung an der Virulenz von *E. histolytica* zu klären.

4.4 Vergleichende Transkriptom-Analysen

Mit der Analyse des Transkriptoms von *E. histolytica* wurde eine weitere Ebene dieses Parasiten betrachtet um zusätzliche Informationen über die pathobiologischen Mechanismen zu erhalten. In Vergleich zu den Daten der Proteom-Studien können darüber hinaus Erkenntnisse über die post-transkriptionellen Prozesse in *E. histolytica* eingesehen werden. Es wurde sowohl die *Microarray*-Technologie als auch das Verfahren der quantitativen *Realtime* PCR genutzt, um die Transkriptome der Zelllinie A und der Zelllinie B miteinander zu vergleichen, um so differentielle Transkripte zu identifizieren, die als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* in Betracht gezogen werden können.

4.4.1 Microarray-Analysen

Die *Microarray*-Technologie bietet gegenüber der Northernblot-Analyse, aber auch der quantitativen *Real-time* PCR, den entscheidenden Vorteil die Transkription aller zu betrachtenden Gene innerhalb eines Experiments zu berücksichtigen. Dies bedeutet nicht nur ein Zeitersparnis, sondern stellt sicher, dass die erhaltenen Daten, dadurch dass sie innerhalb eines Experimentes generiert wurden, eine vergleichbare Qualität aufweisen. *Microarrays* werden seit den 1990er Jahren vielseitig und erfolgreich in der molekularbiologischen Forschung eingesetzt. Dabei haben sich unterschiedliche Techniken herausgebildet und wurden stets weiterentwickelt. Grundsätzlich handelt es sich aber um ein sehr komplexes Verfahren, das zahlreichen Schwankungen unterliegt. Um stabile Datensätze zu erhalten, wurden die Experimente daher mit biologischen und technischen Replikaten wiederholt. Dabei wurde mit unabhängig voneinander isolierten RNA-Proben gearbeitet, sowie die Inkorporation der Fluoreszenzfarbstoffe in die cDNA quantifiziert. Um Unterschiede im

Bindungsverhalten der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 auszugleichen, wurden sogenannte *Dye-Swap*-Experimente durchgeführt, bei denen ein probenspezifischer Austausch der Farbstoffe stattfand. Darüber hinaus waren die Oligonukleotid-Sonden auf dem *Microarray* in Triplikaten vertreten, um den Einfluss lokaler Hybridisierungsschwankungen zu vermeiden.

Die durchgeführten Microarray-Analysen zeigten insgesamt 87 differentiell exprimierte Transkripte zwischen Zelllinie A und Zelllinie B. Mehr als die Hälfte dieser Gene kodieren für Proteine, deren Funktion in E. histolytica noch vollkommen unbekannt ist (siehe Tabelle 3.5). Betrachtet man die differentiell transkribierten Gene, die entsprechend ihrer biologischen Funktion in der Zelle klassifiziert werden konnten, so fällt zunächst auf, dass Gene, die an der Stress-Antwort beteiligt sind, in der pathogenen Zelllinie B verstärkt exprimiert wurden. Dazu zählen die fe-hydrogenase (XM 647747), die methionin-gamma lyase (MGL) (XM 643675) und das 70 kDa hitzeschockprotein (XM 648787). Übereinstimmend wurde die Fe-Hydrogenase auch schon in der DIGE-Studie und in der Studie der Membranoberflächen-Proteome in höheren Konzentrationen in Zelllinie B nachgewiesen (siehe 4.3.1). In einer anderen vergleichenden Microarray-Studie, in der die Transkriptome des pathogenen Isolats HM-1:IMSS und des apathogenen Isolats Rahman miteinander verglichen wurden, konnte die fe-hydrogenase auch in dem pathogenen Isolat in differentiell höheren Mengen nachgewiesen werden (MacFarlane und Singh, 2006). Die MGL katalysiert die einstufige Degradation von Schwefel-haltigen Aminosäuren zu α-Ketocarbonsäuren, Ammonium und Thiol-haltigen Komponenten. In der Amöbiasis-Forschung stellt dieses Enzym ein interessantes Ziel-Molekül für die Entwicklung neuer Medikamente dar, da es nicht in Säugerzellen vorkommt und dadurch unerwünschte Kreuzreaktionen im Patienten verhindert werden können (Sato et al., 2008). Das 70 kDa Hitzeschockprotein ist ein molekulares Chaperon, das in die zelluläre Stress-Antwort eingebunden ist. Davis und Kollegen verwendeten in ihrer Studie den gleichen Microarray I, wie er in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Darin wurden die Transkriptome von HM-1:IMSS und Rahman miteinander verglichen, mit dem Ziel putative Pathogenitätsfaktoren von E. histolytica zu identifizieren (Davis et al., 2007). In deren Arbeit wurde jedoch das 70 kDa hitzeschockprotein in dem apathogenen Isolat Rahman als differentiell höher exprimiert gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurde nur ein Gen, dass in die zelluläre Stress-Antwort involviert ist, namentlich ein fe-sulfat-flavoprotein (XM 650038) in der apathogenen Zelllinie A in differentiell größeren Mengen nachgewiesen. Dieses Enzym katalysiert Redox-Reaktionen, jedoch ist seine Funktion in E. histolytica ungeklärt.

Die *cysteinpeptidase a4 (ehcp-a4)* (XM_651510) wurde in der pathogenen Zelllinie B nachgewiesen (siehe Tabelle 3.5). Es entspricht den Erwartungen, dass dieses als Pathogenitätsfaktor von *E. histolytica* identifizierte Gen in der pathogenen Zelllinie differentiell höher transkribiert wird. Davis und Mitarbeiter konnten das Gen ebenfalls in dem pathogenen Isolat HM-1:IMSS in differentiell höheren Mengen nachweisen (Davis *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das *ehcp-a4*-Gen unter Hitzstress, genauso wie nach der Reisolierung eines mit Trophozoiten infizierten Mäuse-Darms im Verhältnis zu den Kontroll-Zellen, eine erhöhte Expression aufwies (Gilchrist *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006). Neben EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 muss demnach der Bedeutung der EhCP-A4 als Pathogenitätsfaktor von *E. histolytica* möglicherweise mehr Aufmerksamkeit zuteil werden.

Das Gen *caax-prenylpeptidase* (XM_643678) konnte, wie auch das entsprechende Protein in der Studie der Membranoberflächen-Proteome, in der apathogenen Zelllinie A in differentiell höheren Mengen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5).

Darüber hinaus lieferten die *Microarray*-Experimente insofern ein aussergewöhnliches Ergebnis, als dass die *aig*-Gene (*aig* = *avrRpt2-induced gene*) vorwiegend in der pathogenen Zelllinie B, und Gene der *rab-* und *rho-Familien* hauptsächlich in der apathogenen Zelllinie A differentiell höher exprimiert waren (siehe Tabelle 3.5). Die *aig*-Gene und auch die *rab-* und *rho-Familien*-Gene kodieren für GTPasen, die an der Signaltransduktion in der Zelle beteiligt sind. Eine erhöhte Genexpression von zwei der vier vertretenen *aig*-Gene wurde auch in der Arbeit von Davis und Kollegen in dem pathogenen Isolat nachgewiesen (Davis *et al.*, 2007). Da alle vier auf dem *Array* kodierten *aig*-Gene in der pathogenen Zelllinie B höher exprimiert waren, wurde die große Familie der *aig*-Gene von *E. histolytica* genauer untersucht (siehe 4.4.2).

Insgesamt konnten nur wenige Übereinstimmungen mit Daten der anderen Transkriptom-Studien von *E. histolytica* gefunden werden. Dies ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die anderen Arbeitsgruppen teilweise mit anderen *Arrays* gearbeitet haben und die Kriterien der Daten-Auswertung und die Definition der Grenzwerte für differentielle Expressionen nicht einheitlich sind. Außerdem wurde in allen anderen Studien mit den *E. histolytica*-Isolaten HM-1:IMSS und Rahman gearbeitet, die sich zwar auch in ihrer Virulenz unterscheiden, jedoch nicht mit den Zelllinien A und B zu vergleichen sind (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufer *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Zur Verifizierung der *Microarray*-Daten wurden sie mit einer unabhängigen Technik, wie der *Real-time* PCR überprüft. Dabei wurden bis auf zwei Ausnahmen alle Gene, die in der *Microarray*-Studie eine differentielle Expression von \geq 3 aufwiesen, analysiert. Alle Ergebnisse der *Microarray*-Studie konnten dadurch bestätigt werden (siehe Tabelle 3.5). Insofern konnte gezeigt werden, dass die *Microarray*-Technologie für das untersuchte System erfolgreich etabliert ist und reproduzierbare Daten liefert.

4.4.2 Vergleichende Transkriptom-Analyse der *aig*-Gene von *E. histolytica* mittels *Real-time* PCR

Das *aig1*-Gen wurde ursprünglich in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* identifiziert. AIG steht für *avrRpt2*-induziertes Gen. Das *avrRpt2*-Gen wird wiederum von dem Bakterium *Pseudomonas syringae* exprimiert und kodiert für eine Cysteinpeptidase, die als Pathogen gegen *A. thaliana* wirkt. Als Reaktion auf den bakteriellen Angriff wird das *aig1*-Gen von *A. thaliana* verstärkt exprimiert (Liu *et al.*, 2008). Das *aig1*-Gen ist dadurch an der antibakteriellen Abwehrreaktion in *A. thaliana* beteiligt. Zusätzlich existieren auch homologe Sequenzen des *aig*-Gens in höheren Säugetieren, wie der Maus und dem Menschen. Hier werden sie als *ian*-Gene (IAN = immun-assoziiertes Nukleotid-Bindungsprotein) bzw. *gimap*-Gene (GIMAP = GTPasen der immun-assoziierten Proteine) bezeichnet. Sie werden am stärksten in T-Lymphozyten exprimiert und sind in die Abwehrmechanismen des Immunsystems involviert (Nitta *et al.*, 2006).

Aufgrund von Sequenzhomologien konnte eine Gruppe von 54 Genen in *E. histolytica* als *aig*-Gene definiert werden (siehe 3.3.2). Die differentielle Genexpression dieser *aig*-Gene sollte mit Hilfe von *Real-time* PCR-Experimenten in Zelllinie A und B untersucht werden. Aufgrund stark konservierter Bereiche in den Gen-Sequenzen, gelang es nur für 31 dieser Gene spezifische Oligonukleotide zu synthetisieren. Bei 15 der untersuchten Gene konnten differentiell höhere Transkriptmengen in der pathogenen Zelllinie B nachgewiesen werden. Weitere 15 Gene waren nicht differentiell transkribiert, und nur ein Gen war in der apathogenen Zelllinie A differentiell höher exprimiert. Da die Mehrheit aller untersuchten *aig*-Gene in der pathogenen Zelllinie B in differentiell höheren Transkriptmengen gefunden wurden, ist es denkbar, dass sie an der Virulenz von *E. histolytica* beteiligt sind. Über die Funktion der AIG-Proteine in Amöben ist bisher nichts bekannt. Aufgrund der antimikrobiellen Wirkung und der Beteiligung an der Immunantwort in anderen Organismen

lässt sich jedoch spekulieren, dass die AIG-Proteine in *E. histolytica* eine vergleichbare Funktion übernehmen, zumal ein *aig1*-Gen, im Vergleich zu entsprechenden Kontroll-Zellen, in erhöhten Konzentration in Trophozoiten nachgewiesen werden konnten, die aus einem zuvor mit Amöben infizierten Mäuse-Darm reisoliert wurden (Gilchrist *et al.*, 2006). Weiterführende Experimente müssten diese Hypothese prüfen.

4.5 Überexpressionsstudien

Bei der Betrachtung aller Studien, die sowohl auf Transkriptom- als auch auf Proteom-Ebene Unterschiede zwischen beiden E. histolytica-Zelllinien identifizieren sollten, fällt auf, dass viele unterschiedliche differentiell regulierte Moleküle gefunden wurden, und nur sehr wenige Moleküle sowohl auf der Ebene der Genexpression, als auch auf Protein-Ebene in allen Studien die gleichen Resultate zeigten. Es gab einige Moleküle, die sowohl in der Analyse der membranoberflächen-Proteome, als auch der Transkriptom-Analyse mittels Microarray übereinstimmende Daten lieferten. Dazu zählen die CAAX-Prenylpeptidase (XP 648770), die Rab-Familie GTPase (XP 651915) und das C2-Domänen Protein (XP 654499) die in differentiell höheren Konzentrationen in der apathogenen Zelllinie A gefunden wurden, sowie das Erythrozyten-Bindungsprotein (XP 650383) und das hypothetische Protein (XP 653961), die in der pathogenen Zelllinie B in differentiell größeren Mengen nachgewiesen wurden. Fe-Hydrogenase (XP 652839) und das Ausschließlich die C2-Domänen-Protein (XP 655299) lieferten in allen Studien übereinstimmende Ergebnisse. Die Fe-Hydrogenase liegt in differentiell größeren Mengen in der pathogenen Zelllinie B vor, vohingegen das C2-Domänen-Protein in höheren Konzentrationen in der apathogenen Zelllinie A gebildet wird. Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um ihre Funktion und ihre mögliche Beteiligung an der Pathogenität von E. histolytica besser zu verstehen.

Die beiden Gene sollten jeweils in der Zelllinie überexprimiert werden, in der sie normalerweise in geringeren Mengen vertreten waren, um die physiologischen Auswirkungen der Überexpression beobachten zu können. Dies gelang nur für die *fe-hydrogenase*. Es bleibt spekulativ, weshalb *c2-domänen-protein*-Transfektanten nicht überlebensfähig waren. Es ist denkbar, das das Plasmid (pNC-EhC2-DP) gar nicht erfolgreich transfiziert werden konnte und folglich den Trophozoiten die Neomycin-Resistenz fehlte, wodurch sie die Behandlung mit *G418* nicht überleben konnten. Andererseits könnte aus einem unbekannten Grund das *c2-domänen-protein*-Gen oder das entsprechende Protein toxische Auswirkungen auf die

Trophozoiten der Zelllinie A gehabt haben. Alle weiteren Experimente konnten deshalb ausschließlich mit der Fe-Hydrogenase durchgeführt werden.

Durch die Immunisierung von Mäusen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das rekombinante Protein der Fe-Hydrogenase gewonnen. Dieser Antikörper wurde einerseits für Lokalisationsstudien der Fe-Hydrogenase in *E. histolytica*-Trophozoiten eingesetzt. Darüber hinaus wurde der Antikörper für Westernblot-Analysen verwendet, mit dem Ziel, das Ergebnis aus der DIGE-Studie mit Hilfe einer unabhängigen Technik bestätigen zu können. Der Antikörper konnte erfolgreich generiert werden und zeigte spezifische Signale im Westernblot, die mit den Ergebnissen aus der DIGE-Analyse übereinstimmen (siehe Abbildung 3.11).

Bisher gibt es für *E. histolytica* keine Informationen darüber, wo die Fe-Hydrogenase in der Zelle lokalisiert ist. In verschiedenen anderen Organismen konnte eine Assoziation der Fe-Hydrogenase mit Organell-Membranen nachgewiesen werden. Beispielsweise konnte das Protein in dem anaeroben Ciliaten Nyctothermus ovalis an einer Mitochondrien-ähnlichen Struktur, dem Hydrogenosom nachgewiesen werden. In Grünalgen ist die Fe-Hydrogenase an den Chloroplasten lokalisiert (zur Übersicht siehe Das, 2006). Die Lokalisation der Fe-Hydrogenase mittels Immunfluoreszenz-Analysen (IFA) ergab, dass das Protein im Zytoplasma von E. histolytica-Trophozoiten nachgewiesen werden konnte, wobei die Vakuolen der Zelle ausgespart blieben. Diese Beobachtung bestätigt die DIGE-Studie, in der die Fe-Hydrogenase ebenfalls in der NaPBS-löslichen Proteinfraktion nachgewiesen wurde. Zusätzlich erwies sich der Antikörper als hoch spezifisch, so dass die Menge des Proteins in der entsprechenden Zelle durch die Signal-Intersität des Antikörpers widergespiegelt wurde. Trophozoiten der Zelllinie B und die Fe-Hydrogenase-überexprimierenden Transfektanten der Zelllinie A zeigten dementsprechend die stärksten Fluoreszenz-Signale (siehe Abbildung 3.12 A). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die fe-hydrogenase-überexprimierenden Zellen auch das Protein synthetisieren und es sich in seiner Lokalisation nicht von den Zellen unterschied, die die Fe-Hydrogenase normalerweise bilden (siehe Abbildung 3.12 B).

4.6 Ausblick

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Durchführung der verschiedenen, weitreichenden Analysen, die sowohl das Proteom als auch das Transkriptom der apathogenen Zelllinie A und der pathogenen Zelllinie B von E. histolytica untersuchen und miteinander vergleichen sollten. Es konnten zahlreiche neue Moleküle identifiziert werden, die als Pathogenitätsfaktoren des Erregers in Betracht kommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Daten, die durch die Anwendung verschiedener Methoden auf Protein-Ebene erzeugt wurden, sehr gut korrelieren. Genauso bestätigten sich die Daten, die mit unterschiedlichen Techniken auf Transkriptom-Ebene gewonnen wurden. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Unterschiede zwischen Zelllinie A und Zelllinie B auf tatsächliche, biologische Unterschiede zurückzuführen sind. Beim Vergleich der Ergebnisse, die auf Transkriptom- und Proteom-Ebene erhalten wurden, fällt auf, dass nur sehr wenige übereinstimmende Ergebnisse gefunden wurden. Dies weist auf eine komplexe Regulation post-transkriptioneller und post-translativer Prozesse in E. histolytica hin, die noch nicht vollständig verstanden sind. In Anbetracht dessen, dass von der Transkriptmenge eines Moleküls offensichtlich nicht auf dessen Proteinmenge in der Amöbe geschlossen werden kann, wird es für zukünftige Untersuchungen umso wichtiger, die Proteom-Ebene von E. histolytica genauer zu betrachten.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nur exemplarisch anhand der Fe-Hydrogenase möglich, ein Molekül und seine Funktion in *E. histolytica* genauer zu untersuchen. Lokalisationsstudien und die Generierung überexprimierender Transfektanten erwiesen sich dabei als nützliche Strategien. Darüber hinaus könnten die Transfektanten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bildung eines ALAs im Tiermodell untersucht werden. Weitere Charakerisierungs-Studien aller identifizierten, differentiell regulierten Moleküle, sollten in weiterführenden Studien durchgeführt werden, um deren Beteiligung an den pathobiologischen Mechanismen von *E. histolytica* weiter aufklären.

LITERATURVERZEICHNIS

Ali, I.K., Zaki, M. und Clark, C.G. (2005) Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping Entamoeba histolytica. *J Clin Microbiol.* **43**: 5842-5847.

Ankri, S., Stolarsky, T. und Mirelman, D. (1998) Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect Entamoeba histolytica cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol.* **28**: 777-785.

Beck, D.L., Boettner, D.R., Dragulev, B., Ready, K., Nozaki, T. und Petri, W.A., Jr. (2005) Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in Entamoeba histolytica. *Eukaryot Cell.* **4**: 722-732.

Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Maraninchi, D., Viens, P. und Birnbaum, D. (2006) Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *Omics.* **10**: 429-443.

Blessmann, J., Ali, I.K., Nu, P.A., Dinh, B.T., Viet, T.Q., Van, A.L., *et al* (2003) Longitudinal study of intestinal Entamoeba histolytica infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol.* **41**: 4745-4750.

Bracha, R. und Mirelman, D. (1984) Virulence of Entamoeba histolytica trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J Exp Med.* **160**: 353-368.

Bredeston, L.M., Caffaro, C.E., Samuelson, J. und Hirschberg, C.B. (2005) Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of Entamoeba histolytica. *J Biol Chem.* **280**: 32168-32176.

Bruchhaus, I., Brattig, N.W. und Tannich, E. (1992) Recombinant expression, purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from Entamoeba histolytica. *Arch Med Res.* **23**: 27-29.

Bruchhaus, I., Richter, S. und Tannich, E. (1997) Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of Entamoeba histolytica. *Biochem J.* **326 (Pt 3)**: 785-789.

Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N. und Tannich, E. (2003) The intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell.* **2**: 501-509.

Bruchhaus, I., Roeder, T., Lotter, H., Schwerdtfeger, M. und Tannich, E. (2002) Differential gene expression in Entamoeba histolytica isolated from amoebic liver abscess. *Mol Microbiol.* **44**: 1063-1072.

Choi, M.H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B.E. und Reed, S.L. (2005) An unusual surface peroxiredoxin protects invasive Entamoeba histolytica from oxidant attack. *Mol Biochem Parasitol.* **143**: 80-89.

Clark, C.G. und Diamond, L.S. (1991) Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' Entamoeba histolytica are distinct. *Mol Biochem Parasitol.* **49**: 297-302.

Clark, C.G., Alsmark, U.C., Tazreiter, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., *et al* (2007) Structure and content of the Entamoeba histolytica genome. *Adv Parasitol.* **65**: 51-190.

Clos, J. und Brandau, S. (1994) pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* **5**: 133-137.

Czupalla, C., Mansukoski, H., Pursche, T., Krause, E. und Hoflack, B. (2005) Comparative study of protein and mRNA expression during osteoclastogenesis. *Proteomics*. **5**: 3868-3875.

Das, D., Dutta, T., Nath, K., Kotay, S.M., Das, A., Veziroglu, N. (2006) Role of Fehydrogenase in biological hydrogen production. *Currant Science*. **90**: 1627-1637.

Davis, P.H., Schulze, J. und Stanley, S.L., Jr. (2007) Transcriptomic comparison of two Entamoeba histolytica strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol.* **151**: 118-128.

Davis, P.H., Zhang, X., Guo, J., Townsend, R.R. und Stanley, S.L., Jr. (2006) Comparative proteomic analysis of two Entamoeba histolytica strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol.* **61**: 1523-1532.

Dawid, I.B., Breen, J.J. und Toyama, R. (1998) LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* **14**: 156-162.

de Chassey, B., Dubois, A., Lefkir, Y., Letournour, F. (2001) Identification of clathrinapaptor medium chains in Dictyostelium discoideum: differential expression during development. *Gene.* **262**: 115-122.

Desjardins, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol.* **3**: 280-291.

Diamond, L.S. und Clark, C.G. (1993) A redescription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* **40**: 340-344.

Diamond, L.S., Harlow, D.R. und Cunnick, C.C. (1978) A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **72**: 431-432.

Duncan, R. (2004) DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol.* **20**: 211-215.

Ehrenkaufer, G.M., Haque, R., Hackney, J.A., Eichinger, D.J. und Singh, U. (2007) Identification of developmentally regulated genes in Entamoeba histolytica: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite. *Cell Microbiol.* **9**: 1426-1444.

Fournier, M., Dermoun, Z., Durand, M.C. und Dolla, A. (2004) A new function of the Desulfovibrio vulgaris Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress. *J Biol Chem.* **279**: 1787-1793.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., *et al* (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell.* **110**: 119-131.

Geyer, F.C. und Reis-Filho, J.S. (2008) Microarray-based Gene Expression Profiling as a Clinical Tool for Breast Cancer Management: Are We There Yet? *Int J Surg Pathol.*

Gilchrist, C.A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., *et al* (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the Entamoeba histolytica transcriptome. *Mol Biochem Parasitol.* **147**: 163-176.

Hamann, L., Nickel, R. und Tannich, E. (1995) Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 8975-8979.

Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E. und Bruchhaus, I. (2001) Overexpression of cysteine proteinase 2 in Entamoeba histolytica or Entamoeba dispar increases amoebainduced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol.* **3**: 13-20.

Hirata, K.K., Que, X., Melendez-Lopez, S.G., Debnath, A., Myers, S., Herdman, D.S., *et al* (2007) A phagocytosis mutant of Entamoeba histolytica is less virulent due to deficient proteinase expression and release. *Exp Parasitol.* **115**: 192-199.

Horstmann, R.D., Leippe, M. und Tannich, E. (1992) Host tissue destruction by Entamoeba histolytica: molecules mediating adhesion, cytolysis, and proteolysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87 Suppl 5: 57-60.

Hrebicek, T., Dürrschmidt, K., Auer, N., Bayer, K., Rizzi, A. (2007) Effect of CyDye minimum labeling in differential gel electrophoresis on the reliability of protein identification. *Electrophoresis*. **28**: 1161-1169.

Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E. und Leippe, M. (1998) Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of Entamoeba histolytica. *Mol Microbiol.* **27**: 269-276.

Kadrmas, J.L. und Beckerle, M.C. (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**: 920-931.

Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* **60**: 2299-2301.

Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S. und McKerrow, J.H. (1986) The major neutral proteinase of Entamoeba histolytica. *J Exp Med.* **163**: 536-549.

Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E. und Aebersold, R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem.* **74**: 5383-5392.

Keller, F., Walter, C., Lohden, U., Hanke, W., Bakker-Grunwald, T. und Trissl, D. (1988) Pathogenic and non-pathogenic Entamoeba: pore formation and hemolytic activity. *J Protozool.* **35**: 359-365.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Leippe, M. und Muller-Eberhard, H.J. (1994) The pore-forming peptide of Entamoeba histolytica, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology*. **87**: 5-18.

Leippe, M., Sievertsen, H.J., Tannich, E. und Horstmann, R.D. (1995) Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable Entamoeba histolytica. *Parasitology*. **111** (**Pt 5**): 569-574.

Liu, C., Wang, T., Zhang, W. und Li, X. (2008) Computational identification and analysis of immune-associated nucleotide gene family in Arabidopsis thaliana. *J Plant Physiol*. **165**: 777-787.

Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**: 402-408.

Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C., Samuelson, J., Amedeo, P., *et al* (2005) The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica. *Nature*. **433**: 865-868.

Lotter, H., Khajawa, F., Stanley, S.L., Jr. und Tannich, E. (2000) Protection of gerbils from amebic liver abscess by vaccination with a 25-mer peptide derived from the cysteine-rich region of Entamoeba histolytica galactose-specific adherence lectin. *Infect Immun.* **68**: 4416-4421.

MacFarlane, R.C. und Singh, U. (2006) Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent Entamoeba species: potential implications for amebic pathogenesis. *Infect Immun.* **74**: 340-351.

Maskos, U. und Southern, E.M. (1992) Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1679-1684.

Mora-Galindo, J., Gutierrez-Lozano, M. und Anaya-Velazquez, F. (1997) Entamoeba histolytica: kinetics of hemolytic activity, erythrophagocytosis and digestion of erythrocytes. *Arch Med Res.* **28 Spec No**: 200-201.

Nannini, M., Pantaleo, M.A., Maleddu, A., Astolfi, A., Formica, S. und Biasco, G. (2008) Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: Results and perspectives. *Cancer Treat Rev.*

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. **9**: 255-262.

Nitta, T., Nasreen, M., Seike, T., Goji, A., Ohigashi, I., Miyazaki, T., *et al* (2006) IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes. *PLoS Biol.* **4**: e103.

Okada, M., Huston, C.D., Mann, B.J., Petri, W.A., Jr., Kita, K. und Nozaki, T. (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica. *Eukaryot Cell.* **4**: 827-831.

Olivos-Garcia, A., Tello, E., Nequiz-Avendano, M., Gonzalez-Canto, A., Lopez-Vancell, R., Garcia de Leon, M.C., *et al* (2004) Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology*. **129**: 19-25.

Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. und Sanchez, T. (1983) Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med.* **158**: 1511-1521.

Pei, J. und Grishin, N.V. (2001) Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends Biochem Sci.* **26**: 275-277.

Petri, W., Jr. (1996) Amebiasis and the Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *J Investig Med.* **44**: 24-36.

Petri, W.A., Jr., Joyce, M.P., Broman, J., Smith, R.D., Murphy, C.F. und Ravdin, J.I. (1987) Recognition of the galactose- or N-acetylgalactosamine-binding lectin of Entamoeba histolytica by human immune sera. *Infect Immun.* **55**: 2327-2331.

Quackenbush, J. (2006) Standardizing the standards. Mol Syst Biol. 2: 2006 0010.

Que, X., Brinen, L.S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B.E., *et al* (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by Entamoeba histolytica. *Mol Biochem Parasitol.* **119**: 23-32.

Renzone, G., D'Ambrosio, C., Arena, S., Rullo, R., Ledda, L., Ferrara, L. und Scaloni, A. (2005) Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance. *Ann Ist Super Sanita*. **41**: 459-468.

Ringrose, J.H., Jeeninga, R.E., Berkhout, B. und Speijer, D. (2008) Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **82**: 4320-4330.

Sambrook, J. und Gething, M.J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. **342**: 224-225.

Sargeaunt, P.G. und Williams, J.E. (1978) Electrophoretic isoenzyme patterns of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **72**: 164-166.

Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S. und Nozaki, T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine gamma-lyase 1 from Entamoeba histolytica. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **64**: 697-699.

Schluter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. und Clos, J. (2000) Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in Leishmania donovani. *Biochim Biophys Acta*. **1491**: 65-74.

Scholze, H. und Tannich, E. (1994) Cysteine endopeptidases of Entamoeba histolytica. *Methods Enzymol.* 244: 512-523.

Spano, D., Cimmino, F., Capasso, M., D'Angelo, F., Zambrano, N., Terracciano, L. und Iolascon, A. (2008) Changes of the hepatic proteome in hepatitis B-infected mouse model at early stages of fibrosis. *J Proteome Res.* 7: 2642-2653.

Stanley, S.L., Jr. (2003) Amoebiasis. Lancet. 361: 1025-1034.

Stanley, S.L., Jr., Zhang, T., Rubin, D. und Li, E. (1995) Role of the Entamoeba histolytica cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun.* **63**: 1587-1590.

Tachibana, H., Ihara, S., Kobayashi, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T. und Watanabe, Y. (1991) Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of Entamoeba histolytica identified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* **29**: 2234-2239.

Tannich, E., Horstmann, R.D., Knobloch, J. und Arnold, H.H. (1989) Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**: 5118-5122.

Tazreiter, M., Leitsch, D., Hatzenbichler, E., Mair-Scorpio, G.E., Steinborn, R., Schreiber, M. und Duchene, M. (2008) Entamoeba histolytica: response of the parasite to metronidazole challenge on the levels of mRNA and protein expression. *Exp Parasitol.* **120**: 403-410.

Tillack, M., Nowak, N., Lotter, H., Bracha, R., Mirelman, D., Tannich, E. und Bruchhaus, I. (2006) Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of Entamoeba histolytica. *Mol Biochem Parasitol.* **149**: 58-64.

Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M.A., Tannich, E. und Bruchhaus, I. (2007) The Entamoeba histolytica genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*. **8**: 170.

Tovar, J., Fischer, A. und Clark, C.G. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite Entamoeba histolytica. *Mol Microbiol.* **32**: 1013-1021.

Trissl, D., Martinez-Palomo, A., de la Torre, M., de la Hoz, R. und Perez de Suarez, E. (1978) Surface properties of Entamoeba: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp Med.* **148**: 1137-1143.

Van den Bergh, G. und Arckens, L. (2005) Recent advances in 2D electrophoresis: an array of possibilities. *Expert Rev Proteomics*. **2**: 243-252.

van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G. D. (1996) Amöbenruhr und Amöbenleberabszess. *Dt Ärzteblatt.* **93**: 3410-3416.

Washburn, M.P., Wolters, D. und Yates, J.R., 3rd (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* **19**: 242-247.

Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E. und Bruchhaus, I. (1999) Metronidazole resistance in the protozoan parasite Entamoeba histolytica is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem.* **274**: 26051-26056.

Weber, C., Guigon, G., Bouchier, C., Frangeul, L., Moreira, S., Sismeiro, O., *et al* (2006) Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in Entamoeba histolytica. *Eukaryot Cell.* **5**: 871-875.

Wender, N., Villalobo, E. und Mirelman, D. (2007) EhLimA, a novel LIM protein, localizes to the plasma membrane in Entamoeba histolytica. *Eukaryot Cell*. **6**: 1646-1655.

WHO/PAHA/UNESCO (1997) report: A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull.* **18**: 13-14.

Willhoeft, U., Buss, H. und Tannich, E. (1999) Analysis of cDNA expressed sequence tags from Entamoeba histolytica: identification of two highly abundant polyadenylated transcripts with no overt open reading frames. *Protist.* **150**: 61-70.

ANHANG

Oligonukleotid für cDNA-Synthese

Oligo(dT7-I) GAGAGAGGATCCAAGTACTAATACGACTCACTATAGGGAGAT₂₄

Oligonukleotide für Überexpressionskonstrukte

EhC2-DP_S (Kpn I)	GGGGTACCATGAGAATAGAACTTAAAGTTATTGAAGG				
EhC2-DP_AS (Bgl II)	GGAGATCTTTAATAAAATCCTGGTGGTGG				
EhFe-Hyd_S (Kpn I)	GG GGTACC ATGAGTACTCAACTTACTCCTCTTAG				
EhFe-Hyd_AS (BamH I)	GG GGATCC TTAATTTTCTACTTTTATTGGCTT				
(Palindrom-Sequenzen für Restriktionsenzyme sind fett unterlegt)					

Oligonukleotide für die rekombinante Expression von Sequenzen in Bakterien

EhFe-Hyd_S (*EcoR* I)GGGAATTCATGAGTACTCAACTTACTCCTCTTAGEhFe-Hyd_AS (*BamH* I)GGGGATCCTTAATTTTCTACTTTTATTGGCTT(Palindrom-Sequenzen für Restriktionsenzyme sind fett unterlegt)

Oligonukleotide für Sequenzierungsanalysen der TOPO-Klonierungen

M24F CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT

M24R ACACAGGAAACAGCTATGACCATG

Tabelle A-1.	Oligonukleati	de für aus	ntitative <i>Rel</i>	al-time PCR-	Analysen
Tabene A-1.	Ongonukicou	uc iui yua	nulauve nee		Anarysch

Proteiname	Accession-Nr.	5' Oligonukleotidsequenz	3' Oligonukleotidsequenz
Acetyl-CoA Synthetase	XM_651198	TCCACAAATTGACGGAGTTG	CATGAGGCAAGGACTGGTTT
Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	XM_643889	TGGAGAGCTGGTAGATGTGC	GGGGTTCCAACTCTGAATGA
Adenylatzyklase- assoziiertes Protein	XM_650148	TCCAAAAGGAGGTGTTGCTT	AACCAGCTGGATTTGGTTGT
Galaktokinase	XM_643993	AGCTGGGTTTGGTGGATGTA	GAGCTCCATCTTCTGGTTGG
Pyruvat-Phosphat Dikinase	XM_652240	GAGGAAAGGGAGCTGGACTT	CCTTCTGGCATTTTGTTTCC
Hitzeschockprotein 90	XM_648070	CAGCTGCATTTGCTGGTAGA	CAACAGCTGGAACTGCTTCA
Peroxiredoxin	XM_644418	TCCATTGGATTGGACATTTG	CACACCATGCTTGATGACAA
Translations- Elongationsfaktor EF-1 α	XM_646777	TGGAAGGAGGAGAACCAGAA	CAGCAAATCTTCCCAATGGT
Proteiname	Accession-Nr.	5' Oligonukleotidsequenz	3' Oligonukleotidsequenz
Polyadenylat-bindendes Protein	XM_650099	ATTAAATGTGGGGGCTGATGG	TGGAGCAGTAACAGCTTTTTGA
C2-Domänen-Protein	XM_650207	GGACGTTTTTCCAGGTGAAG	GACCTGGGAAACCATTCAAA
14-3-3 Protein 3	XM_649373	TGCTGATCTTGCACCAACTC	TTAGCAAGTTGGCAGGCTTT
Grainin 1	XM_645280	TTGTGCTGCTTATCTTGGACA	AGCGTCATCCATCAACATCA
Grainin 2	XM_645264	TATCCAAGCTGCTGCTGATG	GGAACCACCATTGGAACTTG
EhABP-ähnliches Protein	XM_645483	ATGGCACTTCCAGAACCTGA	TGCTTCACGTGCAAGTCTTT
SH3-Domänen-Protein	XM_646985	AAGGCTCGTTGGAAAGAACA	CTAGCGAAAGCCGAAACATT
SH3-Domänen-Protein	XM_643993	TGGACTTGGAGAAGCACAGA	GGTGAAACAACCTCCTCAGC
Cdc48-ähnliches Protein	XM_645819	GCACGAGCTGTTGCTAATGA	TCTGCTTCTGCAAATGCTTC
Hypothetisches Protein	XM_651920	CTGCTGTTGAAGCTGTTGCT	AGACCAAGTTGGACAAGGTGA
LIM-Domänen-Protein	XM_651826	TGCACCAAAGAAAGAAGCTG	TGGTTGTTCAGTTGGAGCAG
PIWI-ähnliches Protein	XM_651422	ATGCAACCATCAATTCACGA	TTGGCAATCTGGTTCTTCAA
Fe-Hydrogenase	XM_647747	GTGCTTATGGACCAGGGTGT	CAACCCATCTTCCTTCTGGA
Rho-Familie GTPase	XM_647903	CAAGGTGAGGCTAAATGCAA	TCCACCTGCAGGAGAAATAA
Phospholipid-transport. P- Typ ATPase	XM_651846	TGATCGCCAAAACTGTCAAA	GCTCTTGCTGCTTGAGTTCC
Superoxiddismutase	XM_643735	GATGGTGTTGGTTGGTTGAA	GCATGTTCCCAAACATCACA
ARP2/3 Komplex 34 kDa Untereinheit	XM_645477	GATGCTGTGTTTGGTCGTGT	GAAGGTGGTGGTGCATTCTT
Paxillin	XM_648398	AGCTGCACCAAAAGACGATT	ATGGTTGTCCACATTCAGCA
Hypothetisches Protein	XM_642799	CTTCTGCACAAGCTGCTCCT	AACCAGCTGGATTTGGTTGT
Hypothetisches Protein	XM_643411	ACAACCCACCACAAGTAGCC	CATTGATGGAGATGCTCCTG
Villin	XM_649716	GGAACTGGCTGTCCAAAAGA	CGAACAGGCTCTTGTCCATT
Cortexillin	XM_643551	AAAGGTCAGCCGAATTAGGAG	CAATCATCTTGTGCTGTTTGAA
Dipeptidylpeptidase	XM_650381	TTGGAGTTTTTGGAGCATCA	AAGAATTGGTGCATGAACTGC
Hypothetisches Protein	XM_646771	TGCATTGCGACTAAACCACT	TCCTCTTCATCGTTCACATCA
70 kDa Hitzeschockprotein	XM_647878	TGGTTATTCCTGTTGGTGGA	AGTGCTGCTCCTCTGGCTAC
Erythrozyten Bindungsprotein	XM_645291	CATTCAACCAGCAATTGAAGT	TGATGATTCAAGTTATCCGACT
Virales A-Typ Einschlussprotein	XM_649962	GCAGATCTTAATGGTGCTTCAA	CTACCACCAGCCTCACCAAG
Beige/BEACH-Domänen- Protein	XM_646695	ATTGAATTGTGCTGCTCGTC	TCACCAATTCCAATAGTTCCTT
IP:PROFILE:CPASE_2	XM_651246	CATGTTCTGGAGACCCAACA	CAAATTGATCAACTGGCATATC

Proteiname	Accession-Nr.	5' Oligonukleotidsequenz	3' Oligonukleotidsequenz
AIG-ähnliches Protein	XM_648725	CCTCAAGCTGTGTTAGAAGAATC	TGACCTAGAGTTATCTTGTCCTG
AIG1-Familie Protein	XM_648115	AAGAAAAAGCATCAGTCATA	GTTTTTCATTGCTCATAACT
AIG-ähnliches Protein	XM_645223	TGGTCTTGCTAGTGGTGCTA	CAGGTGCTGTGATAAGTGGA
AIG1-Familie Protein	XM_643009	TTGTGGACCAAGACCAACTAA	CCATGGTCCTTCTGATGATG
Hypothetisches Protein	XM_645139	AGATGGTGATGCTGTTGGAT	CCTGACTGTAACCATATCTCCA
Hypothetisches Protein	XM_647137	CGTGATTATCAAGTGTGCGTTC	GCTTCAACATCAATCCAGTCTT
Hypothetisches Protein	XM_648869	TTGTTGTTGCAGCTCAAGATTT	TGGGGAAGACCAAACATCAC
AIG1-Familie Protein	XM_643035	ATTGGGTTTTACGGAGAAGGT	TAGTCAACCATTTGGTTCGTG
AIG1-Familie Protein	XM_643240	TGAAGGGTTACAAGGGATTA	TCTCACATTCAGTCCAAACA
AIG1-Familie Protein	XM_643194	GGAAATGGTAAAAGTTCACTTGG	TTCCATTTTCTCCAACAACATC
Putatives AIG-Protein	XM_643099	ATTGGAAATACAGGTGATGG	TCCACTTGTTTCTTGTGTCA
Putatives AIG-Protein	XM_643163	GCCGAGTAGAAGCTGATGAAA	CTCCATCACTTCCCATTCACT
Putatives AIG-Protein	XM_643164	AATCCAGATGAAGGATGTGA	GGACTTTTTCATTTCCCTTT
Putatives AIG-Protein	XM_648115	AAGAAAAAGCATCAGTCATA	GTTTTTCATTGCTCATAACT
AIG1-Familie Protein	XM_648140	GGGTTTTACGGAGAAGGTGAT	TAGTCAACCATTTGGTTCGTG
AIG1-Familie Protein	XM_649824	TCTTTGGACCAAGAGGAAAAA	TGGTCCTTCTGATATGTTCCA
Putatives AIG-Protein	XM_643798	AATGCTTTTAACATGGGCAAG	CGAGTTTCGTTTTTCTCTTCAA
AIG1-Familie Protein	XM_645021	CCTTGGAACTACAGGTGATGG	TCCATATGAGCCAAGTGTTTG
Putatives AIG-Protein	XM_642923	GAATGGGGAAGAGGAATAAC	TTTCCCATTGATTCTGTTTC
AIG1-Familie Protein	XM_644114	AATTGAATGGGGAAGAGGAGT	TTCCCATTGATTCTGTTTCTTC
AIG1-Familie Protein	XM_643379	TGGTGATTGGGAAATAGTCAA	CGCTCCTATTGCTCCTATTGT
Putatives AIG-Protein	XM_643380	GGGAATTGTCATAACATTGG	TTAACTCCAACAGCAACCTT
Putatives AIG-Protein	XM_643637	GGGTTTTTGGAAAACGGTAGT	CCTTACCAGCACCAAGAAGAG
Putatives AIG-Protein	XM_643100	CTGGAAAAGAAGGTGTTGCTT	ACTACGAGCCCATGCTAAAAA
Putatives AIG-Protein	XM_643463	CGAAGAAACAACTGGAGATT	GTTCGTACCCAACTCAACAT
Putatives AIG-Protein	XM_643795	CTTTCCCCATGTTCTTTGTTG	AAACTACGAGCCCATGCTAAA
Putatives AIG-Protein	XM_648158	AGCAAAGACCAACGAAATTA	CTGAATCCGGACTACCACTA
AIG1-Familie Protein	XM_643735	CTTTCCCCATGTTCTTTGTTG	AAACTACGAGCCCATGCTAAA
Putatives AIG-Protein	XM_643097	GCTAAAGAAACAACAGGAGATGAA	TACATGCCCATGTTAAAAGCA
AIG1-Familie Protein	XM_643462	GGAGGAATAGGAGATGGGAAA	TCGTCTCTTGTGTTTTTGGTG
AIG1-Familie Protein	XM_643464	TAATGGTGGTGCACTTTCTCA	CAAACATGCTTCCAAAAGTCA
AIG1-Familie Protein	XM_642959	TGCTAAATGTTTTGGAGAAGGA	TTCCTTGTAATCCCTCAGCTC
AIG1-Familie Protein	XM_644115	TGGAAAAAGTATGGGGTGTTG	AACAGCACCACCAATGACAG
Putatives AIG-Protein	XM_644113	AATTGGAGAAACAGGTGTTGG	TTCCAAAATAGCCAGCAACAT
Putatives AIG-Protein	XM_643102	TTGCGTTAGAGCTGAAGGATT	CAAACGTGTTTCCAAATGTCTT
AIG1-Familie Protein	XM_643721	TGGAGAAACAGGTACTGGTAAAA	ТСАСТТСТТСТССТТСТССАА
AIG1-Familie Protein	XM_643063	AGGAAAAAGTATGGGGTGTTG	AACAGCACCACCAATGACAG
Putatives AIG-Protein	XM_642922	TTGGTACTATTGCTGGTGCTG	TCATCATCGACTGCATCAACT

Proteinname	Spots- Position	Accession-Nr.	Oligonucleotidsequenz (5'—3'-Orientierung)
	AI A2		
Actin	A2 A3	XM 651518	CTACATTCCAAAACATGTGGATTACCAAGGAAGAATATGATGAATCTGGACCAGCTATTG
AsP22-1	A4	XM 648987	GAAGTTATGTTGACAGTAGCAACTCATGTTGACGGACCAATCAAATTTATCTTCCCTAAA
AsP22-4	A5	XM 648604	ATGTTGATTCAAACCCATTCACTCTATCATCTACACATGGAAAAGGAGTAAAGTTAGGAC
AsP22-2	A6	XM 647728	ATATTATTGATATGGAATTATCAAATAGGCATACCTGTGTTACTGTGCATAGTTCCAGCA
AsP22-3	A7	XM 652471	ACAAATTCTCTTCCTGAACTTAGTCTACCTTCTGACTTCTCACATGAATCTCCTGTCTTT
EhCP-A1	A8	XM 645064	TCACTGTCATTTTGATGTTTTATATTGGATATGGGATTGATT
EhCP-A2	A9	XM_645550	ATGTTTGCTTTTATTTGTTTACTTGCTATTGCAAGTGCTATTGATTTCAATACATGGGCT
EhCP-A3	A10	XM_648162	CAACAACATGTGTGGTATTGGAAGAGATTCTAACTATCCAACCGGAGTCAAGTTAATTTA
EhCP-A4	B1	XM_651510	TTCACTCCAAAAGTTCAAACTACTGGTTTAACTCATGTTACTCCAACTGAAGAAGCTTTA
EhCP-A5	B2	XM_645845	TGCTGTTAAAATTACTGGACAAAAATTAGTTAGACCAGGAAGTGAAAAAGCACTTATGCG
EhCP-A6	B3	XM_652272	ATGTTTGGTTTACTCTTTGTTACTCTCATTTCATTGAGCAATGCTATTAGCTTTGATAAA
EhCP-B1	B4	XM_646489	ACTGTTGATGGTTATGGAGAATGTGATGGACATAAATTCCTTTGGGTAAGAAATTCATGG
EhCP-A8	B5	XM_652354	AATGTCCAGAAATAAGAATAATCAATGTGGTATTTGCACAGGAATTTCATTCCCAGTTGG
EhCP-A10	B6	XM_646598	GTAATAGTTGGGGTGATTGGAAATGGGGAGAAGATGGATATATGAGACTTTATAGAGGAG
EhCP-B2	B7	AY156069	
EhCP-B3	B8	XM_651655	
EhCP-B4	B9	XM_643409	
EhCP-B5	BIO	XM_64/5/9	
EnCP-B6		XM_64/3/3	
EICP-D/	C2	XM_043308	
EhCP-A10	C3	XM_646598	
EhCP-B8	C4	XM_64595/	
EhCP-ATT EhCP C1	C5	XM 640361	ACTTTTAAACGTGGGGTATGCAAAACTAGAGAGATGGGAGATGGACTTATTGTTTATCTA
EhCP-B10	C7	XM_643214	ACATTAAAATGTTCTGCTTGTAAAGCAAATACTACTCTTGATGCAAGAGGAATGTGTGTT
EhCP-C2	C8	XM_651540	TCAGCATATGTTATTCCTGAAAATAGAATCACTCCAGTTAAAGGACAATTAGCTAGAGGT
EhCP-A12	C9	XM 648731	CCAATTAAATCAAGTGGAACAAGATATTTTGAAGCAACAATTGATGGTATTGAAGCAGCA
EhCP-C3	C10	XM 650036	CGTTCAACTTGTTGGTCTTTTGTTACTTCTGGTTTCTTAGAGTCTGCCTATAATTCTGAG
EhCP-C4	D1	XM 650708	TATCCTCAATAAACATTTACCATTCTGGGGAGGGTATGTTGGAAGTCATTTTGAAATTGA*
EhCP-C5	D2	XM 649708	TGCACCATTTATCAAAGAGAATGAAATAGTATCGACGTTTGAAAAGTCTGTAGGAAATGT
EhCP-C6	D3	XM 646461	ACTTGTGGAGCATTTATTATTAGAGATTCTACTGATGATACTCTTGTTTATGGCAGTCAT
EhCP-C7	D4	XM_652181	AATGGTATTAGAAAAGGATTTCTTAAAGAAAATGAATATCTTAGACTATCACCTCAAGCA
EhCP-C8	D5	XM_652181	AGAAAGTTCATATAGAGCTTATGGTCTTCGACATAATCTTCTTAACTCAACAGAGTATGT
EhCP-C9	D6	XM_649919	GTACCATGTCCATCATCTTTAGGAGGGGATTGTGTTGTACTTACT
EhCP-A13	D7	AY156071	CATAAATCGTACACCAACAAAGCAGAGTATCTTTATCGTCTCGCCGTCTTCTTAGACAAC "
EhCP-C10	D8	XM_649737	TGCACCATTTATCAAAGAGAATGAAATAGTATCGACGTTTGAAAAGTCTGTAGGAAATGT
EhCP-C11	D9	XM_642991	TGGGTGTCGAGATTTAGAAACGATAAATAAGTCATTTGATCCAGATTTTGCTCCTTCATT
EhCP-C12	D19	XM_645737	TTAGTICGTAACGAATTICAAGGTGATTGTATTAATGACCAACTTAAAAGTGAGTGTCAA
EhCP-C13	E1	XM_651464	GCTACCATIGGTCTTTTGGAACAATCATATAGAGATAATGACTATCACCTCAAGCATATG
EHCP-B11	E2	XM_642921	AAAGAGTATTTGACTATGATGAGAGAGAGGAGCACAATGCAAAAGGAAGTTCTTATAGAATGGGA
EhAUTO1	E3	XM_646294	ATCACATICACIGAACATCAACTAATTITAGACICATTAGCICITTCTCAAAGTCGAGGA
EhAUTO2	E4	XM_648706	TICATGGAAATTATGTCCTATTAGATGTGTTATGTGTTCAAATGTTTCAATACCAACTCA
EhUBHY	E5	XM_652264	CAGTCTITAAAAAAGTGGTTTGAAATTAATAACGAAGAGGTGAAAGAAGCATTTTTCCCA
EhAUTO3	E6	XM_646951	ACACCTITICAACITIGTITICGAATCACITATAGAAATGGCTITACITACCATITACCICA
EhAUTO4	E7	XM_651632	
EhCALP1	E8	XM_644830	ATGICTAAAACACCGAGAGAAAGAGCAGGAAGAGAACCTAAAATGGGAAAAGTAGGAATG
EhCALP2	E9	XM_652220	AGCTTTAAGTGATTTAACAGGAATGCCAGTAAAACGTATATCTACCAGAGAAACAGACGT
EhOTU	E10	XM_648921	
EhCP-B9	FI	XM_647901	
EhCP-I-I	F2	XM_648163	
EnCP-I-2	F3	XM_644271	
Hexokinase	F4	XM_650873	
Phosphotruktokinase	F5	XM_648631	
Enolase	F0 F7	XM_644069	AGATGTTACTATTTCTTATGGTGGAGTATTCCCTAATGTTCC_TACTGCCGTTAATCAA
	Г/	AM_04/3/8	
EnWP8-1	F8 F0	XM_650302	
EhMP16_1	F9	XM_64/540	ATA AGGTTAGAGTTGA AGGTGGTGCTTATGGA A GTTGGATGTCTTATTCATATGTGGA A
EhMP1-1	G1	XM 647466	TTTGGTGATTTAGTTACAATGAAATGGTGGAATGATCTTTGGCTTAATGAAGGATTTGCT
EhMP24-5	G2	XM 644888	TGGTTCCCAATATAAAGAAGGATGTACTACTGATGTAACAAGAACTGTTCATTATGGAGA
EhMP24-4	G3	XM 645554	AGAACCATTATTATTCCACGTATAAAAGATAGTTATGTAATTCAGTGGGTTGAATCTAAT
EhMP18-1	G4	XM 651526	AACTAGGAGAAGAGGTTGGAGTAAAGTTTCAAAGAACTGTTAAACGACAAGAAAAAGGAG
EhMP24-3	G5	XM 649119	TATTAACTGATCTTGCTGATGTTAATTGGGCTTTCAATATTAGAGCACATGATATTCCTT
EhMP20-3	G6	XM 651453	GGAGATGATGGAACTGGAGTTGCATGTGGACTTGCATATATGGAACTTAGAGATAAATTC
EhMP20-4	G7	XM 650524	TTTATCAGCACAAGGAACTACTCTTGGAGGAGATGATGGAACTGGAAGATAAATTCCAAC
EhMP18-2	G8	XM_645374	GTACAGAAAAGACTTGAGTCTGCTGGTTATGTCCGTCTTAAAGAAAATGAGGTTTGGAAC

Tabelle A-2: Oligonukleotidsequenzen, die für den Microarray II verwendet wurden.

Proteinname	Spots- Position	Accession-Nr.	Oligonucleotidsequenz (5'—3'-Orientierung)
EhMP49-1	G9	XM_649181	CTTTAAGTCACTTGGAAGTGCAATGGAAGAGTGTAGAGCTGAAGCTGTTGGATTATTCTT
EhMP24-1	G10	XM_646447	CAATTCATAAAAGTGTTAGACAATGGGCTCAACAATGGATTAAACCAGGAATGTCAGATC
EhSP26-2	H1	XM_646699	GGTCTGGTGCTACTACTGTTGAACATGGAAATTCTACTAAATTCGTACTTCCTACTGAAT
EhMP48-1	H2	XM_643678	ATGTTGTAGATCCATTTGTCTCTACAATTGAAAAACTCTCACCCAAATCTTGTAGAACGAA
EhU48-1	H3	XM_651374	
EhMP22-1	H4	XM_647200	
EhMP3-1 EhMP2-2	H5 H6	XM_644785	AGATCAGACATTGAAGAATATCGAAAAGCATATGATGAAATTCTCCCCTAAAGTAACAGAA
EIIMP3-2	П0 117	XM_044308	
EnMP24-0 EbMP20_1	П/ ЦQ	XM_048239 XM_651336	AAATAATAACTTCTAGTGGTGATACATACTACTAGTGCAGACGATAAATGTGCTGCTGCTA
EhMP20-2	H9	XM_645060	TCACCATAAATAGTCAAAGTAATGAATCAACTCATGTCACTCCTTCAACCCAATGTCAAT
EhMP24-2	H10	XM_651993	AGACTCAATTATTTTCTTAGAAGGTGGTCTTGAACTTCCATTTTATGATACTGATGGTGA
EhSP9-1	III	XM 650173	AGGATATGATAATCAACCATTATTTAATAATGATGGAAATAAAAGTGATCAATCA
EhSP9-2	12	XM 650130	TGGAAGTCTTTTATATTATCTTTCAATGTCAGCACCTAAAGATGAAAGTGATAAATCAGT
EhSP9-3	13	XM 651288	GGTCTTACAGATGGAATTTCTTATTAATGGCATCAGAAGGGTACATTATTATTGCACCGA
EhSP9-5	I4	XM_650584	GTTATTATATTTTCCCGACGAAAACCACTGGGTTGTTAAAGCACAAAATGGGATGTTATG
EhSP28-3	15	XM 646997	GCATGGCAAATCTGTAGTGAATACAGTTATTTCCAACCAGTTAATGAAAGTCTTCCATTT
	I6		
	I7		
	I8		
	19		
	I10		
	JI		
ELCD26 1	J2 12	VM (49070	
EhSP26-1	J3 14	XM_648050	GCATGGCAAAATCTGTAGTGAATACAGTTATTTCCAACCAGTTAATGAAAGCCTTCCATT
EllSP28-3 FhSP28-1	J4 15	XM_651670	CAGTTACGCAAAACTCTCACTCAACCAACAAGTAATGCAACAAATATCTCAATCATTCAT
EhSP28-2	16	XM_643899	TATCAATGTTAGATATGGAGGAAAGAAACCATGTGTAACCAATGTTGCATTTACAAATGG
EhSP-I	J7	XM 645170	ATTTGATGAACGTGCAGATTTTAGTAAAATGGCAAAAGGACATTTTTGTGTTTCAGAAGC
SOD	J8	XM 643735	TTTGGGAACATGCTTATTACATTGACACTAGAAACAACAGAGCTGCTTACTTA
Rubrerythrin	J9	XM 647039	AAAGTATGTCCACTTTGTGGTGAACCAGGTGACTTCTTCAGAGTTCAAGTTTCTATTTAA
Peroxiredoxin	J10	XM_642815	CAAATTGGAAAAGAAGCACCAGAATTTAAAGCACCAGCATATTGTCCATGTGGTTCAATC
Thioredoxin1	K1	XM_651634	TGTAGACCAAGCTGAAGAAATTTGTGTTAATTATAAAGTTAGATCAATGCCAACATTTGT
Thioredoxin2	K2	XM_649815	TTTTCTGGAGCTGATAAGAACAAATTAAATGATATGGTAATGTGGGCTGCTTTTCAATAA
Thioredoxin3	K3	XM_651803	AGCAAGACAATGTAATATTCGTTCAATGCCAACTTTTAGATTTTATAGACAAGGAGGGTT
Thioredoxin4	K4	XM_644472	AATGGAGTTTCAACCAAAAGATTTACAGGAGCATATAGAGATGAAGTGAAGTAGAGAAGAATGATT
Thioredoxin5	K5	XM_646791	
Thioredoxin-related6	K6	XM_645940	
Thioredoxin-related/	K/	XM_645650	TGTTGCTGAATTAAATTGTGTTGACCTTTAGAGATTTATGTGGGTTCTATAAAATTAGAGG
Thioredoxin-related9	KQ	XM 648410	TTTATCATCTGCTTATATCTGGGAATTTGATCCAAATAAACTACAACGCCAATTAACTCA
Thioredoxin-related10	K10	XM 647543	GTAAAAGTCGATGTTGATCAAGGCACTGACATTGCCCAAAGGTATGGTGTTCGTTC
Thioredoxin-Reduktase	L1	XM 643726	TTTCAGGAGAATACAAAGTTGTTCCAGTAGCTGGATTGTTTTATGCTATTGGACATAGTC
P34 (Disulfidoxido-	L2	X79603	GCAGGAGGACAACTAACTACCACTACTATCATTGAGAATTTCAGGATTTCCAGGATTTCA
reduktase)			
FprA1	L3	XM_646535	GGAATCTTTCAGCAAGACTTCAACAACTAAAAGCAAAACAACCAGTTGAGCCATTGTCTT
FprA2	L4	XM_651854	ATTGTAATAGATTTGTTCAATGCTTTGGTTCATTCGGTTGGAGTGGTGAAGGTGTTAAAA
FprA3	L5	XM_648931	AAATTCTAAAGGATTATTATTAGGAACTCCAACACTTGTTGGTGAAGCACTTCCACCAAT
FprA4	L6	XM_646723	
NADH-Oxidase	L7	XM_650619	
FprB1 EprB2		XM 650029	AGTACCATTGTCTGTTAAAAGTAGAAGCACTGAATAGAAAAGTAGGAGCAGCAGTGTTAT
FprB2 EprB3	L9 I 10	XM 645018	TCAACCAATTTATTACAACAAAGAAACACTTAGAAGAAAAAGTTGCAGCGCAGTTGTTAT
FprC1	M1	XM 647032	TGTTGAGTCATATGGAGCTAAGTATCAAGGAGTTTATTTA
FprC3	M2	XM 647345	AAATTGTAGAAGAACAACAAAAGAAACTGCTGTGAATGCTGAAAAGCCTATTGAATGTTT
FprD1	M3	XM 649789	AAAGACGACTTTTATTGTGTCCAAAAGGACGAGACATTCAAACTAGCGAAGGATATTTTG
FprD2	M4	XM 649865	AATGGAAGTTGGAACAATAATGGTAATTCTGCATGGCTTATCAATAAATTTCTTGAAGGA
FprD3	M5	XM_644279	GATGATGGATTGGAACACATTTTCAGCTAAACAAGAAGTTCTTGACAAAGGAAAAAAGAC
SP7	M6	XM_643899	TTGCAGAGTCTATTGGAACAGCTCTTTCTGGTTATGTTCAATATAATTCTTCAAATTGGA
Metalloprotease	M7	XM_647071	ACTCCAGATGAAACTATGGATATTGAATCAGGAAATAAACTATTAGACCTTATTTGCACT
AmoebaporeA	M8	XM_648173	TTATTGAAGACAAAGTTGATGCCAATGCTATTTGTGCTAAGATTCATGCTTGCT
AmoebaporeB	M9	Q24824	
AmoebaporeC	MI0	XM_650937	
Saplip1	NI NO	AM_0500/44	GAATCTGGGGAATAGATCTGATCAATTTTGTGAATGGGCTAAAAATGTGTCCTTCTTCAAAT
Saplip2 Saplip3	INZ N3	XM 651500	TATGGAATGGATAAAATTGTTGATGCTATTATGGCACATGAATTATCAGACTCTGTTTGT
Saplip5 Saplip4	N4	XM 647067	TTGTAAAATCTCAAGACTCAGAATCTCCCTGCTGGAAAAGTATGTTCAGCTTTACTAGAAAA
Saplip5	N5	EAL50403	CTAGATGTATTGATGTTGCTATGAGATTAACTGAAGTTGCTGTTAAAGTGTTTGACCCAG
Saplip6	N6	XM 650728	GCACTTGCTGGTTCATGCATCAACTGTTTCCATATAATTGATGATTCAAGATACTATACT
Saplip7	N7	XM 651349	CTACAGAACTTTAATAGAACTTGGCTCTCGTGTGTTTGAAGAAGGAGTTACACCAATAAC
Saplip8	N8	XM 651821	TTCATACATTTGACCCATCAAAATTCGTTGTTAGTGAAGTGTGCTCTTCTCTTGGAAAAT

Proteinname	Spots- Position	Accession-Nr.	Oligonucleotidsequenz (5'—3'-Orientierung)
Saplip9	N9	XM 645284	TTGTGAGTCATTTGTAGGAATAGCACTTGATTATATAACTAAAGGAGAGAGA
Saplip10 unvollständig	N10	-	ACAATGATGTTAGAATGTTGGAAATGGGAATAGAGGAGATTCGTAGATATGTTCAAGAGA
Saplip11ohne N-Terminus	01	-	AGCTGAAAGCCAAAGAGATAAATTAGCAAAAGAAACATTATATACTATTGACAATACAGA
Saplip12	02	XM 647629	ATTGCTGAACATGCACTAAAAGTAAGAGATCCTTTAACCTTTAATACTGAACAAACA
Saplip13	03	XM 649997	GCACAATGTGTAGAAATCTTGCTGCATTCTTGTTACAAAAAGTTAGAAGAGATCGTATGT
Saplip14C-Terminus	04	479.t00008	TGATCCACAAGAACTTAAAAATAAAGAAAATGTGCGTTATGTTAAAGGGATGTGATACTCT
Saplip15C-Terminus	05	XM 644284	AACTCATCGACTTATCACATGACTTACCTGCTTCTGGAAATCAACTTTGTACTTCATTAG
Saplip16C-Terminus	06	219.t00022	TACTCTGCTGCTATGAGCTTAATGGCTAATTTTGATAGTAAAGTTATTGAAACTACCCCA
Grainin1	07	XM 645280	ATATCAAGCTGATCCACTTATTCAAAGAGAATGGTGGTATCCACTTGCTACCTCAATTTC
Grainin2	08	XM 645265	GGATCTAAGAAAGTTTCAAAGAACCAATTCATTAGTACTGCTGCTTATCTTGGACAATGC
Lysozym1	09	XM 645284	TATGGTTCTAAATATTATTGGGGAAATCTCTTTGGATCATCTTACAAATATCGTTATCGA
Lysozym2	010	XM 651841	GGTATTCAGATGTTGGATCAAATAGAGCTTTCTTCCAAGAACTTATTGATACTGCCCTTG
Asm1	P1	XM 644619	CATGAAAGGGTCATTGTACCGATGGAGAACTGTTGGATTATATGATCGTAATGAAGTCCA
Asm2	P2	XM 651421	AGCAGAGTATAATGATGTTATTCTTGGAGTATTATGTGGACATTTACATACA
Asm3	P3	XM 646365	ACAGAATGACGATGCTTTATGGAGAACATTTATGCAATATTTTAAAGACTCAAGTTATAA
Asm4	P4	XM 643770	GCATTCTAATAGAACTTTACATGATATTTGGTATGAACATATGAGAGCTGATTCTCACAT
Asm5	P5	XM 650953	TGTGAAGGTAATTGTCGAAAGGATTTATTATGTTCAATTCATTGTATGAAAGAGAGTGAA
Asm6	P6	XM 646625	TGTGTAATGACTTCTAATACAGAAGAAGAAGCCCGTGCATGTGTTAAACTGATGTTATAA
Asm7	P7	XM 651814	AAACTTTGTTCAATGGAAAATATGAGAGAGTCAGGGTATGCTGAATGCATTAAGAAGTAA
Adenvlylcyclase	P8	XM 650148	ATATCTTAAACCACAAGTTGAAGCTGCACAAGGATTTGATGAAATTCTTGGGAAATGTAT
assoziiertes Protein			
G-Protein alpha UE	P9	XM 646645	GGGAGCAGTAAATGAGAAAGTATATACAAACCCAACAAATGCAACTGATGGTTCAAATAT
G-Protein beta UE	P10	XM 647655	GATGGTTATGCATTGTGTACTGGTTCATGGGATTCGACATTGAGAATTTGGGCAAATTAA
Sphingosin-1-Phosphat	01	XM 645525	GACAGGTGGATTATATTGTTCACCATCAATTCCAGGTAGTAGAGCAGGAAATAATATTGC
Lyase1deleted gene!	Ì	_	
Sphingosin-1-Phosphat Lyase2	Q2	XM_648678	GGGGAGAAGCAGCAGGATTTAATGTTCCAATATTTGATTTTAGAAATGAAGGAGTAATGA
Farnesyltransferase beta UE	Q3	XM_648349	AGACGGTGGATATAGAGATAAGCCTTCTAAAAAACCTGATTTGTACCATACTAACTA
Farnesyltransferase alpha UE	Q4	XM_644489	GAATTAGTTTTAGAATTACGTGATCGCTTAGACCTTGCTCATCAAAGTTATTGGGATTGG
Geranylgeranyltrans ferase beta UE	Q5	XM_649844	TTATGATTTTGCATTTGGTCAAATGCCAAAAAGAGAAAGTCATGGAGGATCAACATATTG
Rab- Geranylgeranyltrans	Q6	XM 650563	ACTCCAAAGGGTTGATAGTATGAGAAGTGGATATTATAAAGAACTTGAGAAAGATTTGCT
ferase alpha UE	-	_	
Rab-	Q7	XM_643143	AGTTTAATGAGGAAATATACAGATATTATTGGTGAAATTGACCCACGATTTGCTATGCCA
Geranylgeranyltransferase			
beta UE			
Ohne Namen: prenyl	Q8	XM_648341	TGCAGCAAGTAATTTTAATCATGTTATCGAAACTTCTTCAAGAGACAGTCATAAATTGGT
cysteine carboxyl			
methyltransferase2,			
putative			
Prenylcysteincarboxylmet	Q9	XM_652234	CACTACATCGAAACGTCACATCGTCAAGACCATGTATTAGTAACGAATGGAATATATCAT
hyl-			
Transferase1			

Spotposition = Position des Oligonukleotids auf dem *Microarray*

Tabelle A-3: Listen der mittels DIGE-Analysen identifizierten Proteine, die differentielle Mengen in *E. histolytica*-Zelllinie A oder Zelllinie B aufwiesen

Na-PBS-lösliche Proteinfra	Na-PBS-lösliche Proteinfraktion, pH 3-11 NL									
Proteinname	NCBI- Accession-Nr.	Protein- Accession-Nr.	tMW ^a	tpI ^b	gefunden in ^c	Peptid- Anzahl ^d	Protein- Score			
ARP 2/3 Komplex 34 kDa	gi 67469155	XP 650569	33898	9.02	2/3	7	58			
Untereinheit		_				6	81			
Fe-Hydrogenase	gi 67474180	XP 652839	56668	7.85	2/3	5	46			
		_				14	95			
Peroxiredoxin	gi 67466737	XP_649510	25773	7.83	3/3	11	136			
						13	186			
						10	136			
C2 – Domänen-Protein	gi 67479835	XP_655299	20650	7.71	3/3	6	109			
						4	107			
						2	156			
C2-Domänen-Protein	gi 67478164	XP_654499	30116	9.07	2/3	2	112			
						2	60			
Glyceraldehyd-3-Phosphat	gi 67465617	XP_648981	34974	7,04	2/3	5	105			
Dehydrogenase						10	196			
Grainin1	gi 67468717	XP_650372	24497	6.31	3/3	5	57			
						8	80			
						10	157			
Grainin 2	gi 67468658	XP_650357	24220	8.35	3/3	7	69			
						11	81			
						9	108			
Hitzeschockprotein 90	gi 67474857	XP_653162	83282	4.97	3/3	20	394			
						15	154			
						21	396			
Hypothetisches Protein	gi 67464216	XP_648503	132458	6.06	2/3	19	282			
						13	410			
Paxillin	gi 67475599	XP_653490	53067	5.17	2/3	3	77			
						10	286			
Polyadenylat-bindendes	gi 67469857	XP_650900	58751	8.63	3/3	13	237			
Protein						11	176			
						10	131			
Translations-	gi 67471927	XP_651869	48729	9.07	3/3	14	235			
Elongationsfactor EF-1 α						11	135			
						16	270			

NaPBS-lösliche Proteinfra	ktion, pH 4-7 NL						
Proteinname	NCBI- Accession-Nr.	Protein- Accession-Nr.	tMW ^a	tpI⁵	gefunden in ^c	Peptid- Anzahl ^d	Protein- Score
Cortexillin	gi 67464903	XP_648643			3/3	3 12	91 75
Hypothetisches Prtoein	gi 67462459	XP 647891	28756	7.05	3/3	10	111
	8-1					14	162 249
Rho-Familie GTPase	gi 67474492	XP_652995	21751	7.49	3/3	7 6 -	101 55
Acetyl-CoA Synthetase	gi 67481881	XP_656290	78284	5.91	3/3	28 24 26	212 202 412
Galaktokinase	gi 67465767	XP_649045	43917	6.09	3/3	10 9 -	69 55 -
Pyruvat-Phosphat Dikinase	gi 67484224	XP_657332	98578	5.89	3/3	38 22 28	425 125 197
Adenylatzyklase- assoziiertes Protein	gi 67479717	XP_655240	53762	6.32	3/3	13 19 22	89 380 193
EhABP-ähnliches Protein	gi 67484090	XP_650575	96020	4.98	3/3	9 18 14	345 97 503
14-3-3 Protein 3	gi 67478083	XP_654465	27696	4.76	3/3	7 4 5	244 217 144

Urea-lösliche Proteinfrakti	on, pH 3-11 NL						
Proteinname	NCBI- Accession-Nr.	Protein- Accession-Nr.	tMW ^a	tpI ^b	gefunden in [°]	Peptid- Anzahl ^d	Protein- Score
Hypothetisches Protein	gi 67471915	XP 651863	94263	5.45	2/3	3	95
						6	117
Grainin1	gi 67468717	XP_650372	24497	6.31	2/3	11	231
						11	228
Grainin 2	gi 67468658	XP_650357	24220	8.35	3/3	7	318
						10	192
						7	68
Dipeptidylpeptidase	gi 67480247	XP_655473	53454	5.1	2/3	5	146
						10	299
Superoxiddismutase	gi 67465285	XP_648827	22331	6.3	2/3	5	242
						7	263
C2-Domänen-Protein	gi 67478164	XP_654499			3/3	5	204
						5	155
						3	87
cdc48-ähnliches Protein	gi 67469879	XP_650911	87047	5.34	2/3	19	256
						17	218
Hypothetisches Protein	gi 67483584	XP_657012	96239	8.73	2/3	28	492
		ND (5(010	1 (200		a /a	11	127
LIM-Domänen-Protein	g1 67483283	XP_656918	16309	5.36	2/3	3	70
	167402220	ND (5(514	1100(5	0.7	2/2	3	70
PIWI-ähnliches Protein	g1 67482329	XP_656514	110265	8.7	2/3	-	90
Polyadenylat-bindendes	gi 67469857	XP 650900	59036	8.63	2/3	16	318
Protein	81	-				6	103
SH3-Domänen-Protein	gi 67465854	XP 649085	40480	5.28	1	6	56
		—				10	104
Villin	gi 67478852	XP 654808	77539	8.8	2/3	7	115
	= *	_				-	-

Urea-lösliche Proteinfraktion, pH 4-7 NL									
Proteinname	NCBI-	Protein-	tMW ^a	tpI ^b	gefunden	Peptid-	Protein-		
	Accession-Nr.	Accession-Nr.			in ^c	Anzahl ^d	Score		
Phospholipid-	gi 67483327	XP_656938	133532	5.81	3/3	7	81		
transportierende P-typ						-	-		
ATPase						-	-		
SH3-Domänen-Protein	gi 67472549	XP_652077	548101	4.8	2/3	10	218		
						-	-		

a = theoretisches Molekulargewicht des Proteins

b = Theoretischer pI des Proteins

c = drei Gele von drei biologischen Proben wurden miteinander verglichen

d = Protein-*Spots* mit identischer Regukation erfolgreich in allen drei Gelen identifiziert, MALDI-MS/MS-Analyse des entsprechenden Proteins war aber nicht erfolgreich.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei den Menschen, die mich auf unterschiedliche Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein tiefer Dank gilt:

Prof. Iris Bruchhaus, für die Betreuung meiner Arbeit, dafür dass sie immer für mich da war und ein großartiger Lehrer für mich gewesen ist.

Herrn Prof. Egbert Tannich, für die Möglichkeit und die Unterstützung dieses Projekt realisiert haben zu können.

Den Kooperationspartnern dieser Arbeit: Hendrik Schmidt und Melanie Nebendahl für die Einarbeitung in die DIGE-Technologie. Dr. Christoph Gelhaus für die von ihm durchgeführten MALDI-MS/MS-Analysen. Dr. Eberhard Krause, Heike Stephanowitz und Dr. Michael Schümann, die mich immer warmherzig und kompetent bei der Durchführung der Proteom-Analysen unterstützt und die Nano-LC-Messungen durchgeführt haben. Dr. Paul Davis für die Mithilfe der *Microarray-I*-Analyse und den anregenden Gedankenaustausch. Dr. Hannelore Lotter und Claudia Marggraff für die Durchführung der Versuche zur Induktion von ALAs im Tiermodell.

Manuela Tillack für die Einführung in die Microarray-Technologie.

Anna Bachmann für die Einführung in die Deconvolution-Technik.

Susann Ofori, Ina Hennings und Heidrun von Thien für die vielfältige Hilfe während des gesamten Projekts.

Meinen Kollegen für die schöne und einzigartige Zeit. Besonders Manuela Tillack, Anna Bachmann und Martin Helmkampf, für die unzähligen Ratschläge, das Korrekturlesen und die Unterstützung dabei, nicht vollständig den Verstand zu verlieren.

Prof. Hans-Peter Mühlbach für die Tätigkeit als Gutachter dieser Arbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Meiner Familie, die mich immer unterstützt, und mir Kraft und Vertrauen dafür gibt, meine Ideen und Wünsche zu verfolgen.

Götz dafür, meine Liebe und mein Glück zu sein.