
**Charakterisierung des Asparagin-reichen
Entamoeba histolytica Proteins „ARIEL“ und Untersuchung
hinsichtlich seiner Funktion und möglichen Bedeutung für die
Pathogenität von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Felix Asche

aus Hildesheim

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. TANNICH
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. R. D. WALTER

Tag der Disputation: 05. Dezember 2003

Hamburg, den 21. November 2003



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "A. Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> : Morphologie und Lebenszyklus	1
1.2 <i>Entamoeba dispar</i> , der molekulare Doppelgänger, ist nicht pathogen	2
1.3 Die <i>ariel</i> -Genfamilie und das Serin-reiche <i>Entamoeba histolytica</i> Protein (SREHP) ...	4
1.5 Impfstoff-Kandidaten gegen Amöbiasis.....	8
1.6 Differenzielle Diagnostik von <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i> -Infektionen.....	9
1.7 Zielsetzung	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Spezielle Geräte und Materialien	12
2.2 Reagenzien und Chemikalien	13
2.2.1 Weitere Reagenzien.....	13
2.2.2 Enzyme	14
2.2.3 Immunreagenzien und Seren	14
2.2.4 Oligonukleotide	15
2.2.5 Marker	16
2.2.6 Puffer und Lösungen (alphabetisch).....	16
2.3 Organismen und Plasmide	20
2.3.1 Organismen	20
2.3.2 Plasmide	21
2.4 Nährmedien und Kulturbedingungen	22
2.4.1 Medien und Medienzusätze	22
2.4.2 Kultivierung und Ernte von Amöben	23
2.4.3 Kultivierung weiterer Organismen	24
2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	24
2.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	24
2.5.2 Fällung von DNA	24
2.5.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	25
2.5.4 Reinigung von PCR-Amplifikaten durch "High Pure PCR Produkt Purification Kit" (Roche).....	25
2.5.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	25
2.6 Modifikation von DNA	26
2.6.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	26
2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.6.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	26
2.7 Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese.....	27

2.7.1	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.7.2	Elution von DNA aus Agarose-Gelen mit Hilfe des "CONCERT™ Rapid Gel Extraction Systems"	27
2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.9	DNA-Sequenzanalyse	28
2.10	Transformation von Bakterien	29
2.10.1	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> (XL1-blue, DH5 α , BL21DE3)	29
2.10.2	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> (dam $^-$)	29
2.10.3	Transformation von <i>E. coli</i> (XL1-blue, DH5 α , dam $^-$, One Shot® TOP 10 Competent Cells)	29
2.11	Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten speziellen Expressionsvektoren	30
2.12	Transfektion von <i>Entamoeba</i>	31
2.12.1	Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation	31
2.12.2	Transfektion der Amöben durch Elektroporation	31
2.12.3	Selektion rekombinanter Amöben nach Transfektion	32
2.13	Gewinnung von Antikörpern	32
2.13.1	Immunisierung von Hühnern und Kaninchen	32
2.13.2	Gewinnung von Antikörpern aus Hühnereiern	32
2.13.3	Gewinnung von Antiseren aus Blut	32
2.14	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
2.15	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	33
2.16	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.17	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen	34
2.17.1	Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung (IEF)	35
2.17.2	Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)	35
2.17.3	Vorbereitung der isoelektrisch fokussierten Gelstreifen für die zweite Dimension (SDS-PAGE)	35
2.17.4	SDS-PAGE nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) (zweite Dimension)	36
2.18	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	36
2.19	Proteinfärbungen	37
2.19.1	Coomassie-Färbung	37
2.19.2	Coomassie-Färbung (nach Neuhoff)	37
2.19.3	Silber-Färbung	37
2.19.4	Immunologischer Nachweis von, auf Membranen immobilisierten, spezifischen Proteinen	38
2.19.5	Wiederverwendung von Western Blots	40
2.20	Herstellung von Extrakten aus Trophozoiten	40
2.20.1	Herstellung von Extrakten aus Zellfraktionen	40

2.20.2 Herstellung von Gesamt-Zellextrakten	41
2.21 Reinigung von rekombinantem ARIEL mit Nickel-Chelat-Affinitäts- Chromatographie nach Expression in <i>E. coli</i>	41
2.22 Reinigung von ARIEL aus <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten	42
2.22.1 Fast-Protein-Liquid-Chromatographie (FPLC) von Amöbenextrakten	42
2.22.2 Affinitätschromatographische Reinigung über gekoppelte Antikörper mit Hilfe von Dynabeads®	42
2.22.3 Reinigung von ARIEL über den HisTag mit Nickel-Chelat-Affinitäts- Chromatographie.....	43
2.23 Enzymatischer Verdau von ARIEL in Extrakten und intakten Zellen.....	44
2.23.1 Verdau von ARIEL mit N-Glycosidase F in Membransolubilisaten	44
2.23.3 Verdau von ARIEL mit Phosphatidylinositolspezifischer Phospholipase C (PIPLC) in intakten Amöben mit anschließender Triton-Phasen-Separation.....	45
2.24 Chemische Abspaltung des GPI-Ankers durch saure NO ₂ -Deaminierung	46
2.25 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	46
2.26 Bestimmung der zytopathischen Aktivität (Zytopathogenitäts-Assay).....	47
2.27 Bestimmung der Erythrophagozytose-Rate.....	48
2.28 Bestimmung der Adhärenz von Amöben an CHO-Zellen	49
2.29 Bildung von Leberabszessen in Wüstenrennmäusen	49
3. Ergebnisse	51
3.1 Rekombinante Expression von ARIEL in <i>Escherichia coli</i> und Reinigung über NiNTA-Agarose	51
3.2 Untersuchungen zu immunologischen Eigenschaften von rekombinantem ARIEL....	53
3.2.1 Untersuchung zur Schutzfunktion von ARIEL gegen Amöbenleberabszesse nach Immunisierung von Wüstenrennmäusen (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	53
3.2.2 Prävalenz von Antikörpern gegen rekombinantes ARIEL in Seren von Personen mit und ohne <i>E. histolytica</i> -Infektion.....	55
3.3 Gewinnung von Antikörpern gegen rekombinantes ARIEL	56
3.4 Lokalisation von ARIEL in <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten	57
3.4.1 Lokalisation in definierten Zellextrakten	57
3.4.2 Lokalisation durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie	58
3.5 Reinigung von endogenem und rekombinantem ARIEL aus <i>E. histolytica</i> - Trophozoiten.....	59
3.6 Expression modifizierter ARIEL Varianten in <i>E. histolytica</i> und Reinigung aus Amöbenlysaten.....	63
3.6.1 Klonierung von modifizierten <i>ariel</i> -Genkopien.....	63
3.6.2 Expression der modifizierten ARIEL-Varianten in <i>E. histolytica</i>	65
3.6.3 Reinigung der HisTag-ARIEL-Varianten über NiNTA-Agarose	67

3.7 Biochemische Charakterisierung des endogenen ARIELs.....	70
3.7.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) von ARIEL.....	70
3.7.2 Untersuchung der putativen N- bzw. O-Glykosylierungen von ARIEL.....	71
3.7.3 Untersuchung der putativen GPI-Verankerung von ARIEL.....	73
3.8 Rekombinante Expression von ARIEL in <i>E. dispar</i>	75
3.9 Untersuchungen zum Einfluss der ARIEL-Expression in rekombinanten <i>E. dispar</i> ...	77
3.9.1 Adhärenz von rekombinanten <i>E. dispar</i> an CHO-Zellen.....	77
3.9.2 Zytopathogenität rekombinanter <i>E. dispar</i>	79
3.9.3 Erythrophagozytose-Rate rekombinanter <i>E. dispar</i>	79
3.9.4 Induktion von Leberabszessen nach Injektion von kultivierten Trophozoiten in die Leber von Wüstenrennmäusen.....	80
4. Diskussion	81
4.1 Mehrere ARIEL-Proteine werden in <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten exprimiert.....	81
4.2 Ähnlichkeiten von ARIEL mit bekannten Proteinen.....	82
4.3 ARIEL ist membranständig.....	83
4.4 Reinigung und posttranslationelle Modifikationen von ARIEL	86
4.5 Expression von ARIEL in <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	89
4.6 Ein Einfluss von ARIEL auf Pathogenität oder Virulenz konnte nicht nachgewiesen werden	90
4.7 ARIEL besitzt kein Impfstoff-Potenzial und eignet sich nicht als diagnostisches Antigen	92
4.8 Ausblick.....	94
5. Zusammenfassung	96
6. Literatur	98
7. Anhang.....	107
7.1 Abkürzungsverzeichnis	107
7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	109
7.3 Danksagung.....	111

1. Einleitung

Das Protozoon *Entamoeba histolytica* ist der Erreger der Amöbiasis beim Menschen. Verbreitungsgebiete sind hauptsächlich weniger entwickelte subtropische und tropische Regionen, in denen der Erreger aufgrund schlechter hygienischer Bedingungen regelmäßig fäkal-oral übertragen wird. Nach Schätzungen der WHO liegt die Zahl der weltweit infizierten Menschen bei 480 Millionen, von denen etwa 36 Millionen klinische Symptome entwickeln und 40-100.000 jährlich sterben. Amöbiasis gilt damit neben der Malaria und der Schistosomiasis als dritthäufigste durch Parasiten hervorgerufene Todesursache.

1.1 *Entamoeba histolytica*: Morphologie und Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *E. histolytica* (beschrieben in Clark et al., 2000) umfasst zwei morphologisch klar zu unterscheidende Stadien, das vegetative und das Zysten-Stadium. Die vegetativen Formen bezeichnet man als Trophozoiten. Ihre Größe reicht je nach Wachstumsbedingungen von 10-60 µm im Durchmesser. Charakteristisch ist ihr pleomorphes Erscheinungsbild, die Ausbildung von Pseudopodien und die damit verbundene amöboide Beweglichkeit. Sie haben eine hohe Phagozytose-Fähigkeit und zerstören in hohem Maße Zellen und Zellverbände, weswegen sie auch den Ruf als „die potentesten Killerzellen“ genießen. Charakteristisch ist auch das Fehlen sichtbarer klassisch-eukaryotischer Zellorganellen wie Mitochondrien, rauhem endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, Zentriolen und Mikrotubuli. Vieles weist jedoch darauf hin, dass entsprechende funktionell ähnliche aber strukturell distinkte Kompartimente im Zytoplasma existieren, da einige Gene und Proteine identifiziert wurden, die hohe Homologien zu bekannten organell-spezifischen Proteinen zeigen. Golgi-ähnliche Strukturen und glattes endoplasmatisches Retikulum wurden kürzlich elektronenmikroskopisch gezeigt (Chavez-Munguia et al., 2000). Zudem gelang der Nachweis eines Mitochondrium-ähnlichen Kompartiments, das als Crypton (Mai et al., 1999) bzw. Mitosom (Tovar et al., 1999) bezeichnet wird. Das Zytoplasma der Trophozoiten ist durch eine hohe Zahl an Vesikeln und Vakuolen mit Durchmessern von 0,5-9 µm gekennzeichnet. Unter dem Elektronenmikroskop erkennt man charakteristische helikale Anordnungen von Ribosomen. Der Zellkern hat einen Durchmesser von 4-7 µm. Trophozoiten sind die teilungsaktive Form. Sie besiedeln den Dickdarm, wo sie über bestimmte bisher unbekannte Wirtsmoleküle an die Darmschleimhaut adhären können. Der Mensch scheint der einzige bedeutende Wirt zu sein. Man vermutet, dass in 90 % der Fälle eine Infektion mit *E. histolytica* ohne klinische Symptome bleibt (nicht-invasive Amöbiasis). Die restlichen 10 % der Infizierten entwickeln unter bisher

nicht geklärten Umständen eine sogenannte invasive Amöbiasis. Dabei kommt es zu einer Invasion der Darmschleimhaut, die in den meisten Fällen Kolitis und Diarrhoen hervorruft, die Mucus und Blut enthalten können, meist begleitet von abdominalen Schmerzen. Bei ca. einem Prozent der Fälle durchdringen die Amöben die Darmschleimhaut und befallen hämatogen weitere Organe. Diese extraintestinale Amöbiasis betrifft in den meisten Fällen die Leber und es bildet sich der sogenannte Amöbenleberabszess. Symptome hierfür sind Fieber, Schmerzen im Oberbauch und Läsionen der Leber. Interessanterweise entziehen sich diese Amöben ihrem eigentlichen Lebenszyklus. Sie begeben sich sozusagen in eine „Sackgasse“, da die für eine weitere Verbreitung notwendige Umwandlung in Zysten (Enzystierung) außerhalb des Darms nicht erfolgen kann. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *E. histolytica* erst relativ kurze Zeit den Menschen parasitiert und noch nicht vollkommen adaptiert ist. Die Enzystierung wird ebenfalls durch bisher nicht geklärte Faktoren kontrolliert und erfolgt nur im Dickdarm. Die dabei entstehenden Zysten sind das eigentlich infektiöse Stadium von *E. histolytica*, da sie mit dem Stuhl ausgeschieden werden und unter schlechten hygienischen Bedingungen fäkal-oral weiter übertragen werden können. Im Unterschied zu den Trophozoiten können Zysten außerhalb des Wirts in einer feuchten Umgebung mehrere Tage überleben. Zudem sind sie säureresistent, was ihnen das Überleben im oberen Gastrointestinal-Trakt nach der oralen Aufnahme ermöglicht. Zysten sind vierkernige, dickwandige (chitinhaltige), runde Zellen mit einem Durchmesser von 10-16 µm. Lichtmikroskopisch findet man in den Zellen die charakteristischen Chromatoid-Körper, dabei handelt es sich um längliche (einige µm) Strukturen, die aus aggregierten Ribosomen bestehen. Nach Passage des oberen Gastrointestinal-Traktes erfolgt im Dünndarm die Exzystierung, wobei aus einer Zyste acht Trophozoiten entstehen. Die Faktoren, die die Exzystierung auslösen, sind noch nicht bekannt. Insgesamt ist über Zysten weit weniger bekannt als über Trophozoiten, da es bisher noch nicht gelungen ist, die Enzystierung von *E. histolytica* in Laborkulturen zu induzieren. Es gibt jedoch einen Modell-Organismus für Untersuchungen von En- und Exzystierung von *Entamoeba*. In *Entamoeba invadens*, einem Reptilien-Parasiten, lässt sich durch die Inkubation der Zellen in Glukose-Mangelmedium die Enzystierung im Labor induzieren.

1.2 *Entamoeba dispar*, der molekulare Doppelgänger, ist nicht pathogen

Die erste taxonomische Beschreibung und der Speziesname *Entamoeba histolytica* gehen zurück auf das Jahr 1903 durch Schaudinn, obwohl der Organismus bereits 1875 von Lösch erstmalig identifiziert wurde. Weitere *Entamoeba*-Spezies wurden im Laufe der Jahre entdeckt (z.B. *E. coli*, *E. gingivalis*, *E. moshkovskii*) aber keine dieser Spezies außer *E. histolytica* war jemals mit Krankheitssymptomen in Verbindung zu bringen. Allerdings wurden typische *E. histolytica*-Zysten auch bei gesunden Ausscheidern gefunden. Bereits 1925 stellte daher Emile Brumpt die

These von zwei unterschiedlichen Arten von *E. histolytica* auf, von denen sich die Eine pathogen und die Andere apathogen verhält. Die apathogene Art bezeichnete er als *Entamoeba dispar*. Da es zu diesem Zeitpunkt kein verlässliches Unterscheidungs-Kriterium gab, wurde Brumpt's Hypothese in den folgenden Jahren zunächst ignoriert. Erst ab Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts häuften sich weitere Hinweise für Brumpt's Hypothese. Insbesondere die Untersuchungen spezifischer Isoenzym-Muster mehrerer tausend Amöben-Isolate durch Sargeant und Mitarbeiter (Sargeant, 1987) ließen die Existenz einer apathogenen Spezies immer wahrscheinlicher erscheinen. Zudem fand man Unterschiede in der Antigenität pathogener und apathogener Isolate und spezifische genetische Marker (Strachan et al., 1988; Tannich et al., 1989). Basierend auf den akkumulierten Beweisen beschrieben Diamond und Clark 1993 die Spezies *E. histolytica* neu und unterschieden sie von der apathogenen Spezies *E. dispar*. Seitdem ist Brumpt's Hypothese allgemein anerkannt. Mit diesem Wissen waren viele vorausgegangene Untersuchungen und Vergleiche zwischen pathogenen und apathogenen „*E. histolytica*“ neu zu überdenken.

Innerhalb der Gattung *Entamoeba* sind *E. histolytica* und *E. dispar* die engsten Verwandten.

Die hohe Ähnlichkeit der beiden Spezies birgt natürlich Probleme bei ihrer Differenzierung, worauf unter 1.6 eingegangen wird. Gleichzeitig bietet sie aber die Möglichkeit, die wesentlichen Virulenzfaktoren besser identifizieren und untersuchen zu können und somit zum Verständnis der zugrunde liegenden Pathogenitätsmechanismen beizutragen. Daher ist die Suche nach Unterschieden zwischen den beiden Spezies besonders interessant.

Kodierende Bereiche korrespondierender DNA-Sequenzen zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* zeigen im Durchschnitt nur 6,5 % Nukleotidaustausche. Soweit es untersucht wurde, ist auch die Anordnung der Gene innerhalb der Genome beider Spezies identisch (Petri, 2002). Trotzdem sind bisher einige Unterschiede gefunden worden. Die bisher bekannten biologischen Eigenschaften, die *E. histolytica* und *E. dispar* voneinander unterscheiden, wurden von Ackers (2002) folgendermaßen zusammengefasst:

- Isoenzym-Muster (insbesondere Hexokinase)
- spezifische Epitope, die durch Reaktion mit monoklonalen Antikörpern erkannt werden
- Sequenzunterschiede im rDNA-Episom
- Sequenzunterschiede (2-18%) innerhalb homologer Gene
- eine kleine Anzahl von Genen, die nur in *E. histolytica* vorkommen, wie *ehapt2*, *cp1*, *cp5* und *ariel*
- im Gegensatz zu *E. histolytica* ließ sich *E. dispar* bisher nur in einem Fall axenisch kultivieren (Clark, 1995)

- elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen charakteristische Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit (Clark et al., 2000), die vermutlich auf das Fehlen von Lipophosphoglykanen in *E. dispar* (Bhattacharya et al., 2000) zurückzuführen sind

Gene, die in einer der beiden Arten vorkommen, in der Anderen aber fehlen, sind von Interesse, da sie grundsätzlich mit der Pathogenität verknüpft sein können. Bisher wurden nur wenige Gene identifiziert, die nur in *E. histolytica* vorkommen und in *E. dispar* fehlen. Hierzu gehört ein Retrotransposon (*ehapt2*), welches in mehreren hundert Kopien im Genom von *E. histolytica* verstreut ist (Willhoeft et al., 2002), sowie die Protein-kodierenden Gene für die Cystein-Proteinasen (CP) 1 und 5 (Bruchhaus et al., 1996; Willhoeft et al., 1999a) und die Asparagin-reichen Proteine (ARIEL).

Cystein-Proteinasen kommen als wichtige proteolytische Enzyme in hoher Menge in *E. histolytica* vor. Sie sind nachweislich wichtige Moleküle für die Pathogenität der Amöben und deshalb Ziel vieler Untersuchungen. Über die *ariel*-Genfamilie und deren Genprodukte ist bisher nur sehr wenig bekannt, sie sind daher Gegenstand dieser Arbeit und Thema des folgenden Kapitels.

1.3 Die *ariel*-Genfamilie und das Serin-reiche *Entamoeba histolytica* Protein (SREHP)

Entdeckt wurde die *ariel*-Genfamilie 1998 von Mai und Samuelson. Sie suchten in genomischen DNA-Banken nach Genen, die dem für das Serin-reiche *Entamoeba histolytica* Protein (SREHP) ähneln, denn SREHP hatte sich in den Jahren zuvor als potenzieller Impfstoff-Kandidat gegen die Amöbiasis etabliert. Dabei identifizierten sie DNA, die mit *srehp*-Sonden schwach hybridisierte. Diese DNA kodierte für ein neues Protein mit charakteristischen, zentralen *oktarepeats* und einem hohen Gehalt an Asparagin-Resten, weshalb der Name ARIEL (*asparagine-rich Entamoeba histolytica Protein*) gewählt wurde. Weitere Analysen ergaben insgesamt acht verschiedene *ariel*-Gene, von denen mindestens vier unter Kulturbedingungen exprimiert werden. Die *ariel*-Gene scheinen konstitutiv exprimiert zu werden. Das längste Gen kodiert für ein Protein mit 16 *repeats* und einem rechnerischen Molekulargewicht von 23 kDa (das kürzeste Genprodukt hat nur zwei *repeats* und ein rechnerisches Molekulargewicht von 11 kDa). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller acht *ariel*-Gene sind identisch über die 58 aminoterminalen und 29 carboxyterminalen Aminosäurereste. Sie unterscheiden sich also ausschließlich innerhalb der *repeat*-Region. Zusätzlich zu den ersten 58 Aminosäuren sind die ersten zwei *repeats* bei allen ARIELs identisch. Die 58 bzw. 29 Aminosäurereste umfassenden amino- und carboxyterminalen Sequenzabschnitte sind wiederum zu 55% bzw. 76% mit den

entsprechenden Termini von SREHP identisch. Man findet auf aminoterminaler Seite vor den *repeats* ein hydrophobes Signalpeptid und eine Reihe geladener Aminosäurereste. Der Carboxyterminus weist einen putativen hydrophoben Anker auf und es fehlt eine folgende zytoplasmatische Domäne, wie sie bei klassischen Transmembran-Motiven zu finden ist. Die *repeats* von SREHP und ARIEL (der Name ARIEL wird im weiteren zumeist im Singular verwendet obwohl jeweils die Proteine der gesamten Genfamilie gemeint sind) zeigen außerdem eine deutliche Ähnlichkeit bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung und Sequenzabfolge. Sie unterscheiden sich jedoch in der Zahl an Asparagin-Resten, die bei ARIEL deutlich höher ist. Tetrapeptide, wie sie in SREHP zu finden sind (D-N-K-P), fehlen in ARIEL, dieses Motiv ist aber mit den letzten vier Aminosäuren der *oktarepeats* von ARIEL (D/N/S-E-S-S-D/N-N-K-P) identisch. Vergleicht man die gesamten *oktarepeats* von ARIEL mit denen von SREHP (E-A-S-S-S/T-D/N-K-P) findet man Sequenzidentität in vier bis fünf Positionen (Mai und Samuelson, 1998). Ein schematischer Vergleich der abgeleiteten Primärstrukturen von ARIEL und SREHP ist in Abbildung 1 dargestellt.

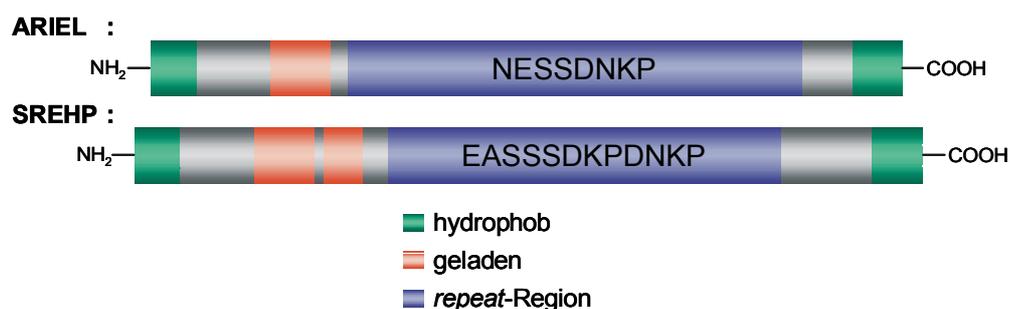


Abbildung 1: Schematischer Vergleich der Primärstrukturen von ARIEL und SREHP. Dargestellt sind Schemata der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der kodierenden Regionen von *srehp* (5 *okta*- und 6 *dodekarepeats*) und dem längsten der bisher bekannten *ariel*-Gene (16 *oktarepeats*) (verändert nach Mai und Samuelson, 1998).

Nur kurze Zeit nach der Entdeckung der *ariel*-Genfamilie durch Mai und Samuelson stießen auch Willhoeft und Mitarbeiter auf diese bemerkenswerte Genfamilie (Willhoeft et al., 1999b). Ziel ihrer Untersuchungen war es gewesen, genetische Unterschiede zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* zu finden. Zu diesem Zweck hybridisierten sie eine Auswahl verschiedener *E. histolytica*-cDNA-Sonden mit genomischer DNA beider Amöben-Spezies. Von diesen 68 Sonden hybridisierten 66 mit DNA beider Spezies. Nur zwei hybridisierten ausschließlich mit *E. histolytica*-DNA. Dazu gehörte die Sonde mit der kodierenden Region für eine Cystein-Proteinase (CP5). Die Sequenzierung der anderen Sonde ergab 95 % Identität mit der kodierenden Region eines der kurz zuvor entdeckten *ariel*-Gene.

Im Gegensatz zu *srehp* ist *ariel* ein *multicopy*-Gen. Southern-Blot-Analysen restriktionsverdauter genomischer DNA verschiedener *E. histolytica*-Stämme zeigen für *srehp* eine distinkte Bande, für *ariel* jedoch einen charakteristischen Schmier von Banden. Unter den gleichen Bedingungen

findet man beim Vergleich der DNA verschiedener *E. dispar*-Stämme zwei bzw. drei *srehp*-Banden aber kein *ariel*. Anhand durchgeführter Kreuzhybridisierungs-Versuche lässt sich mit großer Sicherheit sagen, dass kein *ariel*-Homolog mit mehr als 70 % Identität (das ist auch der ungefähre Unterschied zwischen *srehp* und *ariel*) in *E. dispar* vorhanden ist. Nicht nur die Tatsache, dass *ariel* in *E. histolytica* vorkommt aber in *E. dispar* fehlt, macht es im Sinne einer möglichen Rolle bei Gewebe-Invasion oder Überleben im Wirt interessant. Hinzu kommt die auffällige Ähnlichkeit mit SREHP, einem der am besten untersuchten Moleküle aus *E. histolytica* und potenziellsten Impfstoff-Kandidaten, was eine Untersuchung des Potenzials von ARIEL als Impfstoff-Kandidat ebenfalls vielversprechend erscheinen lässt.

Das Gen für SREHP wurde 1990 von Stanley und Mitarbeitern erstmalig kloniert. Das Ziel der damaligen Studie war die Isolierung von Genen, die spezifisch in *E. histolytica* nicht aber in der apathogenen Spezies *E. moshkovskii* (Stamm Laredo) exprimiert werden und somit möglicherweise die Pathogenität bedingen (Der Laredo-Stamm wurde in der Literatur auch lange Zeit als nicht-pathogener *E. histolytica*-Stamm bezeichnet; Clark und Diamond, 1991). Besonders auffällig waren schon damals die tandemartig angeordneten, multiplen *okta*- und *dodekarepeats*, deren Anzahl in verschiedenen Isolaten variieren kann (Stanley, 1996). SREHP ähnelte in seiner Gesamtstruktur dem Circumsporozoiten-Protein aus *Plasmodium*. 1995 konnten Stanley und Mitarbeiter das Protein aus Trophozoiten reinigen und biochemisch näher charakterisieren (Stanley et al., 1995a). Es ist primär auf der Zelloberfläche der Trophozoiten lokalisiert, hat aber posttranslationelle Modifikationen, die eigentlich bei zytoplasmatischen oder nukleären Proteinen zu finden sind. Neben den terminalen O-gebundenen N-Acetylglukosamin-Resten sind Phosphorylierungen an Serin-Resten nachgewiesen worden. SREHP ist über O-Esterbindungen acyliert und scheint nicht über einen GPI-Anker, sondern über ein mit dem Carboxyterminus kovalent verknüpftes Lipid in der Membran verankert zu sein. Antikörper gegen rekombinantes SREHP inhibieren die Adhärenz von Amöben an Säugerzellen *in vitro*. Die Adhärenz an Zielzellen ist der erste und essentielle Schritt bei der Gewebeinvasion. SREHP könnte also adhäsive Eigenschaften haben. Gereinigtes SREHP ist ein Chemoattraktant für Trophozoiten. Die Funktionen von SREHP sind jedoch noch völlig unbekannt. Natürlich erlaubt die hohe Ähnlichkeit von SREHP und ARIEL nicht automatisch Rückschlüsse auf eine ähnliche Funktion, denn es gibt auch Unterschiede, die einen Einfluss auf posttranslationelle Modifikationen haben können. ARIEL fehlen die von Stanley postulierten Phosphorylierungsstellen. Die Sequenzmotive E-X-S-S und S-X-X-D sind Bestandteile der *repeats* in SREHP. ARIEL weist dieses Motiv jedoch nur an einer Stelle auf (S-S-S-D), die im direkten carboxyterminalen Anschluss an die *repeat*-Region liegt. Im Gegensatz dazu findet man putative N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T-X) innerhalb der *repeats* von ARIEL (N-E-S-S), die in SREHP fehlen. Es sind also auch gänzlich unterschiedliche Funktionen der beiden Proteine denkbar. Weder posttranslationelle Modifikationen noch spezifische Eigenschaften von ARIEL sind bisher bekannt.

1.4 Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

Wie bereits erwähnt, ist die hohe Ähnlichkeit von *E. histolytica* und *E. dispar* hinsichtlich der Identifizierung und Analyse von Pathogenitätsfaktoren besonders interessant. Obwohl die genauen Zusammenhänge der Pathomechanismen von *E. histolytica* noch nicht geklärt sind, kennt man inzwischen mehrere Molekülfamilien, die als entscheidende Pathogenitätsfaktoren angesehen werden. Diese Faktoren findet man jedoch auch in der apathogenen Spezies *E. dispar*. Die Unterschiede der beiden Spezies innerhalb dieser Pathogenitätsfaktoren sind eher quantitativer als qualitativer Natur und somit vermutlich nicht der alleinige Grund für das pathogene Potenzial von *E. histolytica*. Die wichtigsten bekannten Pathogenitätsfaktoren sind das durch Galaktose (Gal) und N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) inhibierbare Oberflächenlektin, Amoebapores und Cystein-Proteinasen (beschrieben in Ramakrishnan und Petri, 2000; Tannich, 1998).

Das Lektin ist ein heterodimeres Glykoprotein. Es besteht aus einer großen (170 kDa) und einer von zwei möglichen kleinen Untereinheiten (31 oder 35 kDa) von denen die 31 kDa-Untereinheit über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist (McCoy et al., 1993). Das Lektin vermittelt die Adhärenz der Trophozoiten u.a. zu menschlichen Darm-Glykoproteinen, dem Darmepithel, dem Darmschleim, den Erythrozyten und einer Reihe von Zellkulturlinien sowie einigen Bakterienarten. Diese Adhärenz spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenität von *E. histolytica*, denn ohne den direkten Lektin-vermittelten Kontakt sind die Amöben nicht in der Lage Zielzellen zu töten (Ravdin et al., 1980). Ein wirtsspezifisches Rezeptormolekül ist bisher nicht gefunden worden, aber O- und N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide mit terminalen GalNAc- oder Gal-Resten sind von besonderer Bedeutung.

Die Cystein-Proteinasen der Amöben ermöglichen die Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen. Die Cystein-Proteinase-Aktivität von Trophozoiten-Extrakten korreliert direkt mit der Virulenz der Amöben. Zudem lässt sich die Bildung von Amöbenleberabszessen im Tiermodell durch spezifische Cystein-Proteinase-Inhibitoren verhindern.

Die Amoebapores sind kleine Poren-formende Peptide bestehend aus 77 Aminosäureresten. Aufgrund ihrer amphipatischen Struktur können sie an Membranen binden und inserieren. Innerhalb der Membranen lagern sie sich zu Oligomeren zusammen und bilden wassergefüllte Kanäle, durch die Ionen und kleine Moleküle passieren können. Als Folge kann die Zelle ihr inneres Milieu nicht mehr aufrecht erhalten und lysiert.

1.5 Impfstoff-Kandidaten gegen Amöbiasis

Die Verbesserung der hygienischen Bedingungen während des letzten Jahrhunderts hat die Amöbiasis in weiten Bereichen der Welt (Europa, USA, Australien und Kanada) deutlich reduziert. Ein großer Teil der Weltbevölkerung ist aber nach wie vor von diesem Parasiten betroffen. Obwohl bisher noch kein effektiver Impfstoff gegen Protozoen allgemeine Anwendung im Menschen findet, scheint die Entwicklung eines Impfstoffs gegen *E. histolytica* aufgrund folgender Punkte erreichbar. Der Lebenszyklus von *E. histolytica* hat im Gegensatz zu anderen Parasiten nur zwei Stadien, die antigenisch divers sind. *E. histolytica* hat zwar Strategien zur Überwindung des Wirts-Immunsystems entwickelt, antigene Variation -wie sie z.B. bei *Plasmodium* oder *Trypanosoma* existiert- konnte in *E. histolytica* jedoch noch nicht festgestellt werden. Hinzu kommt, dass der Mensch der einzige Wirt ist. Zwischenwirte und tierische Reservoirs fehlen, so dass durch Impfung nicht nur eine Vorbeugung der Krankheit, sondern eine Ausrottung prinzipiell möglich ist.

In verschiedenen Tiermodellen wurde schon in den siebziger Jahren gezeigt, dass Immunisierungen mit intakten Trophozoiten oder auch rohen *E. histolytica*-Zelllysaten die Bildung von Amöbenleberabszessen inhibieren können. Die erste Studie, nach der eine solche Schutzwirkung durch Immunisierung mit einem definierten Antigen aus Amöben erzielt wurde, führten Petri und Ravdin 1991 durch. Sie immunisierten Wüstenrennmäuse erfolgreich mit gereinigtem nativen Gal/GalNAc-inhibierbaren Lektin. Ein wesentlicher Nachteil bestand jedoch in der begrenzten Möglichkeit, die Antigene aus Amöben in ausreichenden Mengen für umfangreiche Immunisierungen zu gewinnen.

Da SREHP sehr immunogen ist (80 % der Patienten mit Amöbenleberabszess haben Serum-Antikörper gegen SREHP), wurden Untersuchungen hinsichtlich der Eignung einer rekombinant exprimierten Form als Impfstoff durchgeführt. Der entscheidende Vorteil des rekombinanten Proteins wäre die mögliche Gewinnung definierter und großer Mengen des Impfstoffs. Die Protektivität von Antikörpern gegen rekombinantes SREHP wurde erstmals in einer Studie von Zhang und Mitarbeitern (1994a) nachgewiesen. SCID-Mäuse wurden dazu passiv mit polyklonalem Antiserum gegen ein rekombinantes SREHP-Fusionsprotein immunisiert und erlangten dadurch einen Schutz vor Amöbenleberabszessbildung. Darüber hinaus konnten Zhang und Mitarbeiter zeigen, dass in Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*), dem Standard-Tiermodell für die Induktion von Amöbenleberabszessen, eine Protektion durch intraperitoneale und intradermale Immunisierung mit rekombinantem SREHP bewirkt werden kann (Zhang et al., 1994b). Zum Test von Verträglichkeit und Immunogenität wurden auch schon Primaten mit rekombinantem SREHP immunisiert. Dabei wurden keine auffälligen Nebenwirkungen festgestellt und die Affen entwickelten nach der ersten Auffrischungsimpunisierung signifikante anti-SREHP-Antikörper-Titer, die jedoch durch weitere Auffrischungen nicht gesteigert werden

konnten. Die Schutzwirkung konnte in diesem Tiermodell nicht ermittelt werden, da in den Affen keine Leberabszessbildung induziert werden konnte (Stanley et al., 1995b). Ein hohes Potenzial zeigt SREHP auch als oraler Impfstoff. Mit verschiedenen Systemen konnte so bereits in Tiermodellen die Bildung von mukosalen IgA- und Serum-IgG-Antikörpern induziert werden. Vorteile oraler Impfstoffe sind die einfachere und für den Patienten angenehmere Darreichung, insbesondere aber die zusätzliche Aktivierung der mukosalen Immunabwehr, die möglicherweise bereits die Besiedlung der Darmmukosa, also schon eine intestinale Amöbiasis, verhindern kann. Epitope innerhalb des SREHP-Moleküls, die von Patientenserum erkannt werden, wurden in Untersuchungen lokalisiert. Dazu wurden überlappende Oktapeptide synthetisiert, die die gesamte SREHP-Sequenz (ohne das Signalpeptid) abdecken und auf eine Reaktion mit verschiedenen Leberabszess-Patientenserum getestet. Die meisten Seren erkannten Epitope innerhalb der *repeat*-Region. Keines der Epitope wurde jedoch von allen Seren erkannt (Wang et al., 1997). Insgesamt belegen viele Immunisierungs-Studien das hohe Impfstoff-Potenzial von rekombinantem SREHP. Daher stellt sich die Frage, ob die strukturelle Ähnlichkeit von SREHP und ARIEL, insbesondere die Antigenität innerhalb der *repeat*-Region, auch ähnliche immunologische Eigenschaften widerspiegelt und ARIEL sich ebenfalls als Impfstoff-Kandidat erweist.

Nur ein Molekül, das Gal/GalNAc-inhibierbare Lektin bzw. dessen 170 kDa-Untereinheit, ist bisher immunologisch vergleichbar weit untersucht worden und zeigt ebenfalls ein hohes Potenzial zur Entwicklung eines möglichen Impfstoffs (beschrieben in Stanley, 2000).

1.6 Differenzielle Diagnostik von *E. histolytica* und *E. dispar*-Infektionen

Der endgültige Nachweis von *E. dispar* als eine eigene, morphologisch nicht von *E. histolytica* abgrenzbare Spezies hatte einen entscheidenden Einfluss auf alle Aspekte der Amöbiasis. Die WHO empfahl deshalb 1997 neue Untersuchungen zur Epidemiologie und die dazu notwendige Entwicklung von Test-Systemen zur spezifischen Diagnose von *E. histolytica* und *E. dispar*. Amöbiasis wird unabhängig von klinischen Symptomen als Infektion mit *E. histolytica* definiert. *E. dispar* besiedelt zwar auch den menschlichen Darm, gilt aber als harmloser Kommensale, weshalb eine Infektion mit diesem Organismus nicht behandelt werden muss. Die in endemischen Gebieten verbreitete Diagnose mittels mikroskopischer Untersuchungen von Stuhlproben beruht mangels morphologischer Unterschiede zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* lediglich auf der Anwesenheit vierkerniger Zysten. Geht man von Schätzungen aus, denen zufolge ca. 90 % dieser Fälle lediglich Infektionen mit *E. dispar* sind, liegt die Zahl der unnötig behandelten Personen entsprechend hoch. Die Behandlung der so ermittelten asymptomatischen Zysten-Ausscheider ist nach WHO (1997) nicht notwendig, solange eine Infektion mit *E. histolytica* nicht eindeutig

nachgewiesen werden kann oder andere Verdachtsmomente wie z.B. hohe anti-Amöben-Antikörper-Titer oder Kontakt zu anderen infizierten Personen bestehen. Trotzdem bleibt immer noch das Restrisiko einer Infektion mit dem pathogenen Erreger von 10 %, die zudem als Zysten-Ausscheider den Erreger weiterverbreiten können. Durch eine spezifische, sichere Diagnose von *E. histolytica* könnte also gezielter behandelt werden und somit Behandlungskosten, Nebenwirkungen, evtl. Entwicklung von Resistenzen oder auch potenzielle Fehlbehandlungen anderer Krankheiten vermindert werden. Für den Nachweis von *E. histolytica* in Stuhlproben asymptomatischer Zysten-Ausscheider existiert bereits eine Vielzahl an spezifischen Nachweismethoden. Dazu zählen Isoenzym-Analyse, Detektion verschiedener Antigene mit Hilfe monoklonaler Antikörper und PCR-basierte Methoden. Trotzdem besteht noch Bedarf an einer sensitiven und spezifischen Methode zur Differenzierung von *E. histolytica*, die zwecks Anwendung in den Endemie-Gebieten kostengünstig, schnell und einfach zu handhaben sein sollte, da bisher keine der Methoden diese Punkte ausreichend in sich vereint (beschrieben in Ackers, 2002).

1.7 Zielsetzung

Entamoeba histolytica und *Entamoeba dispar* repräsentieren genetisch unterschiedliche aber eng verwandte Protozoenspezies. Beide sind in der Lage, den Darm des Menschen zu besiedeln, aber nur *E. histolytica* besitzt die Fähigkeit, in das Gewebe einzudringen und Kolitis oder extraintestinale Abszesse zu verursachen. Die genauen Mechanismen, die *E. histolytica* hierzu befähigen, sind bis heute nur unzureichend verstanden. Zudem wurden die bis heute favorisierten Pathogenitätsfaktoren auch in der apathogenen Spezies *E. dispar* gefunden. Nur sehr wenige Gene, die in *E. histolytica* existieren, fehlen in *E. dispar* und sind daher von besonderem Interesse. Hierzu gehört die *ariel*-Genfamilie, über deren Genprodukte jedoch bisher noch kaum etwas bekannt ist.

Um eine Funktion von ARIEL und seine mögliche Bedeutung für die Besiedlung, Invasion und Gewebeerstörung durch *E. histolytica* zu verstehen, soll das Molekül gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Mögliche funktionelle Eigenschaften von ARIEL sollen *in vitro* untersucht werden. Dazu gehört dessen Einfluss auf die Adhärenz von Amöben an Zielzellen, die Erythrophagozytose-Rate und die Zytopathogenität, da diese Methoden besonders zur Einschätzung der Virulenz von Amöben geeignet sind. Im Tiermodell bietet sich die Möglichkeit, einen Einfluss von ARIEL auf die Virulenz bzw. Pathogenität von Trophozoiten *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck soll ARIEL durch stabile Transfektion auch in *E. dispar* exprimiert werden. Darüber hinaus soll im Tiermodell geprüft werden, ob ARIEL potenziell als Impfstoff-Kandidat zur Verhinderung der Amöbiasis geeignet ist. Die Eignung von ARIEL als Antigen zur spezifischen Detektion von *E. histolytica*-Infektionen soll im Zuge dieser Arbeit zunächst durch serologische Untersuchungen von Patientenseren eingeschätzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Spezielle Geräte und Materialien

Amersham Biosciences, Freiburg	Hofer SE 250 Mighty Small II Mini-Vertical Electrophoresis Unit, IPGphor System, IEF-Stripholder (18 cm), Hyperfilm ECL, Kodak X-Omat (XAR), MonoQ (HR5/5)
Bandelin electronic, Berlin	Sonorex Super
Becton Dickinson, USA	Zellkulturflaschen (25, 50, 250 ml)
BIORAD, München	Mini-Transilluminator, Gene Pulser™ SequiBlot™-PVDF-Membran
Branson, USA	Sonifier 250
BRL Gaithersburg, USA	Horizon™ 58 Horizontal Gel Elektrophoresis System
Carl Zeiss, Jena	Mikroskop Axioskop 2 plus
Dynal, Norwegen	Dynabeads® M-280 sheep anti-rabbit IgG Dynal Magnetic Particle Separator MPC-6
Dynex, Denkendorf	Microplate-Reader MRX II
Eurogentec, Belgien	Elektroporationsküvetten (4 mm)
Gibco BRL, Karlsruhe	CONCERT™ Rapid Gel Extraction System
Greiner Bio-One, Frickenhausen	ELISA-Platte (#655001), Verdünnungsplatte (#650101)
Heto-Holten, Dänemark	Heto Drywinner
Hybaid, Ulm	PCR Sprint, Temperature Cycling System
Improvision, Heidelberg	Omnilab-Software
Leica, Wetzlar	Mikroskop DMRB, konfokale Lasereinheit und Software TCS-NT
Millipore, USA	Sterivac™-GP10, Stericup™
MoBiTec, Göttingen	leere Säulen (2,5 und 5 ml), mit 90 µm-Filtern
Nunc, Wiesbaden	Nunclon™ Δ (24 well-plates)

Phase, Lübeck	SemiDry Blotter Pegasus (S)
Promega, Mannheim	MagneSil™ Magnetic Separation Unit
QIAGEN, Hilden	QIAprep® Spin Kit, QIAGEN-tip 2500-Säulen, Ni-NTA Superflow
Roche, Mannheim	High Pure PCR Purification Kit
Schleicher & Schuell, Dassel	OPTITRAN BA-S 83 reinforced NC, Filtrierpapier 23
Serva, Heidelberg	VISKING dialysis tubing 20/32, 16 mm

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Reagenzien und Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in einem Reinheitsgrad p.A. bezogen.

2.2.1 Weitere Reagenzien

Amersham Biosciences, Freiburg	IPG-Puffer, ECL-Plus, Immobiline DryStrip Gele, Plus One Immobiline DryStrip Cover Fluid
AppliChem, Darmstadt	Acrylamid 4K 30 % (37,5:1), Octylglucosid (<i>n</i> -Octyl- β -glucopyranosid)
Becton Dickinson, USA	Trypticase Pepton, Hefeextrakt
Biomol, Hamburg	Nitroblue Tetrazoliumchloride (NBT), 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphate toluidine salt (BCIP)
Calbiochem, Darmstadt	ASB 14
Gibco BRL, Karlsruhe	RPMI 1640-Medium (ohne Glutamin), Trypsin-EDTA (10x), Agarose
Glyko, USA	Variant Surface Glycoprotein Standards Kit
Grünenthal, Aachen	Penicillin
Hefa Pharma, Werne	Streptomycin
JRH Biosciences, USA	Diamond Vitamin Tween 80 Solution (40x)
Marabu, Tamm	Fixogum
Molecular Probes, Niederlande	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF AM)

PAA, Österreich	G418-Sulfat
Perkin Elmer, USA	"ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
Pierce, USA	BCA Protein Assay Reagent
Roche, Mannheim	ATP, Ampicillin, Tetrazyklin-Hydrochlorid
Serva, Heidelberg	Glutathion (reduziert), Coomassie R-250, Ammonium Persulfat, NaN ₃
TSI, Zeven	Sucofin Magermilchpulver
Vector Laboratories, USA	Vectashield®

2.2.2 Enzyme

Amersham Biosciences, Freiburg	Taq-Polymerase, Restriktionsenzyme,
Promega, Mannheim	T4-DNA-Ligase
Roche, Mannheim	Pwo DNA-Polymerase, N-glycosidase F, O-Glycosidase, Neuraminidase
Glyko, USA	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C

2.2.3 Immunreagenzien und Seren

Caltag Laboratories, USA:	FITC-konjugierte anti-Maus-IgG (Ziege)
DAKO A/S, Dänemark :	Peroxidase (POD)-konjugierte anti-Kaninchen-IgG (Schwein), Peroxidase (POD)-konjugierte anti-Human-IgG (Kaninchen), FITC-konjugierte anti-Kaninchen-IgG (Schwein)
Dianova, Hamburg :	alkalische Peroxidase (AP)-konjugierte anti-Kaninchen-IgG (Esel), POD-konjugierte anti-Huhn-IgY (Kaninchen), AP-konjugierte anti-Maus-IgG (Ziege), monoklonale anti-(His) ₆ -Tag-IgG (Maus), POD-konjugierte anti-Hamster-IgG (Kaninchen)

Spezifische Antikörper gegen ein Peptid aus ARIEL wurden freundlicherweise von Prof. John Samuelson (Department of Immunology and Infectious Diseases, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Antikörper gegen SREHP (monoklonal und Kaninchenserum) erhielt ich freundlicherweise von Prof. Samuel L. Stanley (Department of Molecular Microbiology, Washington University, USA). Für die Antikörper gegen das Variant-Surface-Glycoprotein (VSG, MITat 1.6) bedanke ich mich bei Prof. Peter Overath (Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen). Antikörper gegen rekombinant exprimiertes ARIEL wurden im Rahmen dieser Arbeit

am Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg) in Huhn und Kaninchen generiert. Antikörper gegen ein *trirepeat* aus ARIEL wurden von Eurogentec (Belgien) hergestellt und affinitätschromatographisch gereinigt. Den Antikörper gegen die rekombinant exprimierte 35 kDa-Untereinheit des Lektins erhielt ich freundlicherweise von Dr. Hanna Lotter (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg). Antikörper gegen Amoebapore A wurden von Prof. Matthias Leippe (Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg) bereitgestellt.

2.2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Nach Einstellen einer Konzentration von 10 μ M in Aqua ad iniectibila Braun (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) wurden sie bei -20°C gelagert. Die Sequenzen sind jeweils in der 5'-3'-Orientierung angegeben.

Oligonukleotide für die Klonierung der *ariel*-Vektoren:

ArielAS32:	CCGGATCCTTAATCAAGATTATCATAATTATC
ArielHisAS56:	CCGGATCCTTAGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGATCAA GATTATCATAATTATC
BamArielAS34:	GGGGATCCTTAGAATAAGATAACCACAATAATAG
HisAS27:	ATCATGATGATGGTGGTGATGGTGATG
HisS27:	CATCACCATCACCACCATCATCATGAT
KpnArielS33:	GGGGTACCATGTTCGCATTTTTATTATTATTG

Oligonukleotide zur Sequenzierung in pCR[®]2.1 (-TOPO):

M13R:	CAGGAAACAGCTATGAC
M13F:	GTAAAACGACGGCCAG

Oligonukleotide zur Sequenzierung von *ariel* in pNeoCass:

5'Lec85 S27:	GAAAATAAGAGAATAGAACAAGTTCTG
Ariel5'repeat S25:	GAGTCTATTCATGAAAATGACATAG

KpnArielS33 und BamArielAS34: siehe oben

2.2.5 Marker

Protein-Standards : MultiMark™ (Invitrogen, Karlsruhe)

Broad Range Prestained SDS-PAGE Standard (Biorad, München)

DNA-Standards : Gene Ruler™ 1kb Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

DNA Molecular Weight Marker II und VI (Roche, Mannheim)

2.2.6 Puffer und Lösungen

(alphabetisch)

AP-Entwicklung:

AP-Puffer (1x):

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
	pH 9,5

Der AP-Entwickler wurde durch Zugabe von 66 µl NBT-Stammlösung und 33 µl BCIP-Stammlösung zu 10 ml AP-Puffer stets frisch angesetzt

NBT-Stammlösung:

NBT	5 %(w/v)
DMF	70 %(v/v)

BCIP-Stammlösung:

BCIP	5 %(w/v)
in DMF	

BSN-Puffer (10x)

(Bjerrum-Schafer-Nielsen-Puffer)

Tris-Base	50 mM
Glycin	40 mM
SDS	0,038 %(w/v)
pH (10x)	9-9,4

Cacodylat-Puffer (1x)

Na-Cacodylat	100 mM
Saccharose	100 mM
CaCl ₂	2 mM
	pH 7,2

Chloronaphthol-Stammlösung

Chloronaphthol	3 mg/ml
in Methanol	
Lagerung bei -20°C	

Coating-Puffer

Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	0,1 M
	pH 9,5

Coomassie-Färbung:

Färbelösung:

Methanol	45 %(v/v)
Essigsäure	10 %(v/v)
Coomassie R-250	0,1 %(w/v)

Entfärbelösung:

wird wie die Färbelösung nur ohne Coomassie R-250 angesetzt

Coomassie-Färbung:

(nach Neuhoff)

G-250-Stammlösung:

Coomassie G-250	5 %(w/v)
-----------------	----------

Stammlösung:

85%ige H ₃ PO ₄	2	%(w/v)
Ammoniumsulfat	10	%(w/v)
G-250-Stammlösung	2	%(w/v)

DNA-Probenpuffer (6x):

Bromphenolblau	0,25	%(w/v)
Xylene Cyanol FF	0,25	%(w/v)
Saccharose	40	%(w/v)

Elektrophorese-Puffer (10x)

Tris-Base	0,25	M
Glycin	0,5	M
SDS	10	%(w/v)
	pH	8,6

Ligationspuffer (5x)

Tris-HCl	250	mM
MgCl ₂	50	mM
Polyethylen- glykol 8000	25	%(w/v)
DTT	5	mM
pH		7,5

Mighty-Small-Puffer:Elektrophorese-Puffer (10x):

Tris-Base	0,4	M
Glycin	2	M
SDS	1	%(w/v)
	pH	8,2

Trenngel-Puffer (4x):

Tris-Base	1,5	M
SDS	0,4	%(w/v)
	pH	8,8

Sammelgel-Puffer (4x):

Tris-Base	0,5	M
SDS	0,4	%(w/v)
	pH	6,8

NaPBS (10x)

Na ₂ HPO ₄	67	mM
NaH ₂ PO ₄	33	mM
NaCl	1,4	M
	pH (1x)	7,2

**Nickel-Chelat-Affinitäts-
Chromatographie:**Puffer A:

NaH ₂ PO ₄	100	mM
Tris-HCl	10	mM
Guanidin-HCl	6	M
	pH	8,0

Puffer B:

NaH ₂ PO ₄	100	mM
Tris-HCl	10	mM
Harnstoff	8	M

Sonication-Puffer (1x)

NaH ₂ PO ₄	50	mM
NaCl	300	mM

PBS (10x)

Na ₂ HPO ₄	570	mM
KH ₂ PO ₄	180	mM
NaCl	750	mM
	pH (1x)	7,2

PBS-A (10x)

KCl	25 mM
Na ₂ HPO ₄	45 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
NaCl	1,47 M
	pH (1x) 7,2

PBS-S

Saponin	0,05 %(w/v)
in PBS-A	

PFA-Stammlösung

Paraformaldehyd	40 %(w/v)
Das Lösen erfolgte bei 70°C durch tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH.	
Aliquots wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch bei 70°C gelöst.	

Proteinase-Inhibitor-Stammlösungen:Inhibitor-Mix (100x):

E64	1 mM
Benzamidin	640 mM

PMSF (200x):

PMSF	100 mM
in Ethanol	

Leupeptin (100x):

Leupeptin	1 mg/ml
-----------	---------

Rehydrations-Puffer (1x)

Harnstoff	8 M
Thioharnstoff	2,1 M
ad 25 ml in 20 mM Tris-Base	

CHAPS	1 g	4 %(w/v)
ASB14	0,6 g	2,4 %(w/v)
DTT	1 g	4 %(w/v)

mit der oben angegebenen Harnstoff-Lösung ad 25 ml aufnehmen und nach Zugabe von 0,5 %(v/v) Pharmalyte pH 3-10 L (125µl) aliquotieren und bei -70°C lagern

RPMI-A

HEPES	25 mM
in inkomplettem RPMI	pH 6,8

SDS-Äquibrierungs-Puffer (1x)

Tris-HCl	50 mM
Harnstoff	6 M
Glycerol	30 %(v/v)
SDS	2 %(v/v)

Bromphenolblau

Der Puffer wird in 10 ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

SDS-Probenpuffer (5x)

Tris-HCl	250 mM
SDS	10 %(w/v)
Bromphenolblau	0,5 %(w/v)
Glycerol	50 %(v/v)
	pH 6,8

Silber-Färbung:Lösung 1:

Ethanol	30 %(v/v)
Essigsäure	10 %(v/v)

Lösung 2:

Ethanol	30 %(v/v)
Na-acetat	0,5 M
Na ₂ S ₂ O ₃	0,2 %(w/v)

Lösung 3:

AgNO ₃	0,1 %(w/v)
Formaldehyd	0,02 %(w/v)

Lösung 4:

Na ₂ CO ₃	2,5 %(w/v)
Formaldehyd	0,01 %(w/v)

Lösung 5:

Na-EDTA	50 mM
---------	-------

Solubilisierungs-Puffer (1x)

Tris-HCl	50 mM
CaCl ₂	10 mM
Octylglucosid	2 %(w/v)
pH	7,4

Stripping-Puffer (1x)

Tris-HCl	62,5 mM
β-Mercaptoethanol	100 mM
SDS	2%(w/v)
pH	6,7

Substrat-Lösung (für ELISA)

1,2-Phenylendiamin	3,7 mM
Citrat	100 mM
Na ₂ HPO ₄	200 mM

TAE (10x)

Tris-Base	0,4 M
Na-acetat	50 mM
EDTA	20 mM
pH	7,9

TBS (10x)

Tris-Base	0,2 M
NaCl	1,4 M
pH	7,6

TBE (10x)

Tris-Base	0,89 mM
Borsäure	0,89 mM
EDTA	25 mM
(pH-Wert wird nicht eingestellt)	

TE-Puffer(10x)

Tris-HCl	100 mM
EDTA	5 mM
pH 8,0	

Tris-acetat-Puffer

Tris	25 mM
pH-Wert mit Eisessig eingestellt	

Zyto-Mix (1x)

KCl	120 mM
CaCl ₂	0,15 mM
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	10 mM
HEPES	25 mM
EGTA	2 mM
MgCl ₂	5 mM
pH 7,6	

(pH-Wert mit KOH einstellen)

Der Puffer wurde unmittelbar vor Gebrauch mit 2,5 mg/ml ATP und 3 mg/ml reduziertem Glutathion komplettiert.

Zytopathogenitäts-Assay:Stammlösung:

Borsäure	0,2 M
NaOH	0,1 M

Gebrauchslösung:

Stammlösung	73,6 %(v/v)
HCl (0,1 M)	26,4 %(v/v)
pH 8,8	

PBS und TBS wurde teilweise, zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen bzw. zur Verringerung unspezifischer Bindungen, mit 3-5 % (w/v) Milchpulver, gekennzeichnet mit M, und/oder mit 0,05 % (w/v) Tween 20, gekennzeichnet mit T, zugesetzt.

2.3 Organismen und Plasmide

2.3.1 Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *E. histolytica* Isolat HM1-IMSS der American Type Culture Collection (ATCC 30459) verwendet. Das *E. dispar* Isolat SAW 760, wie auch *Crithidia fasciculata* wurden freundlicherweise von P.G. Sargeant (London School of Hygiene and Tropical Medicine, GB) zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten "chinese hamster ovary"-Zellen (CHO-Zellen, Wildtyp) stammten von Prof. Freimut Leidenberger (Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung, Universität Hamburg).

Tabelle 1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme.

Tabelle 1:

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, 1983
XL1-blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17($r_k^-m_k^+$), supE44, relA1, F'[proAB, laqI^Q, lacZΔM15, Tn10 (Tc^r)]</i>	Bullock et al., 1987
One Shot Top 10 TM	<i>F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 lac X74 deoR rec A1 araD139 Δ(araleu)7697 gal U gal K rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
BL21(DE3)	<i>hsdS, gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene I)</i>	Studier und Moffatt, 1986
dam ⁻	dam ⁻	Marinus und Morris; 1973

2.3.2 Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Vektoren aufgeführt.

Tabelle 2: Klonierungsvektoren und rekombinante Plasmide

Name	Merkmale	Referenz
pCR [®] 2.1	siehe Produktbeschreibung	Invitrogen, Karlsruhe
pCR [®] 2.1-TOPO	siehe Produktbeschreibung	Invitrogen, Karlsruhe
pHisT7B	pHisT7 nach BamHI durch zusätzliche NcoI, SmaI, XhoI und die Stop-Sequenz: <u>TAAGTAAGTAA</u> modifiziert	Lotter et al., 1992
pHisT7B- <i>ariel</i>	pHisT7B, <i>ariel</i> (bp 1-67 verändert durch Kodierung für 8 Histidine, bp 612-693 fehlen)	diese Arbeit
pNeoCass	Neo ^r , 5'/3'-Aktinbereiche und Lektinpromotor aus <i>E. histolytica</i>	Wassmann et al.; 1999
pNeoAriel	s. pNeoCass, <i>ariel</i>	diese Arbeit
pNeoHisAriel	s. pNeoAriel, 8 x Histidin nach aminoterminaler Signalsequenz	diese Arbeit
pNeoArielGPI ⁻	s. pNeoAriel, ohne putative carboxyterminale GPI-Signalsequenz	diese Arbeit
pNeoArielHisGPI ⁻	s. pNeoAriel, ohne putative carboxyterminale GPI-Signalsequenz, 8 x Histidin am Carboxyterminus	diese Arbeit

2.4 Nährmedien und Kulturbedingungen

2.4.1 Medien und Medienzusätze

TY-I-S33-Medium (Diamond et al., 1978)

Trypticase	20 g
Hefeextrakt	10 g
Glukose	10 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
L-Cystein	1 g
Ascorbinsäure	0,2 g
Fe(III)-Ammoniumcitrat	22,8mg

Die Komponenten wurden in 870 ml Aqua bidest gelöst und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 6,8 eingestellt. Anschließend wurde das inkomplette Medium autoklaviert. Komplettiert wurde das Medium nach Abkühlen auf Raumtemperatur durch Zugabe von 150 ml hitze-inaktiviertem Rinderserum (2 x 56°C für jeweils 30 min), 30 ml "Diamond Vitamin Tween 80 Solution" (40x), 0,2 g Streptomycin und 2 x 10⁵ Units (U) Penicillin. Das komplette Medium wurde über einen SterivacTM-GP-10-Filter (Millipore) sterilfiltriert und bis zu 10 Tage verwendet.

RPMI-Medium

RPMI 1640-Medium (Gibco) wurde vor Verwendung durch Zugabe von 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 10 %(v/v) inaktiviertem fötalen Kälberserum komplettiert und über eine StericupTM 500 ml-Filtereinheit (Millipore) filtriert. Wurde inkomplettes RPMI-Medium in Experimenten verwendet, wurde diesem 25 mM HEPES zugesetzt, da der pH-Wert dadurch besser gepuffert wurde.

LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

Trypton	1 %(w/v)
Hefeextrakt	0,5 %(w/v)
NaCl	1 %(w/v)

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 1,5 %(w/v) Agar zugefügt.

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze aufgeführt:

Tabelle 3: Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
G418	100 mg/ml in 0,1 M HEPES, pH 7,6	10-50 µg/ml
L-Glutamin	200 mM	2 mM
IPTG	1 M 0,1 M	Expressionskultur 40 µl/Agarplatte
Maltose	20 %(w/v)	0,2 %(v/v)
Penicillin/Streptomycin (für RPMI-Medium)	10.000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	100 U/ml 100 µg/ml
Penicillin Streptomycin (für TY-I-S33-Medium)	2 x 10 ⁵ U/ml 0,2 g/ml	200 U/ml 200 µg/ml
Tetrazyklin	5 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml

2.4.2 Kultivierung und Ernte von Amöben

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden axenisch und unter sterilen Bedingungen kultiviert. Als Kulturmedium wurde, mit 15 %(v/v) Rinderserum, Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) und Vitaminmix komplettiertes TY-I-S33-Medium verwendet. Alle Isolate wurden unter mikroaerophilen Bedingungen (< 5 % O₂) und bei 37°C in Zellkulturflaschen (25, 50 und 250 ml) kultiviert.

E. dispar-Trophozoiten lassen sich hingegen nicht axenisch kultivieren. Die Kultivierung erfolgte deshalb unter monoxenischen Bedingungen mit *Crithidia fasciculata*. Ansonsten sind die Kulturbedingungen gleich, wobei die erreichbare Zelldichte der *E. dispar*-Kulturen erheblich geringer ist. Die Kultivierung von *Crithidia fasciculata* erfolgte bei Raumtemperatur in komplettem TY-I-S33-Medium ebenfalls in Zellkulturflaschen jedoch unter aeroben Bedingungen. Den *E. dispar*-Kulturen wurde *Crithidia fasciculata* (in der späten logarithmischen Wachstumsphase) in einer Konzentration von ca. 3 %(v/v) bezogen auf das Kulturvolumen zugesetzt.

Die Ernte der Trophozoiten erfolgte jeweils in der späten logarithmischen Wachstumsphase. Dazu wurde das Medium bis auf 5-10 ml dekantiert und die Kulturflasche zum Ablösen der Trophozoiten für ca. 3 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Amöben durch Zentrifugation mit 300 x g bei 4°C für 3 min sedimentiert und je nach weiterer Verwendung mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. Zellzahlen wurden mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer ermittelt.

2.4.3 Kultivierung weiterer Organismen

CHO-Zellen: CHO-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in komplettem RPMI-Medium bei 37°C unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden erfolgte durch Behandlung mit Trypsin/EDTA. Dazu wurden die Zellen bei Raumtemperatur bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen in 1x Trypsin/EDTA (Gibco BRL, Karlsruhe) inkubiert und anschließend in komplettem RPMI resuspendiert. Die Zellzahlen wurden mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer ermittelt.

E. coli: Die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium erfolgte aerob bei 37°C in Reagenzröhrchen oder Erlenmeyerkolben auf einem Rundschtüttler (150-200 Upm). Für die Stammhaltung wurde eine Kultur nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 15 %(v/v) Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

Kulturen für die rekombinante Expression von ARIEL in E. coli:

Für die rekombinante Expression von ARIEL wurde pHisT7B-*ariel* stets frisch in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Aus 10 ml-Vorkulturen der transformierten Bakterien (über Nacht bei 37°C in LB/Amp-Medium) wurde die Expressionskultur durch Beimpfen des gleichen Mediums mit 1/100 Volumen angesetzt. Nach Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 (37°C unter Schütteln) wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 3 h inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4.000 x g für 20 min sedimentiert und bei -20°C eingefroren.

2.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Protein aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese mit einem Volumen Chloroform versetzt und intensiv gemischt. Chloroform ist eine Lösung aus einem Volumen Tris-gesättigtem Phenol und einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Um die Phasen zu trennen, wurde 5 min mit 15.000 x g zentrifugiert und anschließend die obere (wässrige) Phase mit einem Ausgangsvolumen an Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und 5 min mit 15.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA aus dem Überstand wie unter dem folgenden Punkt beschrieben.

2.5.2 Fällung von DNA

Zur Entfernung von Salzen aus DNA-Lösungen und zur Konzentrierung der DNA wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2 Volumen Ethanol (absolut) gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g wird die gefällte DNA 1-2 mal mit 70%(v/v)

Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 37°C für 5-10 min getrocknet. Die getrocknete DNA kann dann in Aqua bidest oder Puffer resuspendiert werden.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Die Konzentration der wässrigen DNA-Lösungen wurde durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Im Falle doppelsträngiger DNA nimmt man bei einer optischen Dichte (OD) von 1 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml an. Die Reinheit läßt sich anhand des Verhältnisses der OD_{260nm} zur OD_{280nm} überprüfen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260nm}/OD_{280nm}-Quotienten von 1,8; eine reine RNA-Lösung von 2,0 (Sambrook et al., 1989). Zusätzlich lassen sich Konzentration und Reinheit der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese beurteilen.

2.5.4 Reinigung von PCR-Amplifikaten durch "High Pure PCR Produkt Purification Kit" (Roche)

Mit diesem Kit wurden PCR-Amplifikate gereinigt, um sie z.B. zur Ligation oder Sequenzierung weiter zu verwenden. Es werden so Proteine, Salze und insbesondere Nukleotide, Oligonukleotide und dimerisierte Oligonukleotide aus der Probe entfernt. Die amplifizierte DNA bindet dabei in Anwesenheit des chaotropen Salzes Guanidinthiocyanat selektiv an eine Glasfaser-Matrix. Sie wird gewaschen und durch 10 mM Tris, pH 8,5 eluiert. Die Reinigung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Analytische Mengen an hochreiner Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) aus 2 ml-LB/Amp-Flüssigkulturen der transformierten Bakterien gewonnen, die zuvor über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert worden waren. Als Inokulum diente eine Kolonie einer frisch kultivierten Selektionsplatte. Es wurde dabei nach dem Protokoll des Herstellers (QIAprep[®] Miniprep Handbook 10/2001; Seiten 22-23) verfahren. Das Prinzip der Reinigung beruht auf alkalischer Lyse der Bakterien, selektiver Bindung der DNA an eine Silikagel-Membran in einem Hochsalz-Puffer und Elution mit einem Niedrigsalz-Puffer.

Größere Mengen an hochreiner Plasmid-DNA wurden für die Transfektion von *Entamoeba* benötigt. Hierzu wurden QIAGEN-tip 2500-Säulen (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Reinigung beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und Bindung der DNA an eine Anionenaustauschersäule mit Elution durch Hochsalz-Puffer. Aus einer Vorkultur (siehe oben) wurden 500 µl in 500 ml LB/Amp-Medium inokuliert und 12-16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation mit 6.000 x g für 15 min bei

4°C sedimentiert. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen Plasmid Handbook 02/95; Seiten 18-19). Es folgte eine Konzentrationsmessung und Reinheitsbestimmung durch OD_{260/280nm}-Messung und eine Überprüfung der DNA durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese.

2.6 Modifikation von DNA

2.6.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Jeweils 10 µg der zu hybridisierenden einzelsträngigen Oligonukleotide wurden in einem 50 µl-Ansatz mit 1x Ligationspuffer im Heizblock für 15 min bei 70°C inkubiert. Der Hybridisierungsansatz wurde dann im ausgeschalteten Heizblock stehen gelassen bis er auf Raumtemperatur abgekühlt war und danach bei 4°C bis zur Ligation aufbewahrt.

2.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor-DNA mit zu klonierenden DNA-Fragmenten erfolgte im molaren Verhältnis von 1:3 in einem 10 µl-Ansatz. Der Ansatz enthielt ca. 20 ng Vektor-DNA und die entsprechende Menge des DNA-Fragments in 1x Ligationspuffer mit 1-2 mM ATP und 3-6 U T4-DNA-Ligase. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C nach Bolivar et al. (1977). Der Ansatz wurde anschließend bei -20°C eingefroren.

Die Ligation von PCR-Produkten mit Adenosinüberhängen in den Klonierungsvektor pCR[®]2.1 erfolgte mit dem TA-Cloning[®] Kit nach Angaben des Herstellers.

Die Ligation von PCR-Produkten mit Adenosinüberhängen in den Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO erfolgte mit dem TOPO TA-Cloning[®] Kit ebenfalls nach Angaben des Herstellers

2.6.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einem analytischen Restriktionsverdau (15 µl-Ansatz) wurden ca. 2 µg DNA mit ca. 5 U pro µg DNA für 1 h inkubiert. In präparativen Ansätzen (50 µl) wurden 20 µg DNA mit ca. 3 U pro µg DNA für 3-4 h verdaut. Es wurden für die Reaktionen die von den Herstellern mitgelieferten Puffersysteme bei den entsprechenden Temperaturen verwendet.

2.7 Auftrennung von DNA und DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung können Nukleinsäuren im elektrischen Feld für analytische oder präparative Zwecke in Agarose-Gelen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,7-2,0 % (w/v) in TBE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zu den Gelen können die DNA-Banden später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte dann bei einer Spannung von 80 V in einer Horizon™ 58 Elektrophorese-Kammer (BRL Gaithersburg, USA) in 1x TBE-Puffer. Die DNA-Banden wurden durch den Mini-Transilluminator (BIORAD, München) sichtbar gemacht und für die Dokumentation fotografiert. Die Bestimmung der Fragmentlängen erfolgte mit Hilfe eingesetzter DNA-Längenstandards.

2.7.2 Elution von DNA aus Agarose-Gelen mit Hilfe des "CONCERT™ Rapid Gel Extraction Systems"

Um DNA aus Agarose-Gelen zu isolieren, wurde das "CONCERT™ Rapid Gel Extraction System" (Gibco BRL, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wird zunächst das Gelstück mit der zu eluierenden DNA ausgeschnitten. Die Agarose wird danach durch Natrium-Perchlorat aufgelöst und die DNA an eine Silica-Membran adsorbiert. Nach Waschen wird die DNA mit TE-Puffer eluiert.

Die Agarose-Gele für anschließende DNA-Elution wurden mit TAE-Puffer anstelle von TBE-Puffer gegossen und laufen gelassen. Die Spannung wurde gegenüber normalen Agarose-Gelen um ca. 20 % reduziert.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich DNA-Abschnitte spezifisch *in vitro* amplifizieren (Saiki et al., 1988). Dabei wird ein spezifischer DNA-Abschnitt aus der so genannten *template*-DNA enzymatisch zwischen zwei Oligonukleotid-Startern, die gegenläufig an den komplementären DNA-Strängen binden, vermehrt. Da jeder neu gebildete DNA-Abschnitt im nächsten Zyklus als weitere Vorlage für die Synthese dient, erfolgt die Amplifikation exponentiell. Die drei grundlegenden Reaktionsschritte in jedem PCR-Zyklus sind: Denaturierung der DNA (Trennung der komplementären Stränge), Hybridisieren der Oligonukleotide und DNA-Synthese (Elongation). Ein 100 µl-Ansatz enthielt 100-500 pg DNA,

je 200 µM dNTPs, 5 U Taq-DNA-Polymerase, je 1 µM Oligonukleotid in 1x PCR-Puffer des Herstellers der Taq-DNA-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde mit 100 µl Mineralöl überschichtet. Für eine präzisere PCR wurde in einigen Ansätzen der Taq-DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) 1/50 Vol. einer Pwo-DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*) zugegeben werden. Diese Polymerase kann mit einer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität Fehler bei der Synthese des komplementären DNA-Stranges erkennen und beseitigen.

Der Ansatz wurde für 2-2,5 min im Thermocycler bei 94°C denaturiert. Die Amplifikation erfolgte danach über 25-35 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus der Denaturierung der DNA bei 94°C für 1 min, der Hybridisierung der Oligonukleotide für 1 min und die Elongation des DNA-Stranges für 1 min bei 72°C. Man rechnet mit einer Dauer von 1 min pro 1 Kb zu amplifizierender DNA. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide und wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$$

Für A, T, C und G wird in dieser Formel jeweils die Anzahl im Oligonukleotid eingesetzt. Die Synthese von Adenosinüberhängen zur Klonierung der PCR-Produkte in die Klonierungsvektoren pCR[®]2.1 und pCR[®]2.1-TOPO erzielt man durch einen abschließenden 15minütigen Inkubationsschritt bei 72°C.

2.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der DNA erfolgte anhand einer Variante der klassischen Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1980). Der Kettenabbruch basiert hierbei auf den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide. Für die Reaktionen wurde das "ABI PRISM[™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein 20 µl-Ansatz enthielt 1 µg hochreine DNA, 0,5 µM Oligonukleotid und 4 µl "Terminator Ready Reaction Mix". Es wurden die Oligonukleotide M13F, M13R sowie spezifische Oligonukleotide in den Reaktionen eingesetzt. Die Reaktionen verliefen über 25 Zyklen und beinhalteten folgende Schritte: 10 s 96°C, 5 s 50°C und 4 min 60°C. Der Reaktionsansatz wurde mit 80 µl Aqua bidest versetzt und einer Fällung mit 250 µl Ethanol absolut (Raumtemperatur) und 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,7 unterzogen. Nach Zentrifugation von 15 min bei 15.000 x g wird der Überstand abgesaugt und die gefällte DNA in 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 15.000 x g) wird der Überstand wieder abgesaugt, nochmals kurz zentrifugiert und restlicher Alkohol abgesaugt. Die DNA wird 10 min bei 37°C im Heizblock getrocknet und danach bei -20°C eingefroren. Die Auftrennung der DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe eines ABI PRISM[™] 377-DNA-Sequencers (Perkin Elmer, USA) durch Susan Ofori (Servicestation des BNI).

2.10 Transformation von Bakterien

2.10.1 Herstellung von kompetenten *E. coli* (XL1-blue, DH5 α , BL21DE3)

Aus einer Vorkultur (LB-Medium, 0,2%(w/v) Maltose, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin) wurden 500 μl in 50 ml LB-Medium mit 0,2%(w/v) Maltose und 10 mM MgSO_4 inokuliert. Es folgte eine Inkubation im Schüttler bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,5. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4°C, 1200 x g) sedimentiert, in dem halben Kulturvolumen (25 ml) einer eiskalten 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1/25 Kulturvolumen (2 ml) eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und so für die Transformation eingesetzt. Die kompetenten Zellen sind bei 4°C 3-4 Tage zur Transformation einsetzbar.

2.10.2 Herstellung von kompetenten *E. coli* (dam^-)

Die Herstellung erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Für die Kulturen wurde jedoch unverändertes LB-Medium verwendet und die kompetenten Bakterien wurden zuletzt in 1/10 Kulturvolumen eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert.

2.10.3 Transformation von *E. coli*

(XL1-blue, DH5 α , dam^- , One Shot[®] TOP 10 Competent Cells)

Die Transformation basierte auf einer von Cohen et al. (1972) entwickelten Methode. Dazu wurden 100 μl Suspension kompetenter Bakterien mit der zu transformierenden DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. "One Shot[®] TOP 10 Competent Cells" sind á 50 μl voraliquotiert und wurden vor Zugabe der DNA auf Eis aufgetaut. DNA wurde pro Transformationsansatz in folgenden Mengen eingesetzt: 5 μl eines normalen Ligationsansatzes, 2 μl eines TOPO-TA-Ligationsansatzes, 2,5 μl eines TA-Ligationsansatzes und 1-2 μl einer Plasmid-Mini-Präparation (2.5.5). Der Transformationsansatz wurde einem Hitzeschock von 42°C für 45-90 s ausgesetzt und danach sofort für 3 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in 900 μl vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Transformierte "One Shot[®] TOP 10 Competent Cells" wurden in 250 μl vorgewärmtem SOC-Medium (des Herstellers) 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ermöglichte das Klonierungssystem eine Blau-Weiß-Selektion, wurden vor dem Ausstreichen der Bakteriensuspension 40 μl 2 %(w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) und 45 μl 0,1 M Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) zum Ansatz pipettiert. Für die Blau-

Weiß-Selektion in transformierten "One Shot[®] TOP 10 Competent Cells" ist die Zugabe von IPTG (nach Angaben des Herstellers) nicht notwendig.

2.11 Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten speziellen Expressionsvektoren

Die *ariel*-Sequenz wurde zunächst aus genomischer *E. histolytica*-DNA durch eine PCR mit den Oligonukleotiden KpnArielS33 und BamArielAS34 amplifiziert. Es entstanden dabei Amplifikate mit einer KpnI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer BamHI-Schnittstelle am 3'-Ende. Nach Ligation dieses PCR-Ansatzes in den Klonierungsvektor pCR[®]2.1 und anschließender Transformation in *E. coli* XL1-blue wurden durch einen KpnI/BamHI-Restriktionsverdau von Plasmid-Mini-Präparationen transformierter Klone positive Klone ermittelt und zur Kontrolle sequenziert.

Für die rekombinante Expression in *E. coli* wurde durch einen Verdau mit XmnI und EcoRV ein 555 bp *ariel*-Fragment aus dem oben hergestellten Klonierungsvektor herausgeschnitten, dem am 5'-Ende 57 bp und am 3'-Ende 84 bp der vollständigen, kodierenden *ariel*-Sequenz fehlten. Das 555 bp Fragment wurde aus einem Agarose-Gel eluiert, in den (durch SmaI-Verdau) linearisierten Expressionsvektor pHisT7B ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert (pHisT7B-*ariel*).

Für die (Über)expression von ARIEL in *E. histolytica*- bzw. *E. dispar*-Trophozoiten wurde die vollständige *ariel*-Genkopie aus dem Klonierungsvektor pCR[®]2.1 durch Verdau mit KpnI und BamHI herausgeschnitten, in den durch KpnI/BamHI-Verdau linearisierten Expressionsvektor pNeoCass ligiert und in *E. coli* XL1-blue transformiert (pNeoAriel).

Dieser Vektor diente auch als Ausgangsvektor zur Konstruktion des Vektors, der für das vollständige ARIEL mit aminoterminalen HisTag kodiert (pNeoHisAriel).

Dazu wurde pNeoAriel zunächst mit EcoRV linearisiert. Die Oligonukleotide HisS27 und HisAS27 wurden hybridisiert und in den linearisierten Vektor ligiert. Nach Kontrollverdau mit KpnI/BamHI in „One Shot Top 10TM“-Zellen wurde pNeoHisAriel in *E. coli* XL1-blue transformiert.

Des Weiteren wurde ein Expressionsvektor hergestellt, der für eine ARIEL-Variante ohne die carboxyterminale putative GPI-Signalsequenz kodiert. Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden ArielAS32 und KpnArielS33 aus pNeoAriel-DNA wurde eine verkürzte *ariel*-DNA amplifiziert, die direkt stromaufwärts des Startkodons eine KpnI-Schnittstelle aufweist und deren 3'-Ende anstelle der putativen GPI-Signalsequenz ein Stopkodon mit anschließender BamHI-Schnittstelle trägt. Die PCR-Reaktion wurde auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das gewünschte Amplifikat wie unter 2.7.2 beschrieben aus dem Gel eluiert, in den Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO subkloniert und in „One Shot Top 10TM“-Zellen

transformiert. Positive Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit KpnI/BamHI identifiziert und die verkürzte *ariel*-DNA aus dem Gel eluiert. Anschließend wurde die DNA in den mit KpnI/BamHI linearisierten Expressionsvektor pNeoCass ligiert (pNeoArielGPI) und in *E. coli* DH5 α transformiert. Parallel dazu wurde ein weiteres verkürztes *ariel* hergestellt und kloniert, das sich von dem zuvor beschriebenen durch eine zusätzliche Sequenz unterscheidet, die für einen HisTag aus 8 Histidin-Resten kodiert (pNeoArielHisGPI). Diese Sequenz wurde am 3'-Ende direkt oberhalb des Stopkodons platziert. Dazu wurde in der PCR aus pNeoAriel-DNA neben KpnArielS33 das Oligonukleotid ArielHisAS56 anstelle von ArielAS32 eingesetzt, ansonsten wurde so verfahren wie zuvor beschrieben.

In den erstellten Expressionsvektoren wurde durch Sequenzierung die Richtigkeit der eingefügten kodierenden Regionen überprüft.

2.12 Transfektion von *Entamoeba*

Die Transfektion von *Entamoeba* erfolgte durch Elektroporation und basiert auf einer Methode, die von Nickel und Tannich (1994) beschrieben wurde.

2.12.1 Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation

Die Präparation von *E. histolytica* und *E. dispar* für die Elektroporation wurde nach folgendem Protokoll unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Sedimentation der Zellen erfolgte durch Zentrifugation von 3 min bei 300 x g und 4°C. Die Zellen wurden im Anschluss sofort elektroporiert.

1. Dekantieren des Mediums bis auf ca. 15 ml;
2. Ablösen der Amöben (ca. 1×10^7) vom Kulturschalenboden durch Inkubation auf Eis;
3. Waschen der Amöben in 2 x 30 ml sterilem, kaltem NaPBS;
4. Waschen in 10 ml inkomplettem "Zyto-Mix";
5. Resuspendieren der Zellen in 3,4 ml komplettem "Zyto-Mix".

2.12.2 Transfektion der Amöben durch Elektroporation

Die Transfektion durch Elektroporation beruht auf einer kurzfristigen Permeabilisierung der Zellmembran und einer daraus resultierenden erleichterten Aufnahme von DNA. In einer Elektroporationsküvette (Durchmesser: 4 mm; Eurogentec) wurden 800 μ l Amöben-Suspension, d.h. ca. $2,4 \times 10^6$ Zellen, mit 100 μ g Plasmid-DNA vermischt und bei 1,2 KV und 25 μ F zweimal hintereinander elektroporiert. Die resultierenden Zeitkonstanten sollten dabei 0,3 bis 0,4 ms

betragen. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in Kulturflaschen (50 ml) mit vorgewärmtem TY-I-S33-Medium überführt.

2.12.3 Selektion rekombinanter Amöben nach Transfektion

Die elektroporierten Amöben wurden zunächst 48 h ohne Zugabe eines Selektionsmittels bei 37°C in TY-I-S33-Medium kultiviert. Aufgrund einer plasmidkodierten Resistenz gegen Neomycin erfolgte die Selektion mit G418-Sulfat. Zunächst wurde mit einer Konzentration von 10 µg/ml G418 selektioniert. Der Selektionsdruck wurde in einem weiteren Schritt auf 50 µg/ml G418 erhöht, nachdem die Zellen sich an die erste Selektion adaptiert hatten.

2.13 Gewinnung von Antikörpern

2.13.1 Immunisierung von Hühnern und Kaninchen

Dazu wurden den Tieren je 100 µg rekombinantes ARIEL in 150 µl PBS mit 150 µl Freund's adjuvans (komplett) subcutan injiziert. Es folgten im Abstand von zwei Wochen weitere Injektionen mit der gleichen Menge an rekombinantem ARIEL jedoch in inkompletem Freund's adjuvans.

2.13.2 Gewinnung von Antikörpern aus Hühnereiern

Dazu wurde zunächst das Eigelb vom Eiweiß getrennt und mit Aqua bidest gewaschen. Pro Eigelb wurden 90 ml Aqua bidest zugegeben und mit 1 M Salzsäure ein pH-Wert zwischen 5,2 und 5,5 eingestellt. Es folgte eine Inkubation unter langsamem Rotieren bei 4°C für 6 h mit anschließender Zentrifugation bei 4°C und 10.000 x g für 25 min. Der Überstand wurde auf RT temperiert und durch Zugabe von 20 g Na₂SO₄ pro 100 ml gefällt. Es wurde weitere 20 min gerührt. Durch Zentrifugation bei RT und 1800 x g für 30 min wurden die gefällten Proteine sedimentiert, zuletzt in einem möglichst kleinen Volumen (ca. 5 ml PBS/Ei) resuspendiert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.13.3 Gewinnung von Antiseren aus Blut

Zur Gewinnung von Antiseren aus Blut wurde das abgenommene Blut für 30 min bei RT inkubiert, um zu koagulieren. Es folgte eine Zentrifugation bei 2.000 x g für 10 min. Der Überstand, das Serum, wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.14 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung von Antikörper-Titern verschiedener Seren gegen rekombinantes ARIEL eignet sich vor allem der ELISA, da er im Gegensatz zum Western-Blot aufgrund seiner spektrophotometrischen Messbarkeit besser quantifizierbare Ergebnisse liefert. Zudem lassen sich mit Hilfe von Mikrotiter-Platten besser größere Probenzahlen bearbeiten.

Für einen ELISA wurden zunächst 96 Well Mikrotiter-Platten (Greiner bio-one) mit rekombinantem ARIEL vorinkubiert. Pro Well wurden 100 µl einer 7 µg/ml ARIEL-Verdünnung in Coating-Puffer eingesetzt (700 ng Protein/well; P1: 125ng/well). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Platten wurden danach 3 mal mit PBS-T gewaschen und anschließend mit den zu testenden Seren für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Seren wurden entsprechend in 3 % M-PBS verdünnt, so dass pro Well 100 µl Seren-Verdünnung pipettiert wurde. Es folgten 3 weitere Waschschritte mit PBS-T und dann die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper 1/400 (anti-Hamster-IgG: 1/500) verdünnt in 3 % M-PBS (100 µl/well) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach 3maligem Waschen in PBS-T wurde durch Substratzugabe die Farbreaktion gestartet. Dazu wurde die Substrat-Lösung direkt vor Gebrauch mit 1/1.000 Vol. H₂O₂-Lösung (30 %_(w/v), Sigma-Aldrich) versetzt und gemischt. Von dieser Lösung wurden pro well 100 µl eingesetzt. Diese Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt, sobald die Reagenzienleerwerte eine leichte Gelbfärbung zeigten. Positive Proben zeigten eine orange Färbung, die bei 490 nm spektrophotometrisch in einem "Microplate-Reader MRX II" (Dynex) gemessen wurde.

2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde das "BCA Protein Assay Reagent" (Pierce) verwendet. Kupfer(II)-Ionen werden unter alkalischen Bedingungen durch Proteine zu Kupfer(I)-Ionen reduziert (Biuret-Reaktion). Bicinchoninsäure (BCA) reagiert hochspezifisch und sensitiv mit Kupfer(I)-Ionen und bildet ein violettes Reaktionsprodukt mit starker Absorption bei 562 nm, was eine spektrophotometrische Quantifizierung ermöglicht. Die Reagenzlösung wird zunächst aus Lösung A und Lösung B (50:1; Pierce) angesetzt. 1 ml dieser Reagenzlösung wird mit 50 µl der entsprechend verdünnten Probe versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 562 nm wird gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Mit Hilfe einer BSA-Eichgerade von 0 - 0,8 mg/ml kann die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Proteinbestimmung nach Bradford besteht vor allem in seiner größeren Toleranz gegenüber Detergenzien, wie sie zur Solubilisierung von Membranproteinen verwendet werden.

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970) erfolgte in der Gelvorrichtung "Mighty Small SE250" mit den Abmessungen 0,75 x 8 x 6,5 cm (Hoefer, Amersham Biosciences). Die Proteine werden dabei als SDS-Protein-Komplexe unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die negative Ladung, die die Komplexe durch das SDS erhalten, lassen die Auftrennung dabei unabhängig von der ursprünglichen Ladung des Proteins werden. Zudem zerstört SDS fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in Proteinen, so dass auch Konformationsunterschiede der Proteine vernachlässigt werden können. Je nach gewünschtem Trennbereich wurden 8-12 %ige Trenngele verwendet. Die Sammelgele waren stets 4 %ig. Verwendet wurden "Mighty-Small"-Trenn- bzw. Sammelgel-Puffer. Um die Polymerisation zu katalysieren, wurde 0,08 % (v/v) TEMED zugegeben. Der Start der Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,2 % (v/v) APS (Stammlösung 25 % (w/v)). Die Glasplatten wurden vor Zusammenbau mit Methanol gereinigt. Nach Giessen des Trenngels wurde es mit 20 % (v/v) Methanol überschichtet um eine ebene Geloberfläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels wurde diese Überschichtung abgegossen, das Sammelgel gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Falls nicht anders angegeben, wurden die Proben vor der Elektrophorese in SDS-Probenpuffer 3 min bei 95°C gekocht. Dem SDS-Probenpuffer wurde für detergentzhaltige Proben zusätzlich 4,8 % SDS zugegeben. Als Reduktionsmittel wurden dem Probenpuffer 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol zugesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte dann in 1x "Mighty-Small"-Elektrophorese-Puffer bei 18 mA/Gel bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte anhand der unter 2.2.5 aufgeführten Marker.

2.17 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese trennt in der so genannten ersten Dimension die Proteine eines Proteingemisches in einem immobilisierten pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Ein Protein wandert dabei in einem elektrischen Feld aufgrund seiner spezifischen Ladung bis zu einem pH-Bereich an dem seine Netto-Ladung neutral wird (dem isoelektrischen Punkt). Dort sammeln sich die Moleküle dieses Proteins, sie "fokussieren". Anschließend (in der so genannten zweiten Dimension) werden diese Proteine einer normalen SDS-PAGE unterzogen, also nach ihrer elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt. Man erhält dann bei einer guten Auftrennung der ersten und zweiten Dimension sogenannte Protein-*spots*, die einer einzigen Proteinspezies entsprechen.

2.17.1 Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung (IEF)

Mit der 2D-Gelelektrophorese wurde Membransolubilisat (0,8 % Octylglucosid) ARIEL-überexprimierender *E. histolytica*-Trophozoiten aufgetrennt. Dazu wurde das Solubilisat zunächst lyophilisiert, um es anschließend in einem entsprechenden Volumen Rehydrations-Puffer zu lösen. Es wurde IPG-Puffer des entsprechenden pH-Bereichs (Amersham Biosciences, Endkonzentration: 0,5 % (v/v)) zugegeben und im Ultraschallbad Sonorex Super (Bandelin electronic) bei 100 % und zwischen 15 und 20°C für 10 min inkubiert. Um unlösliche Bestandteile zu sedimentieren wurde 30 min bei 15.000 x g und 20°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. 400 µl Probenvolumen wurden im Gelhalter (*stripholder*) verteilt und der Gelstreifen (Immobiline DryStrip, Amersham Biosciences) mit dem Gel nach unten luftblasenfrei eingelegt. Nach 3 min Äquilibration des Gelstreifens in der Probe wurde der Ansatz vorsichtig mit 200-300 µl Cover-Fluid (Amersham Biosciences) überschichtet.

2.17.2 Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte auf einem IPGphor Isoelectric Focusing Unit (Amersham Biosciences) bei Raumtemperatur nach folgendem Protokoll:

Rehydration	2 h
30 V	10 h
500 V	1 h
1.000 V	1 h
2.000 V	1 h
4.000 V	1 h
8.000 V	10 h
100 v	5 h

Es sollten insgesamt mindestens 80.000 Vhrs erreicht werden. Die Länge der Fokussierung bei 8.000 V richtete sich nach der maximal erreichten Spannung. Falls nur eine deutlich geringere Spannung als 8.000 V während der Fokussierung (z.B. durch eine zu hohe Salzkonzentration der Probe) erreicht wurde, wurde die Zeit entsprechend verlängert. Die maximale Stromstärke betrug 50 µA pro Gelstreifen.

2.17.3 Vorbereitung der isoelektrisch fokussierten Gelstreifen für die zweite Dimension (SDS-PAGE)

Die Gelstreifen aus der ersten Dimension (2.16.2) müssen nach der isoelektrischen Fokussierung mit SDS gesättigt werden. Dazu wurden sie zunächst in Aqua bidest gespült, um das Cover Fluid

zu entfernen und für mindestens 20 min bei RT in SDS-Äquibrierungs-Puffer mit 10 mg/ml DTT inkubiert. Das DTT dient dabei der Reduktion von Disulfidbrücken. Im Anschluss hieran folgte eine Inkubation für 20 min bei RT in SDS-Äquibrierungs-Puffer mit 25 mg/ml Iodacetamid (IAA). Durch das IAA werden die Sulfhydrylgruppen, die durch die Reduktion der Disulfidbrücken entstanden sind, alkyliert und so eine Reoxidation verhindert. Die Gelstreifen wurden nochmals in Aqua bidest gespült und danach durch SDS-PAGE aufgetrennt.

2.17.4 SDS-PAGE nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) (zweite Dimension)

Die Auftrennung der Proteine nach der IEF erfolgte ebenfalls im diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970). Die Gele hatten jedoch eine Dimension von 0,175 x 18 x 18 cm. Verwendet wurde dazu die Elektrophorese-Kammer P10DS (OWL Scientific, USA). Es wurde nur ein Trenngel mit 11 % Polyacrylamid ohne Sammelgel gegossen. Die Endkonzentration an Tris betrug 375 mM (Stammlösung: 1,5 M Tris, pH 8,8) und 5 % (v/v) Glycerol in Aqua bidest. Durch Zugabe von je 0,1 % (v/v) TEMED bzw. APS (Stammlösung 40 % (w/v)) wurde die Polymerisation gestartet. Die Glasplatten wurden vor Zusammenbau mit Methanol gereinigt. Nach Giessen des Gels wurde es mit 20 % (v/v) Methanol überschichtet, um eine ebene Geloberfläche zu erhalten. Diese Überschichtung wurde vor dem Beladen des Gels wieder abgegossen. Um während der Elektrophorese eine Lauffront sichtbar zu machen und den Gelstreifen der IEF (2.16.3) zu fixieren, wurde 0,5 % (w/v) Agarose in 1x Elektrophorese-Puffer mit einer Spatelspitze Bromphenolblau aufgekocht, auf das Gel gegossen und dann zügig, vor Aushärten der Agarose, die vorbereiteten Gelstreifen auf die Geloberfläche gelegt. Es wurde 1x Elektrophorese-Puffer in die Kammer gefüllt, die Elektrophorese bei Raumtemperatur mit 10 mA/Gel gestartet und nach dem Einlaufen der Probe ins Gel bei 4°C über Nacht weitergeführt bis die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hat.

2.18 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Nach der Auftrennung von Proteinen durch die SDS-PAGE können die Proteine durch die Methode des Western-Blottings auf einer Membran immobilisiert werden. Es wurde hier ausschließlich mit der "Semi-Dry"-Blotting-Technik in der Kammer von Phase (Lübeck) gearbeitet. Als Transfer-Membranen dienten Nitrozellulose- und PVDF-Membranen. Als Transfer-Puffer wurde BSN-Puffer verwendet. In diesem Puffer wurden die verwendeten Membranen und Filterpapiere kurz äquilibriert. Die PVDF-Membran erfordert zuvor eine zusätzliche Benetzung durch Methanol. Auf der Kathodenseite der Blotapparatur wurden luftblasenfrei 3 Lagen 23-Filterpapier, das Gel, die Membran und erneut 3 Lagen Filterpapier

aufeinandergelegt. Nach Auflegen der Anodenplatte erfolgte der Transfer durch Anlegen eines Stroms von $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h bei Raumtemperatur.

Die Gele der isoelektrischen Fokussierung (18 x 18cm) wurden mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h geblottet. Zudem wurden statt 3 jeweils 10 Lagen 23-Filterpapier verwendet, um ein Austrocknen während des Transfers zu verhindern.

2.19 Proteinfärbungen

2.19.1 Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteinen mit "Coomassie Brilliant Blue" nach Weber und Osborn (1969, mod.) wurden Polyacrylamid-Gele nach der Elektrophorese für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Coomassie-Färbelösung auf einem Kippschüttler inkubiert. Darauf folgte eine Entfärbung des Hintergrundes durch Schwenken in Coomassie-Entfärbelösung mit mehrmaligem Wechsel der Lösung. Gelagert wurden die Gele bei 4°C (nach Inkubation für ca. 30 min in Aqua bidest und Einschweißen in Plastikfolie).

2.19.2 Coomassie-Färbung (nach Neuhoff)

Diese Färbung ist sensitiver als die normale Coomassie-Färbung, ermöglicht aber im Gegensatz zur Silber-Färbung eine anschließende massenspektroskopische Analyse. Das zu färbende Gel wird 30 s in Aqua bidest gewaschen und anschließend mind. 15 h in Stammlösung/Methanol (Vol: 4:1) inkubiert. Nach der Färbung wird das Gel in 25 % Methanol gewaschen und der Hintergrund in Aqua bidest entfärbt.

2.19.3 Silber-Färbung

Die Färbung von Proteinen nach dieser Methode ist weitaus empfindlicher als die Coomassie-Färbung und muss daher für Gele eingesetzt werden, auf denen Proben mit geringer Proteinkonzentration aufgetrennt wurden. Diese Färbung wurde nach Heukeshoven und Dernick (1986, mod.) durchgeführt. Die Behandlung der Polyacrylamid-Gele erfolgte unter Schwenken bei Raumtemperatur nach folgendem Protokoll:

1. 10 min Inkubation in Lösung 1;
2. 10 min Inkubation in Lösung 2;
3. mindestens 3 x 5 min in Aqua bidest waschen;
4. 10 min Inkubation in Lösung 3;
5. 5 s Waschen in Aqua bidest;

6. Entwicklung in Lösung 4 bis Proteinbanden gut sichtbar werden; Lösung unter Umständen erneuern, um Hintergrund-Färbung zu reduzieren;
7. 10 min Abstoppen der Färbereaktion mit Lösung 5.

Nach dem Abstoppen sollte das Gel mit Aqua bidest gewaschen werden. Danach kann es dokumentiert und für die Lagerung in Plastikfolie eingeschweißt werden. Die Lagerung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C.

Für die Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele der 2D-Gelelektrophorese wurden die Inkubationszeiten folgendermaßen verändert.

1.	Lösung 1	ca. 1 h
2.	Lösung 2	ca. 1 h
3.	Aqua bidest	ca. 1 h (3 x 10 min; 2 x 15 min)
4.	Lösung 3	ca. 0,5 h
5.	Aqua bidest	4 x 1 min
6.	Entwicklung	siehe oben
7	Abstoppen	mind. 10 min

2.19.4 Immunologischer Nachweis von, auf Membranen immobilisierten, spezifischen Proteinen

Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte der spezifische Nachweis von Proteinen durch die Detektion mit Antikörpern. Es wurden folgende Methoden der Visualisierung verwendet:

- Entwicklung mit Chloronaphthol (Ogata et al., 1983)
- Entwicklung mit alkalischer Phosphatase (AP) (Blake et al., 1984)
- Entwicklung mit dem ECL-Plus-System (Amersham Biosciences)

Bei der Entwicklung mit Chloronaphthol und alkalischer Phosphatase bilden die Reaktionsprodukte farbige irreversible Niederschläge auf der Membran, was die Detektion mit weiteren spezifischen Antikörpern auf derselben Membran erschwert. Zudem sind beide Färbemethoden (insbesondere die Chloronaphthol-Färbung) weniger sensitiv als das ECL-Plus-System. Bei der Detektion mit ECL-Plus läuft nach Substratzugabe eine Chemilumineszenz-Reaktion ab, die durch Exposition auf speziellen Filmen (z.B. Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) sichtbar gemacht wird. Das Protokoll der Inkubations- und Waschschrte ist für die drei Detektionsmethoden grundsätzlich gleich durchgeführt worden.

- A. Inkubation des Blots für mindestens 30 min bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) zum Blockieren freier Bindungsstellen der Membran in 5 % (w/v) M-PBS-T schwenken;

- B. Inkubation über Nacht bei 4°C (oder 1,5 h bei RT) mit spezifischem ersten Antikörper in 3 %(w/v) M-PBS-T. Anti-ARIEL-Antikörper wurden 1/2000 und anti-SREHP-Antikörper 1/5000 verdünnt (soweit nicht anders vermerkt);
- C. mindestens 3 x 10 min waschen der Membran in TBS-T;
- D. Inkubation für 1,5 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper verdünnt in 3 %(w/v) M-TBS-T nach folgender Tabelle;

Tabelle 4: Verdünnung der Sekundär-Antikörper für den spezifischen Nachweis von Proteinen auf Membranen mit unterschiedlichen Detektionsmethoden

	Chloronaphthol	ECL-Plus
anti-Kaninchen-POD-Konjugat	1/400	1/600-1/5.000
anti-Maus-POD-Konjugat	1/400	1/2.000
anti-Huhn-POD-Konjugat	1/1.000	nicht verwendet
	alkalische Phosphatase	
anti-Kaninchen-AP-Konjugat	1/2.000	
anti-Maus-AP-Konjugat	1/2.000	
anti-Huhn-AP-Konjugat	nicht verwendet	

- E. mindestens 3 x 10 min waschen der Membran in TBS-T;
- F. Entwicklung mit:
- Chloronaphthol: Schwenken der Membran in PBS mit 0,3 mg/ml Chloronaphthol (Stamm-Lösung 3 mg/ml in Methanol; Lagerung bei -20°C) und 1/1.000 Volumen H₂O₂-Lösung (30 %(w/v), Sigma-Aldrich) bis Banden sichtbar sind. Stoppen der Reaktion in PBS.
- alkalischer Phosphatase: Äquilibrieren der Membran in AP-Puffer, Schwenken der Membran in frisch angesetzter AP-Entwickler-Lösung bis Banden sichtbar werden und Abstoppen in Aqua bidest.
- ECL-Plus-System (Amersham Biosciences): Abtropfen des Puffers auf Zellstoff und Inkubation der Membran in frischem ECL-Entwickler (nach Angaben des Herstellers) für mind. 2 min bei RT, Abtropfen des Entwicklers auf Zellstoff und Exposition von Filmen für entsprechende Zeiten (1 s bis 10 min).

Nach der Entwicklung wurden die Membranen mehrfach in PBS gewaschen, getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

2.19.5 Wiederverwendung von Western Blots

Um weitere Proteine auf Membranen zu detektieren, auf denen bereits eine Nachweisreaktion stattgefunden hat, lassen sich die Antikörper der vorigen Nachweisreaktion abwaschen. Dies erfolgte nach einem Protokoll, das im Rahmen des ECL-Plus-Systems (Amersham Biosciences) Anwendung findet. Dazu wurden die Membranen in einem stark reduzierenden und denaturierenden Puffer (*stripping*-Puffer) bei hoher Temperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 70°C. Nach dieser Inkubation wurden die Membranen mindestens zweimal 10 min in großen Volumen TBS-T oder PBS-T gewaschen. Die Membranen können anschließend, wie unter 2.18.3 beschrieben, erneut verwendet werden.

2.20 Herstellung von Extrakten aus Trophozoiten

2.20.1 Herstellung von Extrakten aus Zellfraktionen

Zur Gewinnung von größeren Mengen an Extrakten aus definierten Zellfraktionen wurde folgendes Basis-Protokoll angewendet: Die Zellen wurden geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Sedimentiert wurde jeweils mit 300 x g für 3 min bei 4°C. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen bei -20°C (längere Lagerung: -70°C) eingefroren.

Gefrorene Zellsedimente wurden nach Zugabe von Proteinase-Inhibitoren (1/30 Sedimentvolumen Inhibitor-Mix-Stammlösung, 1/30 Sedimentvolumen Leupeptin-Stammlösung und 1/60 Sedimentvolumen PMSF-Stammlösung) aufgetaut, gevortext und 10 min bei RT gemischt. Danach wurde das zweifache Sedimentvolumen an kaltem PBS zugegeben und die Suspension in einem CO₂/Ethanol-Kältebad 5 min tiefgefroren. Es folgten zwei weitere Einfrier/Auftau-Zyklen unter Zugabe von je 1x Inhibitor-Mix, PMSF und Leupeptin. Diese Suspension wurde zur Sedimentation von Zellkernen und -debris bei mind. 1200 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurden in einem kleinen Volumen PBS (ca. 1/10 Volumen der Suspension) gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und zur Sedimentation der Membranen 1 h bei 4°C mit 150.000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Membranen wurden nochmal mit dem gleichen Volumen (des Überstandes der letzten Zentrifugation) PBS gewaschen und erneut 1 h bei 4°C mit 150.000 x g sedimentiert. Die so erhaltenen Membranen wurden unter Rühren im 5fachen ihres Volumens an Solubilisierungs-Puffer mit 2 %(w/v) Octylglucosid über Nacht bei 4°C solubilisiert. Vor der Solubilisierung wurden Proteinase-Inhibitoren (je 1x Inhibitor-Mix, PMSF und Leupeptin) zugegeben. Die Suspension wurde erneut einer Zentrifugation für 1 h bei 4°C mit 150.000 x g unterzogen. Durch langsame Verdünnung der Überstände mit Aqua bidest wurde eine Endkonzentration von 0,8 %(w/v) Octylglucosid eingestellt. Das Sediment wurde im selben Volumen des gleichen Puffers wie das erhaltene Membransolubilisat nach der Verdünnung (0,8 %(w/v) Octylglucosid, 20 mM Tris, 4 mM CaCl₂,

pH 7,4) resuspendiert. Alle erhaltenen Fraktionen wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren (längere Lagerung: -70°C)

2.20.2 Herstellung von Gesamt-Zellextrakten

Zur Gewinnung kleinerer analytischer Mengen an Zellextrakten kam ein vereinfachtes Protokoll von 2.19.1 zum Einsatz. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Trophozoiten in 150 µl PBS drei Einfrier/Auftau-Zyklen unter Zugabe von Proteinase-Inhibitoren (Konzentrationen wie 2.19.1) unterzogen. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 9.000 x g für 8 min zur Abtrennung von Zellkernen und Debris. Die Überstände, in denen sowohl lösliche Proteine als auch Membranproteine vorliegen, wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.21 Reinigung von rekombinantem ARIEL mit Nickel-Chelat-Affinitäts-Chromatographie nach Expression in *E. coli*

Das Prinzip dieser chromatographischen Methode beruht auf der Eigenschaft bestimmter Aminosäuren, insbesondere Histidin, als Elektronen-Donor zu fungieren und so an Metallionen, vor allem Nickel und Kupfer, zu binden (Hochuli et al., 1988). Die Metallionen sind wiederum über Nitrilotriessigsäure an ein Trägermaterial (Agarose) gebunden. Die Elution des Proteins erfolgt entweder durch eine Verringerung des pH-Wertes, was eine Protonierung der Histidin-Reste bewirkt, die dadurch nicht mehr an die Nickel Ionen binden können oder durch Einsatz von Imidazol, das als Kompetitor wirkt und ab einer Konzentration von ca. 100 mM die Histidin-Reste der Proteine aus den Histidin-Nickel-Bindungen verdrängt.

Die sedimentierten Bakterien der Expressionskultur (2.4.3) wurden in *Sonication*-Puffer pH 8,0 resuspendiert (ca. 5 ml/g Sediment) und 3 x 20 s auf Eis beschallt (Stufe 3-4, Sonifier 250, Branson, USA). Es folgte ein Zentrifugation mit 15.000 x g für 15 min. Der Überstand wurde dekantiert und mit 2,5 ml NiNTA-Superflow (Qiagen) über Nacht bei 4°C rotiert. Diese Suspension wurde auf eine Säule überführt, sedimentiert und mit *Sonication*-Puffer nach folgendem Protokoll gewaschen und eluiert:

Waschschritte:	pH 8,0	20 Säulenvolumen
	pH 6,0	20 Säulenvolumen
	pH 5,0	20 Säulenvolumen
Elution:	pH 4,5	6 x 4 Säulenvolumen
	pH 4,0	6 x 4 Säulenvolumen

Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden jeweils vereinigt, im Dialyseschlauch gegen Polyethylenglykol eingeeengt, gegen 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4 dialysiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.22 Reinigung von ARIEL aus *E. histolytica*-Trophozoiten

2.22.1 Fast-Protein-Liquid-Chromatographie (FPLC) von Amöbenextrakten

Solubilisate aus Trophozoiten-Membranen (30 mM Na-Acetatpuffer, pH 5,2 mit 0,1 bzw. 0,8 % Octylglucosid) wurden bei 4°C mit einer Flussrate von 0,5 ml/min über eine Anionenaustauscher-Säule (MonoQ HR 5/5; Amersham Biosciences) gegeben und die Säule anschließend mit dem 10fachen Säulenvolumen des gleichen Puffers gewaschen. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge betrug ca. 4 mg. Die Elution erfolgte wiederum in dem gleichen Puffer durch einen NaCl-Gradienten (0-0,5 M) über das 20fache Säulenvolumen. Es wurden Fraktionen von 0,5 ml gesammelt.

2.22.2 Affinitätschromatographische Reinigung über gekoppelte Antikörper mit Hilfe von Dynabeads®

Das Prinzip dieser Reinigung ist die spezifische Affinität vom Antikörper zum entsprechenden Antigen. An sogenannte *beads* (kleine beschichtete Eisenkugeln; \varnothing 2,8 μ m) gekoppelte spezifische Antikörper werden mit der Antigen enthaltenden Lösung inkubiert. Nach Bindung des Antigens an die *beads*-gekoppelten Antikörper und anschließender Separation (mit Hilfe eines Magneten, da die *beads* einen Eisenkern besitzen) wird der Überstand, der nur noch nicht bindende Bestandteile enthält, abgenommen. Das Antigen lässt sich, so gebunden, waschen und wieder vom Antikörper eluieren. Um zu verhindern, dass während der Elution auch die an die *beads* gekoppelten Antikörper eluiert werden, kann man diese zuvor kovalent an die *beads* binden. Dies ermöglicht zudem eine Wiederbenutzung der gekoppelten *beads*, die im folgenden als AK-*beads* bezeichnet werden.

Kopplung von Antikörpern an Dynabeads®

Verwendet wurden "Dynabeads® M-280 sheep anti-rabbit IgG" (Dyna). Die Kopplung von 30 μ g Antikörper pro 1×10^8 *beads* erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Antikörper wurden zusätzlich nach Angaben des Herstellers kovalent mit den *beads* verbunden.

Reinigung von ARIEL aus Membranextrakten von *E. histolytica*-Trophozoiten

0,8 % Octylglucosid Membransolubilisat wurden zunächst gegen 250 Volumen 20 mM Tris-HCl, 4 mM CaCl₂, pH 7,4 ohne Octylglucosid dialysiert. 200 μ l dieses Dialysats wurden mit Proteinase-Inhibitoren (je 1x Inhibitor-Mix, PMSF und Leupeptin) mit 4×10^8 AK-*beads* über Nacht bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Für ein gutes Mengenverhältnis von AK-*beads* zum Inkubationsvolumen wurde der Ansatz mit dem oben genannten Puffer auf 1 ml eingestellt. Nach Inkubation wurde der Überstand abgenommen, die AK-*beads* mit 4×1 ml des gleichen Puffers

gewaschen und das gebundene ARIEL in 400 µl 0,5 M Glycin, 150 mM NaCl, pH 2,3 eluiert. Zur sofortigen Neutralisation des Eluats wurden 80 µl 1 M Tris, pH 9,5 im Auffanggefäß vorgelegt.

2.22.3 Reinigung von ARIEL über den HisTag mit Nickel-Chelat-Affinitäts-Chromatographie

Reinigung von membrangebundenem HisTag-ARIEL

Dazu wurden Extrakte aus *E. histolytica*-Trophozoiten hergestellt, die ein membranständiges ARIEL exprimieren, das in der Nähe des N-Terminus eine Abfolge von 8 Histidin-Resten trägt. Der HisTag sollte die Reinigung dieses ARIELs über eine NiNTA-Matrix ermöglichen. Für die Herstellung der Extrakte wurden $1,9 \times 10^8$ Zellen eingesetzt, die unter einer Selektion mit 50 µg/ml G418 kultiviert worden waren. Die Herstellung des Membransolubilisats erfolgte wie unter 2.19.1 beschrieben. Der erhaltene 2 % (w/v) Octylglucosid-Extrakt (3,3 ml) wurde mit Puffer A auf eine Endkonzentration von 0,1 % (w/v) Octylglucosid verdünnt und 1 h bei RT rotiert, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Es folgte eine Zentrifugation von 15 min mit 10.000 x g bei RT, um eventuell ausgefallenes Material zu sedimentieren. Der Überstand wurde 1 h bei RT mit 1 ml NiNTA-Agarose (äquilibriert nach Angaben des Herstellers, QIAGEN) rotiert. Die Suspension wurde auf eine Säule gegeben und langsam sedimentiert. Alle Wasch- und Elutionsschritte erfolgten in Puffer B mit den entsprechend eingestellten pH-Werten nach folgendem Protokoll:

Waschschritt	pH 8,0	20 Säulenvolumen
	pH 6,3	10 Säulenvolumen
	pH 5,9	8 Säulenvolumen
Elution	pH 5,0	5 Säulenvolumen
	pH 4,5	5 Säulenvolumen

In den Fraktionen wurde durch Zugabe von 10 % (w/v) Octylglucosid in PBS eine Endkonzentration von 0,1 % (w/v) Octylglucosid eingestellt, um eine eventuelle Adhäsion der Proteine an hydrophobe Oberflächen der Gefäße zu verhindern. Die Eluate wurden durch Zugabe eines zuvor ermittelten Volumens 1 M Tris pH 11 neutralisiert. Proben des Ausgangsmaterials, Durchflusses und der ersten zwei Waschfraktionen wurden gegen das 100fache Volumen Puffer B, pH 8,0 dialysiert (Ausschlussvolumen des Dialyseschlauches 12-14 kD; Serva) um das Guanidiniumhydrochlorid zu entfernen, da es in der SDS-PAGE stört.

Reinigung von löslichem (zytoplasmatischen) HisTag-ARIEL

Diese Reinigung erfolgte nach einem etwas veränderten Protokoll der Reinigung des membrangebundenen HisTag-ARIELs (siehe oben). Dieses ARIEL wurde nicht aus Membransolubilisat gereinigt, da ihm der GPI-Anker fehlt und es daher in der löslichen Fraktion (Überstand nach der ersten 150.000 x g Zentrifugation; 2.19.1) zu finden ist. Das Verhältnis von extrahierten Zellen zum Säulenvolumen war identisch mit dem der Reinigung des membrangebundenen HisTag-ARIELs. Der Basispuffer für Bindung, Waschen und Elution war PBS mit 0,4 M NaCl und 20 mM Imidazol. Imidazol verringerte in dieser Konzentration die Bindung von unspezifischen Proteinen an die NiNTA-Matrix. Auch hier wurden die Eluate durch Zugabe eines zuvor ermittelten Volumens 1 M Tris pH 11 neutralisiert. Die Inkubation der Säulenmatrix mit der Probe betrug 1 h bei RT. Gewaschen und eluiert wurde folgendermaßen:

Waschschritt	pH 8,0	20 Säulenvolumen
	pH 6,3	100 Säulenvolumen
	pH 5,9	100 Säulenvolumen
	pH 5,6	100 Säulenvolumen
Elution	pH 4,5	15 Säulenvolumen

2.23 Enzymatischer Verdau von ARIEL in Extrakten und intakten Zellen

2.23.1 Verdau von ARIEL mit N-Glycosidase F in Membransolubilisaten

Durch den Verdau mit N-Glycosidase F werden Zuckerreste abgespalten, die über N-glykosidische Bindungen mit dem Protein verknüpft sind. Ein verdautes Glykoprotein sollte in einer SDS-PAGE ein geringeres Molekulargewicht zeigen.

Ausgangsmaterial war ein Dialysat aus Membransolubilisat (0,8 %(w/v) Octylglucosid, 20 mM Tris-HCl, 4 mM CaCl₂, pH 7,4) von *E. histolytica*-Trophozoiten. Dialysiert wurde zuvor gegen das 200fache Volumen des gleichen Puffers ohne Octylglucosid über Nacht bei 4°C (Ausschlussvolumen des Dialyseschlauches 12-14 kDa; Serva). Nach Zugabe von 40 µl einer Kontrollprotein-Stammlösung (Asialofetuin: Stammlösung 1 mg/ml) und 2 µl SDS-Stammlösung (20 %(w/v)) zu 40 µl des Dialysats wurde der Ansatz 5 min bei 95°C inkubiert. Durch diese Denaturierung lässt sich (nach Angaben des Herstellers, Roche, Mannheim) die Deglykolylierungsrate der N-Glycosidase F beträchtlich steigern. Da jedoch die N-Glycosidase F durch SDS gehemmt wird, muss während des Verdaus ein zweites Detergenz in 5-10fachem Überschuss vorliegen. Dies wurde durch Verdünnung mit 360 µl des oben genannten Puffers (mit 0,8 %(w/v) Octylglucosid) erreicht. Die so vorbereitete Probe wurde nach Zugabe von 1,6 U N-Glycosidase F für 17 bzw. 40 h bei 37°C verdaut. Nach 17 h wurden weitere 1,6 U des Enzyms

zugegeben. Die Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen ohne Enzymzugaben inkubiert.

2.23.3 Verdau von ARIEL mit Phosphatidylinositolspezifischer Phospholipase C (PIPLC) in intakten Amöben mit anschließender Triton-Phasen-Separation

Trophozoiten wurden geerntet, zweimal in kaltem PBS gewaschen und für die Ansätze in Aliquots á $2,5 \times 10^5$ Zellen durch Zentrifugation mit $300 \times g$ für 3 min bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden einmal in $200 \mu\text{l}$ 25 mM Tris-Acetat-Puffer, pH 7,4 gewaschen. Der Verdau erfolgte in diesem Puffer in einem Gesamtvolumen von $83,3 \mu\text{l}$ mit 10 U/ml PIPLC und Proteinase-Inhibitoren (je 5x Inhibitor-Mix und Leupeptin). Als internes Kontrollprotein wurden je $2 \mu\text{g}$ mf-VSG (*membraneform* Variant-Surface-Glycoprotein) zugegeben. Zusätzlich wurde eine Kontrolle des Verdaus von mf-VSG in dem oben genannten Puffer ohne Amöben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte unter leichtem Schütteln bei 37°C . Alle 5-10 min wurden sedimentierte Zellen durch leichtes Mischen wieder suspendiert.

Die Proben wurden anschließend einer Triton-Phasen-Separation unterzogen (Bordier, 1981). Dabei wird eine Probe mit Triton X-114 (Endkonzentration ca. 2 %) versetzt und gemischt. Durch Erwärmen der Lösung auf 37°C bilden sich zwei Phasen, da das Triton (oberhalb seines sogenannten Wolkenpunktes) ausfällt. In der oberen (wässrigen) Phase befinden sich nun hydrophile Proteine und in der unteren (detergenzreichen) Phase amphiphile Proteine. GPI-verankerte Proteine finden sich ebenfalls in der detergenzreichen Phase. Wurde jedoch der hydrophobe GPI-Anker entfernt (z.B. enzymatisch durch Phospholipase C-Verdau), verlieren sie an Hydrophobizität und sind somit nach einer Triton-Phasen-Separation in der wässrigen Phase wiederzufinden.

Zu den Proben wurde $1/5$ Volumen einer vorkondensierten Triton X-114 (siehe nachstehendes Protokoll) gegeben, gevortext und 5 min auf Eis unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Um für eine anschließende SDS-PAGE der erhaltenen Proben deren Volumina und Detergenzkonzentrationen anzugleichen, wurde für jede Probe ein korrespondierender Ansatz mit Puffer anstelle von Probenmaterial angefertigt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C mit anschließender Zentrifugation für 30 s mit $15.000 \times g$. Danach wurden die Phasen der Proben mit den entsprechenden Phasen der korrespondierenden Ansätze ausgetauscht, gevortext und mit einer SDS-PAGE analysiert.

Vorkondensation der Triton X-114 Stammlösung

Da Triton X-114 oft mit hydrophilen Bestandteilen verunreinigt ist, muss es vor Verwendung durch mehrere Phasen-Separations-Zyklen gereinigt werden. Das geschah nach dem entsprechenden Protokoll aus "Current Protocols in Molecular Biology, Volume 3, 17.8, 1993" (Ausubel et al., 1993).

2.24 Chemische Abspaltung des GPI-Ankers durch saure NO₂-Deaminierung

Durch die saure NO₂-Deaminierung lässt sich spezifisch die glykosidische Bindung zwischen dem nicht acetylierten Glukosamin und dem Inositol im GPI-Anker spalten, so dass der hydrophobe Phosphatidylinositol-Rest von der Peptidkette entfernt wird.

Membransolubilisate (0,8 %(w/v) Octylglucosid) wurden nach Zugabe der Proteinase-Inhibitoren (je 1x Inhibitor-Mix, PMSF und Leupeptin) mit 1 Volumen 200 mM Na-Acetat, pH 3,5 versetzt. Durch Zugabe von 2 Volumen 0,5 M NaNO₂ bzw. 0,5 M NaCl (als Kontrollen) wurde die chemische Deaminierung gestartet und bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 50 µl-Proben entnommen und mit 27 µl 1 M Tris pH 11 neutralisiert, um die Reaktion zu stoppen.

2.25 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie können Proteine innerhalb von Zellen oder auf deren Oberfläche durch Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper lokalisiert werden. Trophozoiten von *E. histolytica* und *E. dispar* (ca. 3×10^5 pro Ansatz) wurden geerntet und mit PBS-A gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden jeweils in Volumina von 1 ml/Ansatz durchgeführt (Das Inkubationsvolumen des ersten Antikörpers wurde bei Bedarf auf 0,5 ml/Ansatz herabgesetzt). Die Behandlung der Zellen erfolgte nach dem aufgeführten Protokoll bei RT. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 3-4 min bei 300 x g durchgeführt. Die Inkubationsschritte erfolgten auf einem Rotationsschüttler.

1. Fixierung der Zellen in 3 %(v/v) Paraformaldehyd (Stamm-Lösung: 40 %(w/v)) in Cacodylat-Puffer für 1 h bei RT;
2. Waschen der Zellen in PBS-S;
3. Absättigung von Aldehyden für 15 min in 50 mM NH₄Cl in PBS-S;
4. Waschen der Zellen in PBS-S;
5. Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 2 %(v/v) fötalem Kälberserum in PBS-S für 10 min;
6. Inkubation mit dem entsprechenden ersten Antikörper verdünnt in PBS-S für 1 h;
7. 3 mal Waschen in PBS;
8. Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper, folgendermaßen verdünnt in PBS-S mit 1 %(w/v) BSA:
anti-Kaninchen-FITC-Konjugat 1/400,
anti-Maus-FITC-Konjugat 1/200;

9. 3 mal Waschen der Zellen in PBS (dem letzten Waschschrift wurde gegen Bakterienbewuchs 0,05 %_(w/v) Na-Azid zugegeben);
10. Die Zellen wurden je nach Sedimentgröße in einem kleinen Volumen (ca. 30 µl) PBS mit 0,05 %_(w/v) Na-Azid und einem kleinen Tropfen Vectashield[®] (Vector Laboratories) resuspendiert und 12 µl der Suspension auf einen Objektträger pipettiert. Vectashield[®] dient der Reduktion des Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe während des Mikroskopierens. Nach Auflegen des Deckgläschens (24 x 36 mm) wurden die Ränder mit Fixogum (Marabu) abgedichtet und die Präparate bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Proben wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Leica DMRB, der angeschlossenen konfokalen Lasereinheit TCS-NT (Leica) und der dazugehörigen Software oder mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop 2 Plus (Carl Zeiss) und der OmniLab Software (Improvision) analysiert.

Für die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Amöben mit intakter Zellmembran wurde das gleiche Protokoll unter Verwendung von PBS-A anstelle von PBS-S angewendet.

2.26 Bestimmung der zytopathischen Aktivität (Zytopathogenitäts-Assay)

Anhand des Ausmaßes der Zerstörung eines CHO-Zellrasens wurde die zytopathische Aktivität von *E. dispar* bestimmt. Die Zerstörung des CHO-Zellrasens durch *E. dispar*-Trophozoiten wurde nach einer modifizierten Methode von Bracha und Mirelman (1984) durchgeführt. 48 h vor Versuchsbeginn wurden jeweils 1×10^5 CHO-Zellen in 24 Well-Zellkulturplatten (Nunc) ausgesät. Ebenfalls 48 h vor Versuchs-Beginn wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Amöben in eine Zellkulturflasche (250 ml) eingesät. *E. dispar*-Trophozoiten wurden für diesen Zeitraum mit und ohne *Crithidia fasciculata* kultiviert. Der Versuch wurde dann nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Die CHO-Zellen wurden mit 1 ml warmem inkompletten RPMI-Medium (RPMI-i) gewaschen und in 500 µl RPMI-i während der Vorbereitung der Amöben bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert;
2. Amöben wurden geerntet, einmal mit 14 ml warmem inkompletten TY-I-S33 (TY-i) gewaschen und in 1,1 ml desgleichen Mediums resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit TY-i auf $0,333 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt;
3. Das Medium der CHO-Zellen wurde gegen warmes RPMI-i gewechselt;
4. Zu den CHO-Zellen wurden je 300 µl der Amöbensuspension (1×10^5 Zellen) gegeben;
5. Inkubation für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂;
6. Ablösen der Amöben durch Inkubation für 20 min auf Eis;

7. Waschen der CHO-Zellen mit 2 x 2 ml kaltem RPMI-i;
8. Fixierung der verbliebenen CHO-Zellen durch Inkubation für 10 min bei RT in 1 ml 4 %_(w/v) Formaldehyd in PBS (Lösung frisch ansetzen);
9. Waschen mit 1 ml PBS;
10. Färbung der Zellen für 10 min bei RT in 0,5 ml 0,1 %_(w/v) Methylenblau in CHO-Gebrauchslösung;
11. 3 mal Waschen in 1:10 verdünnter CHO-Gebrauchslösung;
12. Lysieren der Zellen in 1 ml 0,1 M Salzsäure und Inkubation für 30 min bei 37°C;
13. Messung des freigesetzten Methylenblaus anhand der Absorption bei 660 nm.

Die Methylenblaufärbung ist proportional zum Anteil der verbliebenen adhärennten CHO-Zellen. Als Kontrollen dienten CHO-Zellen, die ohne Trophozoiten inkubiert wurden (0% Zellrasenzerstörung).

2.27 Bestimmung der Erythrophagozytose-Rate

Mit Hilfe von Erythrozyten lässt sich die Phagozytose-Rate von Amöben quantitativ bestimmen (Trissl et al., 1978; Mora-Galindo et al., 1997). Für die Versuche wurden 48 h vor Versuchsbeginn je $2,5 \times 10^5$ *E. dispar*-Trophozoiten pro 250 ml-Zellkulturflasche mit *Crithidia fasciculata* eingesäht.

Frische Erythrozyten (Blutgruppe 0, Rhesus positiv) wurden dreimal mit dem 7-fachen Volumen inkomplettem TY-I-S33 (TY-i) gewaschen, jeweils mit $2.000 \times g$ für 3 min sedimentiert und auf 5×10^8 Zellen/ml in TY-i eingestellt. Die Amöben wurden geerntet, zweimal in 12,5 ml kaltem TY-i (pro Kulturflasche) gewaschen und auf $5,6 \times 10^5$ Zellen/ml in TY-i eingestellt. Von dieser Verdünnung wurden 360 µl pro Ansatz (2×10^5 Zellen) in einem Inkubationsgefäß vorgelegt und auf Eis inkubiert. Vor Zugabe von je 40 µl Erythrozyten-Verdünnung (2×10^7 Zellen) wurden die Amöben bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Die Inkubation der Erythrozyten mit den Amöben (100:1) erfolgte nach Mischen im Wasserbad bei 37°C für unterschiedliche Zeitintervalle. Abgestoppt wurde die Phagozytose durch Zugabe von 10 ml Aqua bidest, was eine Osmolyse der nicht phagozytierten Erythrozyten bewirkt. Die Amöben wurden mit $350 \times g$ für 3 min bei RT sedimentiert und mit 2 ml NaPBS gewaschen. Es folgte ein Zentrifugation mit $600 \times g$ für 2-3 min und zügiges Absaugen der Überstände. Die Amöben wurden zuletzt in 1 ml 90 %_(v/v) Ameisensäure lysiert, wodurch das Hämoglobin der phagozytierten Erythrozyten freigesetzt wurde. Die relative Menge an Hämoglobin wurde quantifiziert, indem die Absorption der Proben bei 397 nm photometrisch gegen einen Reagenzienleerwert gemessen wurde. Die gemessenen Werte der Proben wurden gegen die Werte zum Zeitpunkt 0 korrigiert. Als Kontrollen dienten Amöben, die ohne Erythrozyten inkubiert worden waren.

2.28 Bestimmung der Adhärenz von Amöben an CHO-Zellen

Um festzustellen, ob ARIEL als Membranprotein einen Einfluss auf die Adhärenz an Zielzellen hat, wurde die Adhärenz von Trophozoiten an CHO-Zellen bestimmt. Basierend auf ein Protokoll von Ravdin und Guerrant (1981) wurden die Versuche folgendermaßen durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten mit 300 x g für 3 min. CHO-Zellen sowie Amöben wurden hierfür während der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet. *E. dispar*-Trophozoiten wurden 12 h vor Versuchsbeginn ohne *Crithidia fasciculata* kultiviert. Die CHO-Zellen wurden durch Trypsinierung vom Kulturflaschenboden abgelöst, in frischem RPMI-Medium (ca. 10 ml pro 250 ml-Kulturflasche) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die CHO-Zellen wurden dann während der Vorbereitung der Amöben bei RT mit gelegentlichem leichtem Mischen stehen gelassen, um nach der Trypsinbehandlung ca. 1 h zu regenerieren bevor der Versuch gestartet wird. Direkt vor Versuchsbeginn wurde dann ein Aliquot dieser Suspension durch Zentrifugation sedimentiert und in einem entsprechenden Volumen RPMI-A mit 0,5 % (w/v) BSA resuspendiert, so dass eine Zellzahl von 8×10^5 Zellen/ml eingestellt wurde. Die Amöben wurden geerntet, einmal in ca. 3 ml (pro 250 ml-Kulturflasche) RPMI-A mit 0,5 % (w/v) BSA gewaschen und in 1 ml RPMI-A mit 0,5 % (w/v) BSA + 1,5 µl BCECF AM-Stammlösung (nach Angaben des Herstellers, Molecular Probes) für 15 min bei 37°C im Wasserbad unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Färbung der Amöben mit diesem Fluoreszenzfarbstoff ist einerseits ein Nachweis für deren Viabilität, da durch intrazelluläre Esterasen BCECF gebildet wird (BCECF ist durch ein breites ultraviolettes Spektrum anregbar und emittiert sichtbares grünes Licht von ca. 535 nm). Gleichzeitig dient diese Markierung der besseren Unterscheidung zwischen Amöben und CHO-Zellen während des Mikroskopierens. Danach wurden die Amöben einmal mit 2,5 ml und einmal mit 1,5 ml kaltem RPMI-A gewaschen und die Zellzahl auf 4×10^4 Zellen/ml eingestellt. Von den vorbereiteten Zellsuspensionen der CHO-Zellen und der Amöben wurden je 500 µl zusammen gegeben, gemischt und durch Zentrifugation mit nur 120 x g für 2 min sedimentiert. Dieser Ansatz wurde 2 h auf Eis inkubiert damit die Zellen adhären können, die Amöben jedoch die CHO-Zellen nicht lysieren. 900 µl des Überstands wurden abgenommen, der Rest sehr vorsichtig resuspendiert, ein Aliquot auf einen Objektträger gegeben und die Amöben mit den adhärenen CHO-Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMRB, Leica, Wetzlar) ausgezählt.

2.29 Bildung von Leberabszessen in Wüstenrennmäusen

Die Fähigkeit von Amöben, Leberabszesse zu verursachen, kann nur in einem Tiermodell untersucht werden. Dazu wurden Amöben, wie von Lotter et al. (1997) beschrieben, in die Lebern von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) injiziert. Dies wurde freundlicherweise von Dr. Hanna Lotter (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) durchgeführt.

E. dispar-Trophozoiten wurden geerntet, zweimal mit inkompletem TY-I-S33-Medium (TY-i) gewaschen und wieder in TY-i resuspendiert. In einem Volumen von 100 µl wurden 1×10^6 Zellen in den rechten Leberlappen der Tiere injiziert. Nach einer Woche wurden die Tiere getötet und die Anzahl und das Gewicht der Abszesse bestimmt.

Die Experimente mit immunisierten Wüstenrennmäusen wurden mit *E. histolytica*-Trophozoiten durchgeführt, die aus dem Leberabszess einer Wüstenrennmaus kultiviert worden waren. Da diese Amöben eine höhere Virulenz zeigen, wurden nur je 2×10^5 Zellen, wie oben beschrieben, appliziert. Die Wüstenrennmäuse waren zuvor mit rekombinantem ARIEL immunisiert worden. Dazu wurden einer Gruppe von 6 Tieren je 50 µg rekombinantes ARIEL in komplettem Freund's Adjuvans intraperitoneal injiziert. Es folgten 3 weitere Injektionen der gleichen Menge ARIEL in inkompletem Freund's Adjuvans. 6 Kontrolltiere wurden unter den gleichen Bedingungen, jedoch mit Adjuvans und Puffer, immunisiert. Die Applikation der Amöben erfolgte zwei Wochen nach der letzten Injektion.

3. Ergebnisse

Mehrere für die Pathogenität von *E. histolytica* funktionell bedeutsame Moleküle wurden bereits beschrieben. Diese Moleküle sind jedoch ausnahmslos auch in der phylogenetisch eng verwandten, apathogenen Spezies *E. dispar* zu finden und man hat bisher auf Proteinebene kaum Unterschiede gefunden, die die Pathogenität bzw. nicht-Pathogenität ausreichend erklären könnten. Auf der Suche nach genetischen Unterschieden zwischen den beiden Spezies wurde in *E. histolytica* die *ariel*-Genfamilie entdeckt. Da ARIEL-Proteine in *E. dispar* fehlen, stellte sich die Frage, welche Funktion(en) sie in *E. histolytica* haben und ob sie eventuell einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor darstellen. Daher sollte ARIEL im Zuge dieser Arbeit aus Amöben-Extrakten gereinigt, charakterisiert und auf mögliche Funktionen untersucht werden.

ARIEL ist außerdem ein potenzielles Oberflächenantigen und könnte somit unter immunologischen Aspekten interessant sein. Diesbezüglich sollte seine Eignung als Impfstoffkandidat und sein Potenzial für eine spezifische Serodiagnostik untersucht werden. Hinweise auf eventuelle immunogene Eigenschaften von ARIEL ergeben sich aus der hohen Ähnlichkeit zu SREHP, für das bereits in einer Vielzahl von Experimenten eine hohe Immunogenität gezeigt werden konnte und das eines der am besten untersuchten Moleküle für einen möglichen Impfstoff gegen die Amöbiasis darstellt.

3.1 Rekombinante Expression von ARIEL in *Escherichia coli* und Reinigung über NiNTA-Agarose

Für Impfstudien und zur Herstellung spezifischer Antikörper war es notwendig gereinigtes ARIEL in ausreichenden Mengen zu gewinnen. Dies sollte erzielt werden durch rekombinante Expression des Proteins in *Escherichia coli* und anschließende Reinigung des rekombinanten Proteins aus Bakterienlysaten. Hierzu wurde zunächst die Kopie eines *ariel*-Gens aus genomischer *E. histolytica*-DNA durch PCR amplifiziert.

Sequenzierung des Amplifikates ergab, dass es die vollständige kodierende Sequenz eines *ariel*-Gens enthielt. Die amino- und carboxyterminalen Bereiche waren identisch mit den Sequenzen der bisher bekannten acht *ariel*-Gene. Unterschiede waren jedoch innerhalb der *repeat*-Domäne festzustellen. Die hier amplifizierte *ariel*-Gensequenz kodiert für ein Protein mit 18 *repeats* und stellt somit das längste bisher bekannte *ariel*-Gen aus *E. histolytica* dar. Für die rekombinante Expression in *E. coli* wurde ein 555 bp Fragment herausgeschnitten, dem am 5'-Ende 57 bp und am 3'-Ende 84 bp der vollständigen, kodierenden *ariel*-Sequenz fehlten. Dieses Fragment wurde

in den prokaryotischen Expressionsvektor pHisT7B ligiert (pHisT7B-*ariel*). Dem in dieser Form exprimierten Genprodukt fehlte der hydrophobe Aminoterminus und der hydrophobe Carboxyterminus des vollständigen ARIELs, was zu einem rekombinanten Protein führte, das nach der bakteriellen Expression in der löslichen Fraktion der Zellextrakte zu finden war und somit die nachfolgende Reinigung erleichterte.

Außerdem erhielt das rekombinante ARIEL durch die Expression in diesem Vektor zusätzlich eine aminoterminaler Abfolge von acht Histidin-Resten, die die Reinigung des rekombinanten Proteins über Nickel-Chelat-Affinitäts-Chromatographie, also auch unter stark denaturierenden Bedingungen, ermöglichte. Stark denaturierende Bedingungen (z.B. 6 M Guanidinium-HCl oder 8 M Harnstoff), sind oftmals notwendig, um rekombinant exprimierte Proteine in Lösung zu bringen.

Nach Induktion der Expression war in der SDS-PAGE des löslichen Gesamtextraktes unter reduzierenden Bedingungen das rekombinante ARIEL in Form einer zusätzlichen Bande bei ca. 44 kDa zu erkennen (Abbildung 2: a und b). Expressionskulturen von 1.000 ml ergaben nach Reinigung, Einengung und Dialyse eine Gesamtmenge von ca. 20 mg des rekombinanten ARIELs. Ebenfalls dargestellt in Abbildung 2 (c) ist eine SDS-PAGE des gereinigten Proteins. Es erscheint als Bande mit einer Größe von ca. 44 kDa. Die rechnerische Größe des rekombinanten Proteins ist mit 23 kDa auffälligerweise nur ca. halb so groß. Western-Blot Analysen dieser Fraktionen mit anti-ARIEL-Antikörpern, die freundlicherweise von Prof. Samuelson zur Verfügung gestellt wurden, reagierten mit dieser Bande. Zusätzlich wurde durch Proteinsequenzierung die Identität des Proteins bestätigt.

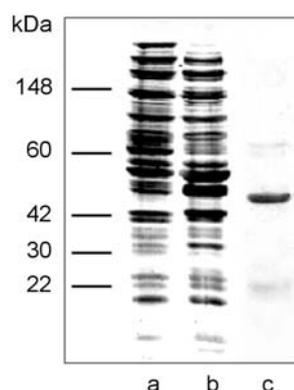


Abbildung 2: Expression und Reinigung von rekombinatem ARIEL. Das Gen für ARIEL wurde in den prokaryotischen Expressionsvektor pHisT7B kloniert und in *E. coli* transformiert. Nach Induktion mit IPTG wurde das rekombinante Protein über NiNTA-Agarose chromatographisch gereinigt. Dargestellt ist eine Coomassie-gefärbte SDS-PAGE von *E. coli*-Lysaten (a) vor und (b) nach Induktion und (c) eine SDS-PAGE von gereinigtem ARIEL nach Silberfärbung.

3.2 Untersuchungen zu immunologischen Eigenschaften von rekombinantem ARIEL

Da ein Antigen, das auf der Zellmembran eines Parasiten lokalisiert ist, prinzipiell dem Immunsystem des Wirts ausgesetzt ist, kann ein solches Oberflächenantigen unter immunologischen Gesichtspunkten interessant sein. Die Primärstruktur von ARIEL deutet aufgrund der amino- und carboxyterminalen hydrophoben Bereiche auf eine Membranlokalisierung hin. Dazu kommt die bereits erwähnte hohe Ähnlichkeit mit SREHP, für das eine Lokalisation auf der Zellmembran schon nachgewiesen wurde (Die Lokalisation von ARIEL in *E. histolytica*-Trophozoiten wird unter 3.4 gezeigt). Es stellte sich also die Frage, ob die hohe Immunogenität von SREHP auch für ARIEL nachzuweisen ist.

3.2.1 Untersuchung zur Schutzfunktion von ARIEL gegen Amöbenleberabszesse nach Immunisierung von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*)

Die Eignung eines Antigens als Impfstoff gegen Amöbiasis lässt sich nur im Tiermodell untersuchen. Das Standard-Tiermodell mit dem dies untersucht werden kann, ist die Immunisierung von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) mit dem entsprechenden Antigen. Die Versuchstiere werden dazu mit dem zu testenden Antigen immunisiert, bevor durch intrahepatische Applikation von *E. histolytica*-Trophozoiten die Bildung von Abszessen in der Leber induziert wird. Ein erwirkter Immunschutz zeigt sich in Form einer totalen Inhibition oder Reduktion der Abszessbildung. Die Immunisierung von Wüstenrennmäusen mit rekombinantem SREHP hatte bereits in früheren Untersuchungen eine signifikante Reduktion der Abszessbildung ergeben, daher sollte nun auch ARIEL auf diese Fähigkeit untersucht werden.

Nach einer Grundimmunisierung und drei darauf folgenden Auffrischungsimpfungen wurden den 6 Versuchstieren jeweils 2×10^5 virulente *E. histolytica*-Trophozoiten intrahepatisch injiziert. Eine Woche nach der Applikation der Amöben wurde die Leber der Tiere hinsichtlich der Ausbildung von Abszessen untersucht (Abbildung 3). 6 Kontrolltiere wurden parallel nur mit Puffer und Adjuvans immunisiert.

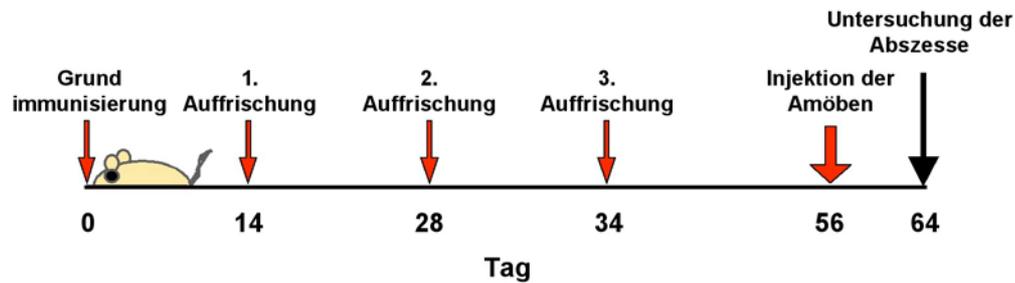


Abbildung 3: zeitlicher Ablauf der Immunisierung von Wüstenrennmäusen mit rekombinantem ARIEL und anschließenden Induktion von Amöbenleberabszessen.

Die Ergebnisse ergaben, dass alle Tiere Leberabszesse entwickelt hatten. Die Abszesse der mit ARIEL immunisierten Tiere zeigten im Bezug auf das Gewicht der Leber einen prozentualen Anteil von $9,8\% \pm 5,3$. Die Abszesse in den Kontrolltieren wiesen einen Wert von $9,5\% \pm 2,6$ auf. Hinsichtlich der Abszessgröße war also kein signifikanter Unterschied zwischen den mit ARIEL immunisierten und den Kontrolltieren festzustellen (Tabelle 5).

Zusätzlich wurden die Seren der Versuchstiere im ELISA gegen rekombinantes ARIEL untersucht, um festzustellen ob durch die erfolgte Immunisierung signifikante Antikörper-Titer induziert wurden. Die mit ARIEL immunisierten Tiere waren bei Serumverdünnungen von 1/1600 bis >1/6400 im ELISA positiv, während die Kontrolltiere keine signifikanten Antikörper-Titer zeigten.

Tabelle 5: Induktion von Amöbenleberabszessen in Wüstenrennmäusen nach Immunisierung mit rekombinantem ARIEL.

	Gewicht des Abszesses in g	Gewicht der Leber in g	Gewichtsprozent Abszess/Leber		α -ARIEL-Antikörper-Titer
Kontrolltiere	0,244	1,70	13,2	$9,5 \pm 2,6$	-
	0,190	1,95	9,7		-
	0,257	2,10	12,2		-
	0,165	1,80	9,2		-
	0,110	1,70	6,5		-
	0,095	1,52	6,3		-
immunisierte Tiere	0,095	1,70	5,6	$9,8 \pm 5,3$	>6400
	0,021	1,67	1,3		6400
	0,210	2,13	9,9		>6400
	0,200	1,84	10,9		1600
	0,410	2,24	18,3		>6400
	0,240	1,90	12,6		3200

3.2.2 Prävalenz von Antikörpern gegen rekombinantes ARIEL in Seren von Personen mit und ohne *E. histolytica*-Infektion

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass 80% aller Seren von Patienten mit Amöbenleberabszessen signifikante Antikörper-Titer gegen rekombinantes SREHP aufwiesen. Entsprechend sollte die Antikörperprävalenz gegen ARIEL in einer größeren Zahl von gut definierten Seren unterschiedlicher Probandengruppen untersucht werden. Dazu wurden in einem ELISA mit rekombinantem ARIEL insgesamt 88 Seren von Patienten mit einer *E. histolytica*-Infektion getestet. 42 dieser Seren stammten von Patienten mit Amöbenleberabszessen. Von diesen 42 Seren waren 11 (26,2%) positiv. Die restlichen 46 Seren stammten von Patienten mit einer asymptomatischen *E. histolytica*-Infektion. Von diesen 46 Seren waren nur 4 (8,7 %) positiv. Keines von 24 Seren von Patienten mit einer *E. dispar*-Infektion reagierte mit dem rekombinanten ARIEL und nur 1 von 50 Kontrollseren von Personen ohne Amöbeninfektion zeigte eine positive Reaktion.

Zur Kontrolle wurden dieselben Seren im ELISA mit rekombinantem P1 getestet. P1 ist ein Oberflächenantigen von *E. histolytica*, das auf Grund seiner guten Immunogenität häufig in der Immundiagnostik der Amöbiasis verwendet wird. Im P1-ELISA waren 81 % der Seren der Patienten mit Amöbenleberabszess und 82,6 % der Seren von asymptomatischen *E. histolytica*-Ausscheidern positiv. Im Gegensatz dazu reagierten nur 20,8 % der Seren von Patienten mit einer *E. dispar*-Infektion und 14 % der Kontrollseren mit rekombinantem P1 (Tabelle 6).

Tabelle 6: Antikörper gegen rekombinante Amöbenproteine in Personen mit und ohne *E. histolytica*-Infektion.

	getestete Seren	positiv im ELISA mit :			
		rekombinantem ARIEL		rekombinantem P1	
<i>E. histolytica</i> (Leberabszess)	42	11	26,2 %	34	81,0 %
<i>E. histolytica</i> (asymptomatisch)	46	4	8,7 %	38	82,6 %
<i>E. dispar</i>	24	0	0 %	5	20,8 %
Kontrollen	50	1	2,0 %	7	14,0 %

3.3 Gewinnung von Antikörpern gegen rekombinantes ARIEL

Zur spezifischen Detektion von Proteinen sind entsprechende Antikörper ein wichtiges Werkzeug. Anti-ARIEL-Antikörper waren notwendig, um das Protein während der weiteren Experimente, z.B. in Western-Blots, spezifisch nachweisen zu können. Neben diesem Nachweis von ARIEL in verschiedenen Proben wurden solche Antikörper auch zur Immunlokalisation des Proteins sowie für Experimente zur posttranslationalen Modifikation benötigt. Darüber hinaus können spezifische Antikörper zur Reinigung von Proteinen wie etwa durch die Affinitäts-Chromatographie verwendet werden.

Für die Herstellung der Antikörper wurden zwei Kaninchen und ein Huhn mit dem gereinigten rekombinanten ARIEL immunisiert. Die Kaninchen-Seren bzw. die aus den Hühnereiern gewonnenen Antikörper wiesen jedoch nur relativ geringe Titer auf.

Das zeigten Western-Blot Analysen mit Extrakten aus *E. histolytica* oder mit rekombinantem ARIEL. Um höher titrige Antikörper gegen ARIEL zu erhalten, wurde ein Peptid synthetisiert (NKPDESSNNKPNNESSDNKP), das aus den zentralen *repeat*-Domänen von ARIEL abgeleitet worden war. Nach Kopplung dieses Peptids an KLH wurden damit Kaninchen immunisiert und aus den so gewonnenen Antiseren spezifische anti-ARIEL-Antikörper mit Hilfe des synthetischen Peptids affinitäts-chromatographisch gereinigt. Ein Vergleich der so hergestellten Antikörper ergab ein deutlich stärkeres Signal im Western-Blot mit Extrakten aus *E. histolytica*-Membranfraktionen (Abbildung 4). Zudem zeigten die Präimmun-Seren der dazugehörigen Kaninchen weniger Kreuzreaktionen. Auch im ELISA war das Kaninchen-Serum gegen rekombinantes ARIEL mit einer Serumverdünnung bis 1/6400 deutlich schwächer als die aufgereinigten Antikörper gegen das synthetische Peptid. Letztere zeigten selbst bei einer Verdünnung von 1/20.000 noch eine deutliche Reaktion mit rekombinantem ARIEL.

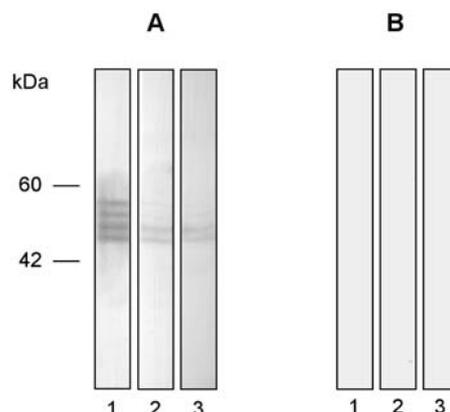


Abbildung 4: Reaktivität verschiedener anti-ARIEL-Antikörper mit *E. histolytica*-Extrakten. Dargestellt sind Western-Blots von elektrophoretisch aufgetrennten Amöbenextrakten, die mit verschiedenen Antikörpern gegen ARIEL (1/100 verd.) entwickelt wurden (Chloronaphthol-Entwicklung). A. (1) Antiserum gegen synthetisches ARIEL-Peptid aus Kaninchen, (2) Antiserum gegen rekombinantes ARIEL aus Kaninchen, (3) Antikörper gegen rekombinantes ARIEL aus Huhn, B. korrespondierende Präimmun-Antikörper.

3.4 Lokalisation von ARIEL in *E. histolytica*-Trophozoiten

Zur weiteren Charakterisierung von ARIEL sollte die zelluläre Lokalisation des Proteins in *E. histolytica*-Trophozoiten bestimmt werden. Die beiden hydrophoben amino- bzw. carboxyterminal gelegenen Sequenzabschnitte ließen bereits auf eine Membranlokalisation schließen. Zudem war auch für SREHP eine Membranlokalisation beschrieben worden. Die carboxyterminale Signalsequenz von ARIEL weist nach Analyse durch entsprechende Vorhersage-Programme zusätzlich auf eine Membranverankerung des Proteins über einen sogenannten GPI-Anker hin.

Um festzustellen in welcher Zellfraktion ARIEL vorliegt, wurden zunächst definierte Zellextrakte in Western-Blots auf ihren ARIEL-Gehalt untersucht. Für die Lokalisation von ARIEL in *E. histolytica*-Trophozoiten wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie fixierter Zellen mit anti-ARIEL-Antikörpern durchgeführt.

3.4.1 Lokalisation in definierten Zellextrakten

Definierte Zellextrakte von *E. histolytica*-Trophozoiten wurden hergestellt, wobei 4 Fraktionen unterschieden wurden. Zellkerne und -debris (Sediment nach Einfrieren/Auftauen bei 1200 x g; der erhaltene Überstand wurde anschließend ultrazentrifugiert), lösliche bzw. zytoplasmatische Fraktion (Überstand nach Ultrazentrifugation; die sedimentierten Membranen wurden gewaschen und solubilisiert), solubilierte Membranfraktion (Überstand nach Solubilisierung und erneuter Ultrazentrifugation) und das unlösliche, unsolubilisierbare Material (Sediment nach Solubilisierung und Ultrazentrifugation).

Western-Blots der solubilierten Membranfraktionen zeigten das stärkste Signal nach Entwicklung mit anti-ARIEL-Antikörpern. Die Proteine der *ariel*-Genfamilie erscheinen im Western-Blot einer 12 %igen SDS-PAGE (unreduziert und reduziert) in Form einer Reihe von mindestens 5 Banden zwischen ca. 44 und 55 kDa, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass *ariel* im Genom von *E. histolytica* in mehreren Kopien vorkommt, deren Genprodukte sich in der Anzahl ihrer charakteristischen *oktarepeats* unterscheiden.

In den löslichen Extrakten war praktisch kein Signal zu erkennen, obwohl die aufgetragene Proteinmenge ca. 5 mal größer war (Abbildung 5). Die Fraktion der sedimentierten Zelltrümmer nach den Einfrier-Auftau-Zyklen wie auch das unlösliche Material nach der Solubilisierung zeigten jeweils nur eine geringe Menge an ARIEL.

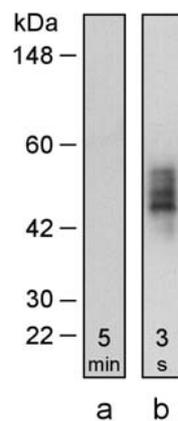


Abbildung 5: Lokalisation von ARIEL in Extrakten definierter Zellfraktionen. Western-Blots von *E. histolytica*-Extrakten wurden mit anti-ARIEL-Antikörpern (ECL-Plus, Exposition: siehe Blotstreifen) entwickelt. (a) zeigt löslichen Extrakt (Überstand nach Ultrazentrifugation, 100 µg Protein) und (b) zeigt ein Solubilisat der durch Ultrazentrifugation sedimentierten Membranfraktion (20 µg Protein).

3.4.2 Lokalisation durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Der Nachweis von ARIEL in der solubilisierten Membranfraktion war ein weiterer Hinweis auf eine Membranständigkeit von ARIEL. Sie konnte jedoch durch die erfolgten Western-Blot-Analysen nicht eindeutig der Zellmembran zugeordnet werden. Daher wurde die Lokalisation von ARIEL zusätzlich durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie fixierter *E. histolytica*-Trophozoiten mit anti-ARIEL-Antikörpern bestimmt. Um eine eventuelle Markierung der Antigene auch innerhalb der Zellen zu ermöglichen, wurden parallel Trophozoiten untersucht, deren Membranen zuvor durch ein Detergenz permeabilisiert worden waren.

In den Querschnitten permeabilisierter und nicht permeabilisierter Zellen ist ARIEL als gleichmäßiges Signal zu erkennen, das die Zelle begrenzt. Auch in der konfokalen Darstellung erkennt man eine Markierung der Zelloberflächen. In den permeabilisierten Zellen zeigt sich zusätzlich im Zellinneren eine Markierung von ARIEL in vesikulären Strukturen (Abbildung 6). Zur Kontrolle einer erfolgten Permeabilisierung der Membran und Markierung der Antigene im Inneren der Zellen wurden parallel Trophozoiten mit anti-Amoebapore-A-Antikörpern inkubiert. Dort sieht man die für Amoebapores beschriebene granuläre Markierung (Leippe, 1997).

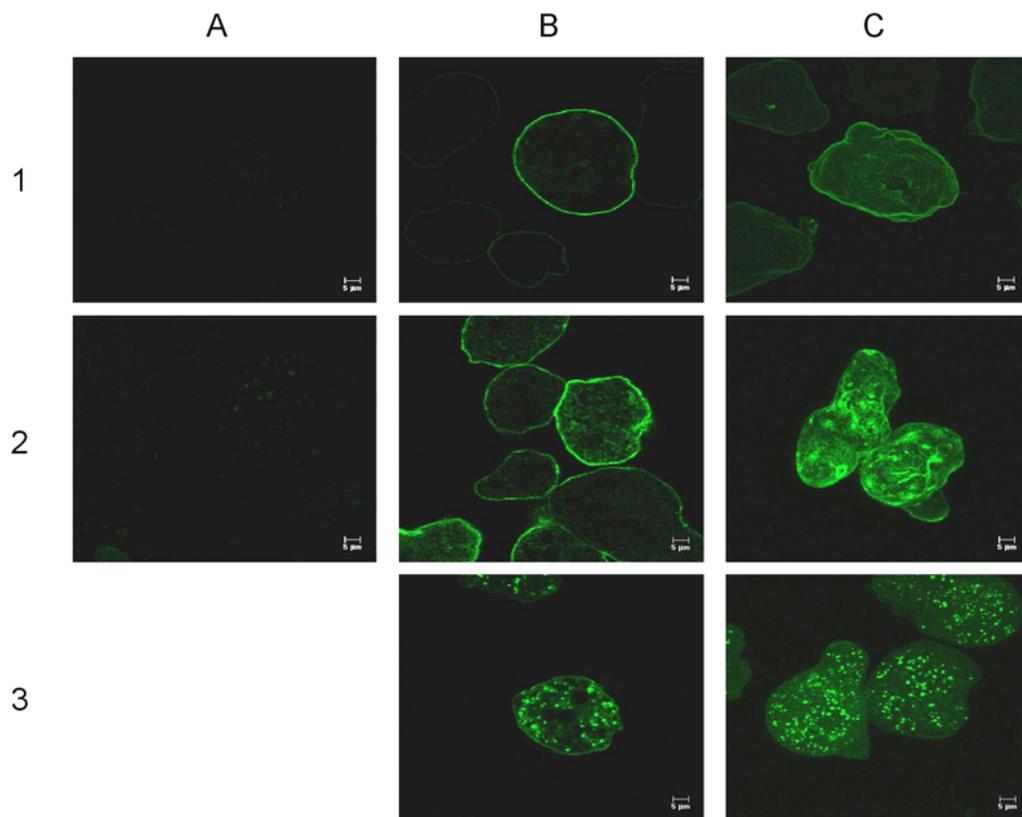


Abbildung 6: Lokalisation von ARIEL in *E. histolytica*-Trophozoiten. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Aufnahmen von fixierten, (1) nicht permeabilisierten und (2) permeabilisierten Trophozoiten. Als Kontrolle der Membranpermeabilisierung sind *E. histolytica*-Trophozoiten unter den gleichen Bedingungen mit anti-Amoebapore-A-Serum (1/100 verd.) inkubiert worden (3). A stellt die Kontrollen mit Präimmunsereum dar, B zeigt Querschnitte und C konfokale Darstellungen der anti-ARIEL-(1/200 verd.) markierten Trophozoiten.

3.5 Reinigung von endogenem und rekombinantem ARIEL aus *E. histolytica*-Trophozoiten

Eine Reinigung des endogenen Proteins ist die Grundlage für weitere Experimente, die Hinweise auf Eigenschaften oder mögliche Funktionen von ARIEL geben könnten. Untersuchungen z.B. durch enzymatischen Verdau oder chemische Umsetzungen sind generell mit einem gereinigten Protein besser durchzuführen als mit Zellextrakten. Außerdem wären durch metabolische, radioaktive Markierung und anschließende Immunpräzipitation von ARIEL Untersuchungen zu putativen Glykosylierungen oder Phosphorylierungen möglich.

Aufgrund von Western-Blot Untersuchungen verschiedener Extrakte ist zu vermuten, dass ARIEL im Vergleich zu SREHP nur in relativ geringer Menge von den Amöben gebildet wird. Anti-SREHP-Antikörper zeigten trotz höherer Verdünnung stets wesentlich stärkere Signale als anti-ARIEL-Antikörper. Auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie waren nach Markierung mit anti-SREHP-Antikörpern stärkere Signale erkennbar als mit anti-ARIEL-Antikörpern (Abbildung 20). Aufgrund dieser vermutlich geringen Abundanz gelang es zunächst nicht,

ARIEL in Amöbenextrakten reproduzierbar nachzuweisen. Hinzu kam, dass anfänglich eine Extraktionsmethode verwendet wurde, die keine reproduzierbaren bzw. definierten Zellextrakte lieferte. Mit einer verbesserten Methodik konnten jedoch im Verlauf der Arbeit Extrakte hergestellt werden, in denen ARIEL regelmäßig nachweisbar war. Hinzu kam eine erhöhte Sensitivität für den Nachweis von ARIEL in den Western-Blot-Analysen durch die Verwendung der hochtitrigen anti-Peptid-Antikörper und Entwicklung der Blots mit ECL-Plus (Amersham Biosciences).

Da ARIEL primär in den Solubilisaten von Membranen zu finden war (3.4.1), sollte eine Methode zur Reinigung aus dieser Zellfraktion erarbeitet werden, um mit dem gereinigten endogenen ARIEL anschließend weiterführende Versuche durchführen zu können. Die bereits erwähnte geringe Abundanz von ARIEL stellte jedoch ein Problem bei dessen Reinigung dar. Daher sollten Amöbenlysate mit einem höheren ARIEL-Gehalt hergestellt werden. Dies sollte durch eine Überexpression von ARIEL in *E. histolytica*-Trophozoiten erreicht werden. Dazu wurde die vollständige kodierende Sequenz von ARIEL in den Expressionsvektor pNeoCass ligiert (pNeoAriel). Dieser Vektor ermöglicht die Selektion transfizierter Amöben mit G418. Die *ariel*-Genkopie in diesem Vektor wird vom 5'-Bereich eines *E. histolytica*-Lektins und vom 3'-Bereich des *E. histolytica*-Aktins flankiert. Nach Transfektion und anschließender Selektion rekombinanter Amöben mit G418 erhält man Amöben mit zusätzlichen ARIEL-Genkopien wodurch im günstigen Fall vermehrt ARIEL gebildet wird. In Solubilisaten von Membranfraktionen der mit pNeoAriel transfizierten Amöben wurde in der Tat eine erhöhte Menge an ARIEL gefunden, wie Vergleiche mit Amöben, die mit einem entsprechenden Kontrollplasmid transfiziert worden waren, bestätigten. Das überexprimierte rekombinante ARIEL ist in Western-Blots stets in Form der verstärkten Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa zu erkennen. Dies entspricht der Tatsache, dass es sich bei dem transfizierten Gen um die größte bekannte *ariel*-Genkopie handelt (Abbildung 7).

Trotz der verstärkten ARIEL-Expression waren die rekombinanten Amöben im Vergleich zu Kontrollzellen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Wachstumsverhaltens unauffällig.

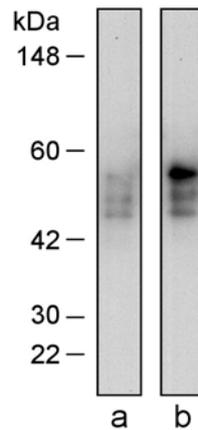


Abbildung 7: Expression von ARIEL in transfizierten *E. histolytica*-Trophozoiten. Amöben wurden mit (a) dem Kontrollvektor und (b) dem Expressionsvektor, der für vollständiges ARIEL kodiert, transfiziert, mit G418 selektioniert und anschließend Western-Blots der solubilisierten Membranfraktionen mit anti-ARIEL-Antikörpern (ECL-Plus, Exposition: 3 s) entwickelt.

Für eine affinitäts-chromatographische Reinigung von ARIEL aus Amöbenextrakten wurden verschiedene Antikörper an unterschiedliche Säulenmaterialien (CNBr-, ECH-Sepharose, NHS-HiTrap oder Dynabeads[®]) gekoppelt. Antikörper gegen rekombinantes ARIEL aus Kaninchen, Antikörper gegen rekombinantes ARIEL aus Huhn vor und nach Reinigung über eine IgY-spezifische Säule sowie die affinitäts-chromatographisch gereinigten Antikörper aus Kaninchen, die zuvor mit dem synthetischen Peptid immunisiert worden waren, wurden eingesetzt. Das beste, aber immer noch unzureichende Ergebnis wurde mit den letztgenannten Antikörpern nach Kopplung an Dynabeads[®] (anti-ARIEL-*beads*) erzielt (Abbildung 8).

Obwohl Octylglucosid als mildes Detergenz angesehen wird, bestand die Möglichkeit, dass es einen störenden Einfluss auf die Affinität der anti-ARIEL-Antikörper hat. Einen Hinweis darauf ergab ein Versuch, bei dem Amöbensedimente vor der Solubilisierung, also in Abwesenheit von Octylglucosid, mit anti-ARIEL-*beads* inkubiert worden waren. Erst nach der Bindung der Antikörper an ARIEL wurde solubilisiert. Nach Waschen und Elution war ein leichter Anstieg der Menge an ARIEL im Eluat festzustellen. Die Konzentration an Octylglucosid in den Solubilisaten wurde daraufhin herabgesetzt, um einen eventuell störenden Einfluss auf die Bindung der Antikörper an ARIEL zu verhindern. Das geschah durch Dialyse der Solubilisate gegen Puffer mit weniger bzw. ohne Octylglucosid, was wiederum bewirkte, dass ARIEL teilweise ausfiel oder auch an Oberflächen von Reaktionsgefäßen adhärenzte und somit verloren ging.

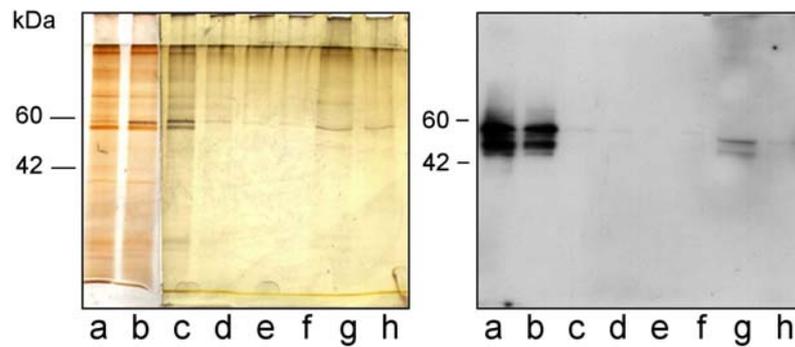


Abbildung 8: Reinigung von ARIEL aus *E. histolytica*-Trophozoiten. ARIEL wurde mit anti-ARIEL-*beads* aus Membran-Solubilisaten gereinigt. Dargestellt ist eine 12 % SDS-PAGE nach Silberfärbung (links) und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit anti-ARIEL-Entwicklung (ECL-Plus, Exposition 5 min, rechts). (a) Ausgangsmaterial vor Inkubation mit anti-ARIEL-*beads*, (b) Überstand nach Inkubation mit anti-ARIEL-*beads*, (c-f) Waschfraktionen, (g) Elution und (h) Waschfraktion nach Elution.

Nur sehr geringe Mengen an ARIEL banden spezifisch an die mit anti-ARIEL-Antikörpern gekoppelten *beads*. Der größte Teil des Proteins verblieb in den Durchflussfraktionen (Abbildung 8).

All dies führte insgesamt zu keiner befriedigenden Reinigung oder Konzentrierung des Proteins, da bei allen verwendeten Methoden nur eine minimale Bindung von ARIEL an die anti-ARIEL-Antikörper der Chromatographie-Matrix festzustellen war.

Auch unspezifischere Methoden wurden im Zuge der versuchten Reinigung von ARIEL eingesetzt, um eine Konzentration oder Vorreinigung von ARIEL aus den Extrakten zu erzielen. Der saure isoelektrische Punkt von ARIEL (um 4,0) durch den sich das Protein von den meisten anderen Amöbenproteinen unterscheidet, sollte ausgenutzt werden, um über eine Anionenaustauscher-Chromatographie bei einem sauren pH-Wert möglichst viele andere Proteine auszuwaschen. Auch hier erwies sich das Octylglucosid als störend. Bei einer Chromatographie von Membran-Extrakt mit 0,8 % Octylglucosid über eine MonoQ-Säule war ARIEL fast quantitativ im Durchfluss zu finden. Wurde die Octylglucosid-Konzentration auf 0,1 % herabgesetzt, war im Durchfluss kein ARIEL mehr zu finden. ARIEL befand sich zwar im Eluat, eluierte jedoch nicht in einem scharfen Elutionsgipfel sondern über einen sehr breiten Bereich des Gradienten (Abbildung 9).

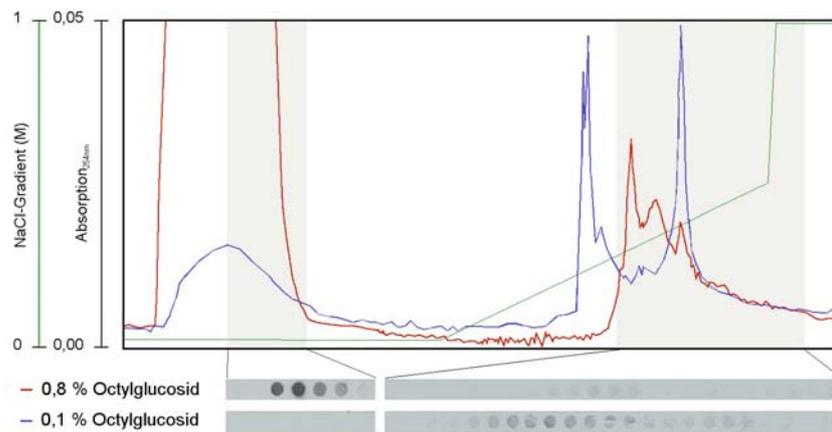


Abbildung 9: Anionenaustausch-Chromatographie von solubilisierten Membranfraktionen von *E. histolytica*-Trophozoiten bei unterschiedlicher Detergenz-Konzentration. Solubilisate von Membranfraktionen wurden mit einem NaCl-Gradienten (—) über eine Anionenaustausch-Säule aufgetrennt. Proben der Fraktionen wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-ARIEL-Antikörpern entwickelt (AP-Entwicklung). Dargestellt sind die Chromatogramme mit (—) 0,8 % bzw. (—) 0,1 % Octylglucosid und jeweils eine Auswahl der Fraktionen nach der ARIEL-Detektion.

Auch eine Vorreinigung der 0,8 % Octylglucosid-Solubilisate über eine hydrophobe Säulenmatrix (Sep-Pak Cartridges, Waters) war nicht erfolgreich, da nur eine geringe Menge des eingesetzten ARIELs wiedergefunden wurde, die noch dazu in der Fraktion eluierte, in der auch fast alle anderen Proteine zu finden waren.

Insgesamt konnte ARIEL trotz der Vielzahl der eingesetzten Methoden nicht in ausreichender Menge und Reinheit für weiterführende Experimente gewonnen werden.

3.6 Expression modifizierter ARIEL Varianten in *E. histolytica* und Reinigung aus Amöbenlysaten

3.6.1 Klonierung von modifizierten *ariel*-Genkopien

Da sowohl die Reinigung des endogenen ARIELs nicht in ausreichender Menge und Reinheit gelang, als auch die Überexpression des vollständigen ARIELs hinsichtlich einer Reinigung keine zufriedenstellende Verbesserung bewirkte, wurden modifizierte Genkopien hergestellt und in *E. histolytica* exprimiert. Die so exprimierten ARIEL-Varianten sollten anschließend aus Zellextrakten gereinigt werden. Ein Problem bei den bisherigen Versuchen der Reinigung von ARIEL lag darin, dass es unter den eingesetzten Bedingungen nicht von den Antikörpern gebunden wurde. Deswegen sollte ein sogenannter HisTag in das Protein eingeführt werden. Der HisTag bestand in diesem Fall aus einer Abfolge von acht Histidin-Resten. Histidin-Reste binden spezifisch an eine NiNTA-Agarose-Matrix, was eine affinitäts-chromatographische Reinigung des HisTag-Proteins ermöglichen sollte. Der Vorteil dieser Methode liegt einerseits in der Spezifität der NiNTA-Agarose zum HisTag, andererseits können die Proteine auch unter stark

denaturierenden Bedingungen gereinigt werden (z.B.: 6 M Guanidiniumhydrochlorid oder 8 M Harnstoff), da diese Säulen-Matrix im Gegensatz zu gekoppelten Antikörpern unter solchen Bedingungen keinen Schaden nimmt. Da die kodierenden *ariel*-Sequenzen eine putative aminoterminal Signalsequenz enthalten, musste der aminoterminal HisTag so eingefügt werden, dass er während der Prozessierung des Proteins in den Amöben nicht mit der Signalsequenz entfernt wird. Der Aminoterminus des maturen Proteins war jedoch nicht bekannt. Vorhersagen unter Verwendung der SignalP V2.0 Software legten allerdings nahe, dass die Schnittstelle zwischen den Aminosäuren A₁₃ und T₁₄ liegt. Um zu verhindern, dass der eingefügte HisTag einen sterischen Einfluss auf das Prozessieren der Signalsequenz hat, wurde er fünf Aminosäuren carboxyterminal der putativen Schnittstelle platziert. Diese modifizierte ARIEL-Gensequenz wurde anschließend in den bereits oben beschriebenen Vektor pNeoCass kloniert (pNeoHisAriel).

Zudem wurde ein Konstrukt hergestellt, dessen Genprodukt nach Expression wasserlöslich sein sollte, um eine Anwesenheit von Detergenzien während der Extraktion der Zellen und der Reinigung des rekombinanten Proteins unnötig zu machen und so u.U. eine affinitätschromatographische Reinigung mit Hilfe von anti-ARIEL-*beads* zu ermöglichen. Dazu wurde der Teil des *ariel*-Gens entfernt, der für die putative carboxyterminale GPI-Signalsequenz und somit die Verankerung von ARIEL in der Membran kodiert. Die putative Schnittstelle dieser GPI-Signalsequenz wurde mit Hilfe des "big-PI Predictor" GPI Prediction Servers ermittelt und lag zwischen den Aminosäuren D₁₉₇ und A₁₉₈ des prematuren Proteins. Hierfür wurde durch eine PCR aus pNeoAriel-DNA eine verkürzte *ariel*-DNA amplifiziert, deren 3'-Ende anstelle der putativen GPI-Signalsequenz ein Stopkodon trägt. Nach Subklonierung wurde diese verkürzte *ariel*-DNA für die Expression in Amöben in pNeoCass ligiert (pNeoArielGPI). Parallel dazu wurde ein weiteres verkürztes *ariel* hergestellt und kloniert, das sich von dem zuvor beschriebenen durch eine zusätzliche Sequenz unterscheidet, die für einen carboxyterminalen HisTag aus acht Histidin-Resten kodiert, der wiederum eine Reinigung über NiNTA-Agarose ermöglichen sollte. Diese Sequenz wurde am 3'-Ende direkt vor dem Stopkodon platziert (pNeoArielHisGPI). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der verschiedenen hergestellten *ariel*-Konstrukte sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

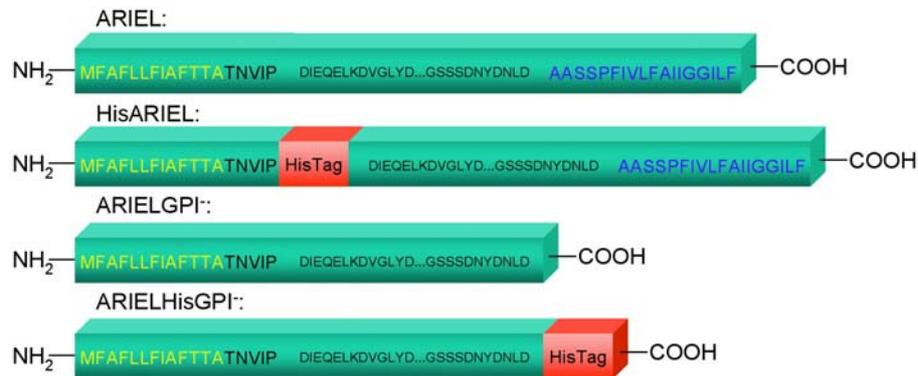


Abbildung 10: Schema der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der modifizierten *ariel*-Konstrukte. Gelb dargestellt ist die putative aminoterminal Signalsequenz, blau ist die putative carboxyterminale GPI-Signalsequenz und rot hinterlegt ist der eingefügte HisTag.

3.6.2 Expression der modifizierten ARIEL-Varianten in *E. histolytica*

Ein vergleichbares Ergebnis wie bei der Transfektion mit pNeoAriel zeigte sich auch bei der Transfektion von *E. histolytica* mit pNeoHisAriel (HisAriel trägt einen HisTag in der Nähe des Aminoterminus des maturen Proteins, ist aber ansonsten unverändert). Auch hier ist in Western-Blots von Solubilisaten der Membranfraktion transfizierter Zellen eine verstärkte oberste Bande zu erkennen. Diese läuft jedoch minimal höher als die Bande des größten ARIELs in Kontrollzellen oder auch den pNeoAriel-transfizierten Zellen. Diese leichte Größendifferenz ist vermutlich durch die zusätzlichen acht Histidin-Reste bedingt. Im Gegensatz zu den Membranextrakten war in den löslichen bzw. zytoplasmatischen Fraktionen der pNeoHisAriel transfizierten Amöben praktisch kein ARIEL nachweisbar. Dies verhielt sich anders bei den Amöben, die mit den *ariel*-Varianten ohne putative GPI-Signalsequenz (pNeoArielGPI und pNeoArielHisGPI) transfiziert worden waren. Hier war eine Expression in den zytoplasmatischen Fraktionen zu beobachten, was vermuten lässt, dass der Carboxyterminus tatsächlich für die Verankerung des Proteins in der Zellmembran benötigt wird. Die Genprodukte erschienen in Western-Blots jedoch nicht als klar abzugrenzende Proteinbanden sondern als Schmier von ca. 44 bis über 60 kDa. Zudem erschienen diese Signale erst nach längerer Exposition, was auf eine relativ schwache Expression oder verstärkten Abbau der rekombinanten Proteine hinweist (Abbildung 11).

Hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Wachstumsverhaltens waren die mit den unterschiedlichen Plasmiden transfizierten Zellen unauffällig.

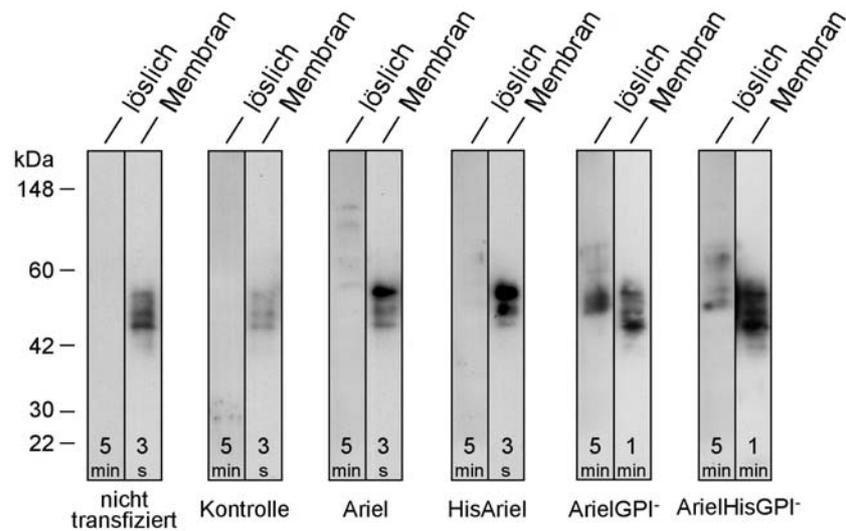


Abbildung 11: Expression von ARIEL und seinen modifizierten Varianten in transfizierten *E. histolytica*-Trophozoiten. Amöben wurden transfiziert, mit G418 selektioniert und anschließend Western-Blots der Extrakte definierter Zellfraktionen mit anti-ARIEL-Antikörpern (ECL-Plus, Exposition: siehe Blotstreifen) entwickelt.

Expression und Lokalisation des ARIELHisGPI in transfizierten *E. histolytica* wurde zusätzlich durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen den HisTag bestätigt. In fixierten und permeabilisierten Amöben war ARIELHisGPI sowohl homogen im Zytoplasma verteilt als auch in vesikulären Strukturen lokalisiert, wobei die Intensitäten der Signale von Zelle zu Zelle sehr variabel war, was vermutlich auf Unterschiede in der Kopienzahl der eingebrachten Gene zurückzuführen ist. Kontrolluntersuchungen mit Amöben, die mit pNeoArielGPI (dem gleichen Konstrukt ohne HisTag) transfiziert worden waren, zeigten keine Signale mit anti-HisTag-Antikörpern (Abbildung 12)

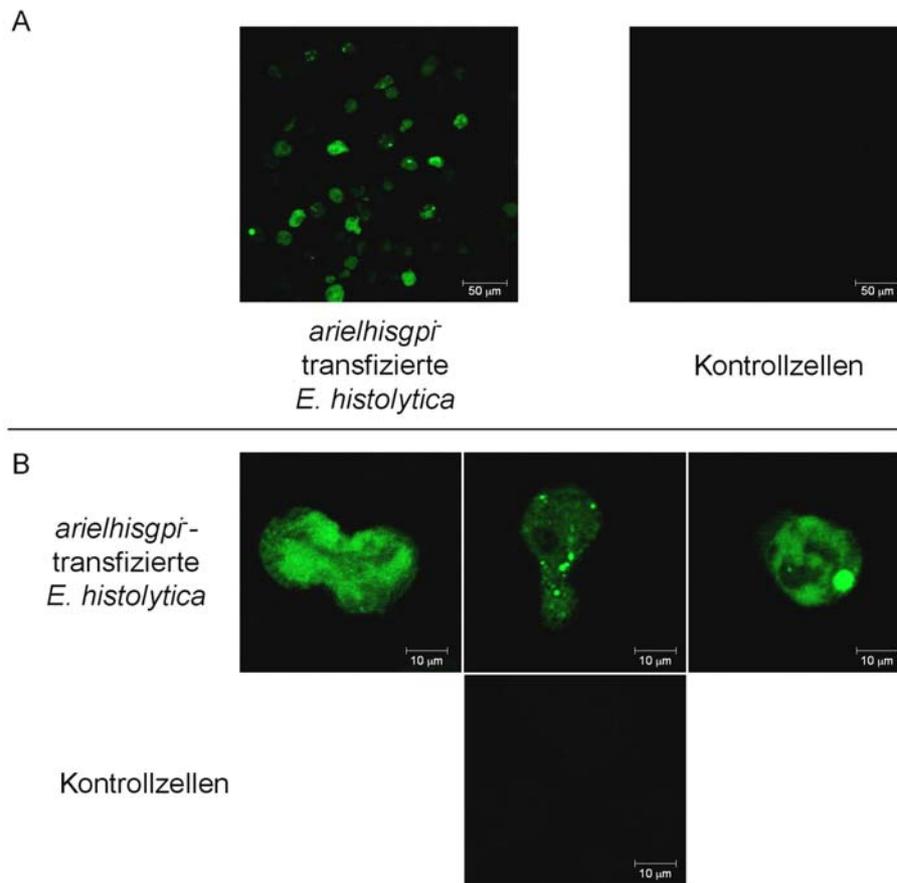


Abbildung 12: Lokalisation von ARIELHisGPI⁺ in transfizierten *E. histolytica*-Trophozoiten. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Aufnahmen von ARIELHisGPI⁺-exprimierenden fixierten und permeabilisierten *E. histolytica*-Trophozoiten nach Markierung mit anti-HisTag-Antikörpern (1/50 verdünnt) (A) im Überblick und (B) von ausgewählten repräsentativen Zellen in stärkerer Vergrößerung. Als Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen *E. histolytica*-Trophozoiten behandelt, die das entsprechende Genprodukt ohne HisTag exprimierten.

3.6.3 Reinigung der HisTag-ARIEL-Varianten über NiNTA-Agarose

Im folgenden wurde versucht, rekombinantes HisARIEL aus Membranfraktionen transfizierter Amöben mit Hilfe der NiNTA-Chromatographie zu reinigen. Es wurde zunächst ein Vorversuch mit dem bereits über NiNTA-Agarose gereinigten, bakteriell exprimierten Protein durchgeführt. Dazu wurden einer Membranfraktion von *E. histolytica* 60 µg des bakteriell exprimierten ARIELs zugesetzt und anschließend aus dieser Mischung über NiNTA-Agarose gereinigt. Das zugesetzte ARIEL band quantitativ an die NiNTA-Agarose und ließ sich nach Abwaschen unspezifisch gebundener Bestandteile von der Säulen-Matrix eluieren. Das gereinigte Protein erschien nach einer SDS-PAGE als singuläre Bande sowohl in silbergefärbten Gelen als auch im Western-Blot nach Entwicklung mit anti-ARIEL-Antikörpern.

Nach diesem Vorversuch wurden unter den gleichen, stark denaturierenden Bedingungen Extrakte aus Membranfraktionen transfizierter Amöben hergestellt, die HisARIEL exprimierten und eine Reinigung des HisARIELs über NiNTA-Agarose versucht. Wie jedoch in Abbildung 13 zu sehen ist, band das HisARIEL nicht an die NiNTA-Agarose und wurde in Western-Blot

Analysen im Durchfluss und den ersten Waschfraktion gefunden. In den folgenden Waschfraktionen und Eluaten war hingegen kein HisAriel nachzuweisen.

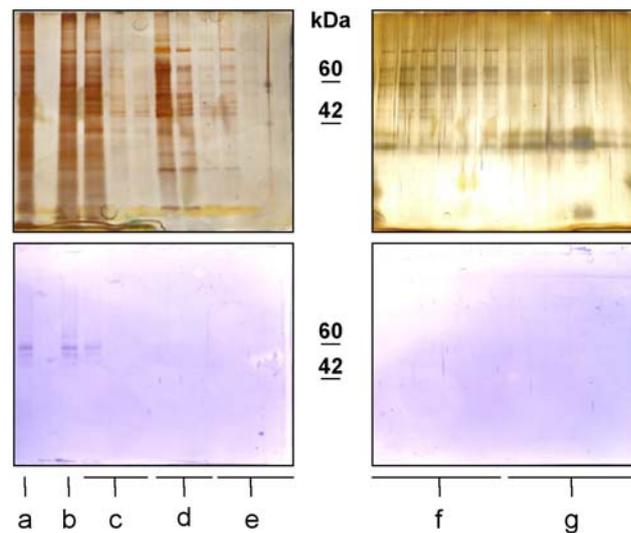


Abbildung 13: Versuchte Reinigung von HisARIEL aus rekombinanten *E. histolytica*. Solubilisierte Membranfraktion transfizierter, HisARIEL-exprimierender *E. histolytica*-Trophozoiten wurden mit NiNTA-Agarose inkubiert. Durch einen pH-Gradienten sollten unspezifisch gebundene Bestandteile ausgewaschen und zuletzt HisARIEL eluiert werden. Dargestellt sind die entsprechenden silbergefärbten Gele (oben) und korrespondierende Western-Blots (unten) nach AP-Entwicklung mit anti-ARIEL-Antikörpern. Die Abbildung zeigt (a) Extrakt vor Inkubation mit NiNTA-Agarose, (b) nicht gebundenes Material, Waschfraktion bei (c) pH 8,0, (d) pH 6,3, (e) pH 5,9, (f) pH 5,6, (g) pH 4,5. Beachte, dass HisARIEL quantitativ in nicht gebundenem Material und erster Waschfraktion zu finden ist.

Nachdem auch das in Amöben exprimierte HisARIEL nicht an die Säulenmatrix band, sollte ARIELHisGPI aus löslichen Extrakten transfizierter Amöben über NiNTA-Agarose gereinigt werden. In diesem Protein befindet sich der HisTag nicht in der Nähe des Aminoterminus sondern liegt carboxyterminal und somit unter Umständen im maturen Zustand des Proteins besser zugänglich für eine Bindung an die NiNTA-Agarose. Tatsächlich band das in dieser Form exprimierte Protein unter nativen Bedingungen an NiNTA-Agarose und war durch stufenweise Verringerung des pH-Wertes zu eluieren. Nach Vereinigen der Elutionsfraktionen wurden diese durch Lyophilisation um das ca. 40fache aufkonzentriert. Abbildung 14 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der Chromatographie-Fraktionen und des aufkonzentrierten Eluats.

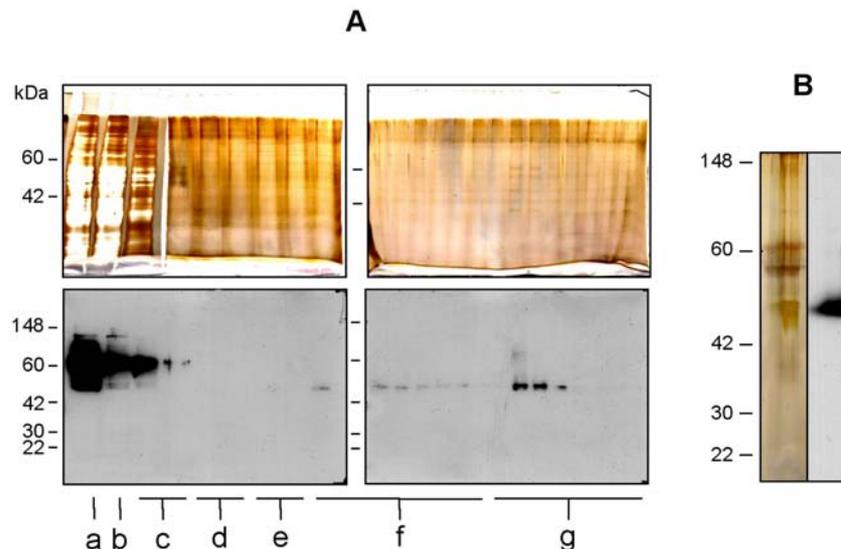


Abbildung 14: Reinigung von ARIELHisGPI^r aus rekombinanten *E. histolytica*. Lösliche Proteinextrakte aus transfizierten ARIELHisGPI^r exprimierenden *E. histolytica*-Trophozoiten wurden mit NiNTA-Agarose inkubiert. Anschließend wurde gebundenes ARIEL mit Hilfe eines pH-Gradienten eluiert. Dargestellt sind die entsprechenden silbergefärbten Gele und korrespondierende Western-Blots, die mit anti-ARIEL-Antikörpern entwickelt wurden (ECL-Plus). Abbildung A zeigt (a) Extrakt vor Inkubation mit NiNTA-Agarose, (b) nicht gebundenes Material, Waschfraktion bei (c) pH 8,0, (d) pH 6,3, (e) pH 5,9, (f) pH 5,6, (g) pH 4,5 (Exposition: 10 min). Beachte die spezifische Elution bei pH 4,5 bei relativ geringer Ausbeute. Abbildung B zeigt aufkonzentriertes ARIEL aus den dominanten Fraktionen bei pH 4,5 (Exposition: 10s).

Im Western-Blot mit anti-ARIEL-Antikörpern war eine Bande von ca. 44 kDa in den Eluat zu erkennen. Das silbergefärbte korrespondierende Gel zeigte in dieser Größe keine angereicherte Bande, jedoch wenige schwache Kontaminanten. Nach der Aufkonzentration erschien im Western-Blot die 44 kDa-Bande mit deutlich stärkerer Intensität, was an der kürzeren Expositionszeit bei der ECL-Plus-Entwicklung erkennbar ist. Diese Bande war im Western-Blot auch mit dem anti-HisTag-Antikörper nachzuweisen. Im korrespondierenden silbergefärbten Gel war ebenfalls eine Bande in diesem Größenbereich zu erkennen.

Insgesamt konnten aber auch mit dieser Methode aus *E. histolytica*-Trophozoiten nur sehr geringe Mengen des rekombinanten Proteins isoliert. Eine weiterführende Analyse war mit dieser Menge nicht möglich. Eine Reinigung aus einer größeren Zahl transfizierter Amöben wurde aus finanziellen Gründen nicht versucht.

3.7 Biochemische Charakterisierung des endogenen ARIELs

Da ARIEL nicht in ausreichenden Mengen aus *E. histolytica*-Extrakten gereinigt werden konnte, wurden weiterführende biochemische Charakterisierungen des Moleküls an rohen Membranextrakten der Amöben durchgeführt

3.7.1 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) von ARIEL

Durch Auftrennung von ARIEL aus Amöbenlysat mit Hilfe der zweidimensionalen SDS-PAGE kann der isoelektrische Punkt des Proteins genauer bestimmt werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit ARIEL-Protein aus dem Gel auszustanzen und aminoterminal zu sequenzieren und so den Aminoterminus des reifen Proteins zu bestimmen. Die anhand der Primärsequenz berechneten isoelektrischen Punkte der verschiedenen Mitglieder der ARIEL-Familie liegen zwischen pH 3,9 für das kleinste und pH 4,1 für das größte Protein. Ein realer isoelektrischer Punkt des murenen ARIELs unterhalb von 5,2 lässt sich bereits aus den Reinigungsversuchen mit der Anionenaustauscher-Matrix ersehen (3.5). Für die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension) wurde deshalb zunächst ein pH-Gradient von 3 bis 6 ausgewählt. Über diesen Gradienten wurde solubilisierte Membranfraktion mit einer Proteinmenge von 200 µg fokussiert und anschließend über eine 11 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. In einem silbergefärbten Gel erkennt man eine gute Auftrennung der Proteine oberhalb von pH 4,5. Unterhalb von pH 4,5 waren keine Proteine zu erkennen. Western-Blot Analysen eines solchen Gels mit anti-ARIEL-Antikörpern zeigten mehrere Proteinspots von unterschiedlicher Intensität in dem berechneten pH-Bereich um 4,0, die jedoch nicht optimal fokussiert waren und in Richtung des sauren pH-Bereichs schmierten. Das Molekulargewicht der hier detektierten Proteinspots lag, wie bereits in der eindimensionalen SDS-PAGE für die Proteine der *ariel*-Genfamilie gezeigt, in einem Bereich von ca. 44-55 kDa (Abbildung 15).

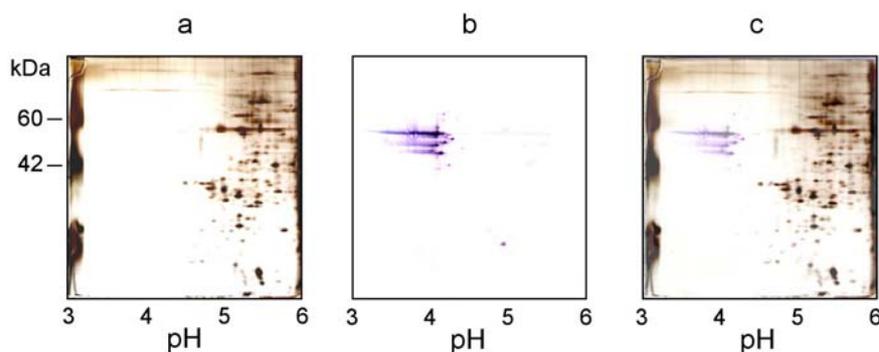


Abbildung 15: Bestimmung des isoelektrischen Punktes von ARIEL. Amöbenextrakt wurde in einer zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt, wobei in der ersten Dimension ein pH-Gradient von 3,0 bis 6,0 gewählt wurde. Von zwei parallel gefertigten Gelen wurde eins (a) silbergefärbt und das andere (b) nach Übertragung auf eine PVDF-Membran mit anti-ARIEL-Antikörpern entwickelt (AP-Entwicklung). (c) computergestützte Überlagerung der Bilder von a und b.

Da in dem pH-Bereich, indem ARIEL im Western-Blot fokussierte, keine Proteinspots in korrespondierenden Gelen nach Silberfärbung erkennbar waren, wurde die aufgetragene Proteinmenge auf 1 mg erhöht. Für eine bessere isoelektrische Fokussierung der ARIEL-spots wurde die Voltstundenzahl von 72.000 auf 85.000 erhöht. Zudem wurde ein engerer pH-Bereich (3,5-4,5) für die Fokussierung gewählt. Nach Coomassie-Färbung (nach Neuhoff) waren auf dem gesamten Gel jedoch nur zwei Proteinspots zu erkennen. Nach Silberfärbung des Gels erschien nur ein weiterer Spot. Western-Blot Analysen mit anti-ARIEL-Antikörpern zeigten ein vergleichbares Bild wie schon bei der isoelektrischen Fokussierung in dem pH-Bereich von 3 bis 6. Nach Abwaschen der anti-ARIEL-Antikörper wurde auf derselben Membran eine Entwicklung mit anti-SREHP-Antikörpern durchgeführt. SREHP war in einem etwas weniger sauren pH-Bereich als ARIEL zu finden. Die Berechnung des isoelektrischen Punktes von SREHP ergab einen Wert von 4,17. Das Molekulargewicht von SREHP lag bei ca. 52 kDa und entspricht somit ungefähr der Größe des größten ARIELs (Abbildung 16).

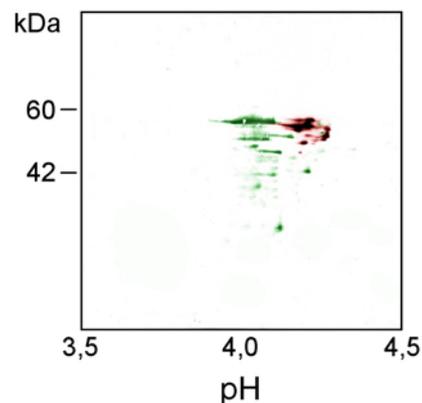


Abbildung 16: Bestimmung der isoelektrischen Punkte von ARIEL und SREHP. Amöbenextrakt wurde in einer zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt, wobei für die erste Dimension ein pH-Gradient von 3,5 bis 4,5 gewählt wurde. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurde der Blot mit Antikörpern gegen ARIEL (grün; AP-Entwicklung) bzw. SREHP (rot; ECL-Plus) entwickelt.

3.7.2 Untersuchung der putativen N- bzw. O-Glykosylierungen von ARIEL

Eine wichtige posttranslationelle Modifikation von Proteinen ist die Glykosylierung. Glykosylierungen können einen erheblichen Einfluss auf die Funktion eines Proteins haben (z.B. Schutz vor proteolytischem Verdau oder Änderung der Affinität von Liganden zu Rezeptoren und umgekehrt). Zwei mögliche Formen von Glykosylierungen auf die ARIEL untersucht werden sollte, sind N- und O-Glykosylierung. Die N-glykosidisch gebundenen Zucker sind mit dem Asparagin-Rest des Sequenzmotivs Asn-X-Thr/Ser verknüpft. Die Zucker O-glykosylierter Proteine sind in der Regel über Serin oder Threonin an die Polypeptidkette gebunden. Das größte ARIEL besitzt insgesamt 7 Sequenzmotive für putative N-Glykosylierungen. Diese befinden sich alle innerhalb der *oktarepeats* und haben die Aminosäureabfolge Asn-Glu-Ser-Ser. Um zu

untersuchen, ob tatsächlich N-Glykosylierungen in ARIEL vorhanden sind, wurde ein Restriktionsverdau mit N-Glycosidase F durchgeführt. Dieses Enzym hydrolysiert die Bindung zwischen Glykosyl-Rest und dem Asparagin der Polypeptidkette, was durch eine Abnahme des Molekulargewichts des verdauten Proteins in einer SDS-PAGE sichtbar gemacht werden kann. Als Kontrolle für die Aktivität des Enzyms in den verwendeten Amöbenextrakten wurde in einem Experiment als interner Standard ein Kontrollprotein (Asialofetuin) zugesetzt. Nach 17 Stunden war das Kontrollprotein quantitativ verdaut, was daran zu erkennen war, dass die Hauptbande sich von ca. 60 kDa vollständig auf ca. 55 kDa verschob. Zudem sind aber auch mehrere amöbenextrakt-spezifische Banden zu erkennen gewesen, die eine Reduktion ihres Molekulargewichtes durch den Verdau mit N-Glycosidase F erfahren haben (siehe Abbildung 17 links, a und b: 3 Banden unterhalb des 148 kDa-Markerproteins). Western-Blot Analysen dieser N-Glycosidase F verdauten Proben ließen jedoch keine Größenreduktion von ARIEL erkennen (Abbildung 17, rechts), so dass mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass ARIEL keine N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide enthält.

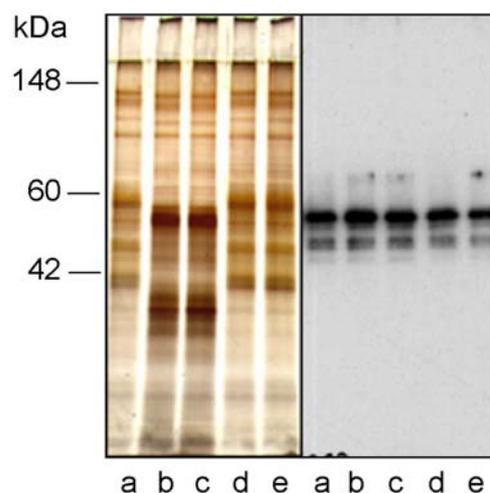


Abbildung 17: Nachweis möglicher N-glykosidisch gebundener Zucker. Amöbenextrakte wurden mit Asialofetuin versetzt und über verschiedene Zeiträume mit N-Glycosidase F inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und silbergefärbt (links). Ein parallel angefertigtes Gel wurde geblottet und mit anti-ARIEL-Antikörpern entwickelt (ECL-Plus, rechts). a. Extrakt zum Zeitpunkt 0. b, c. Extrakte nach Inkubation in Gegenwart von N-Glycosidase F für 17 bzw. 40 Stunden. d, e. Extrakte nach Inkubation in Abwesenheit von N-Glycosidase F für 17 bzw. 40 Stunden.

Im Gegensatz zu N-Glykosylierungsstellen ist für O-Glykosylierungen kein Konsensus-Motiv bekannt. Alle Aminosäuren mit Hydroxyl-Resten in ihren funktionellen Gruppen (z.B. Serin, Threonin oder Tyrosin) können prinzipiell O-glykosyliert werden. Da ARIEL reich an Serin-Resten ist, bietet es eine Vielzahl an möglichen O-Glykosylierungsstellen. O-Glykosylierungen lassen sich durch Restriktionsverdau mit einer O-Glycosidase nachweisen. Wie auch beim Nachweis einer N-Glykosylierung sollte nach dem Verdau das deglykosylierte Protein in einer SDS-PAGE eine Abnahme seines Molekulargewichts zeigen. Ist jedoch das Kerndisaccharid z.B.

durch Sialinsäure substituiert, verhindert dies einen Verdau durch die O-Glycosidase. Substituenten müssen in diesem Fall zuvor enzymatisch oder chemisch entfernt werden. Untersuchungen durch Verdauversuche mit O-Glycosidase und Sialidase blieben jedoch ohne verwertbare Ergebnisse.

3.7.3 Untersuchung der putativen GPI-Verankerung von ARIEL

Computergestützte Vorhersageprogramme hatten ergeben, dass ARIEL ähnlich wie SREHP nach Prozessierung des hydrophoben Carboxyterminus möglicherweise über einen GPI-Anker in die Amöbenmembran inseriert. Dass die carboxyterminale, hydrophobe Sequenz tatsächlich für die Membranlokalisation von Bedeutung ist, hatten bereits die Transfektionsversuche mit rekombinanter Expression der ARIEL-Varianten ARIELGPI⁻ und ARIELHisGPI⁻ gezeigt (siehe 3.6.2).

Der Nachweis eines GPI-Ankers kann durch Verdau mit einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) erfolgen. Dieses Enzym hydrolysiert die Phosphodiesterbindung zwischen Phosphatidylinositol und Diacylglycerol. Durch das Abspalten des hydrophoben GPI-Ankers wird das verdaute Protein wasserlöslicher. Daher ist das enzymatisch gespaltene Membranprotein nach einer Triton-Phasen-Separation im allgemeinen nicht mehr in der Detergenz- sondern in der wässrigen Phase zu finden.

Intakte Amöben wurden mit PI-PLC inkubiert und anschließend einer Triton-Phasen-Separation unterzogen. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der erhaltenen Proben war in Coomassie-gefärbten Gelen kein Unterschied zu parallel durchgeführten Ansätzen ohne Zugabe des Enzyms festzustellen. Nach Western-Blot Analysen dieser Proben mit anti-ARIEL-Antikörpern war auch keine Verschiebung von ARIEL in die wässrige Phase nachzuweisen. Auch eine Größenveränderung von ARIEL oder anderen Amöbenproteinen (im Coomassie-Gel) war nicht zu erkennen (Abbildung 18).

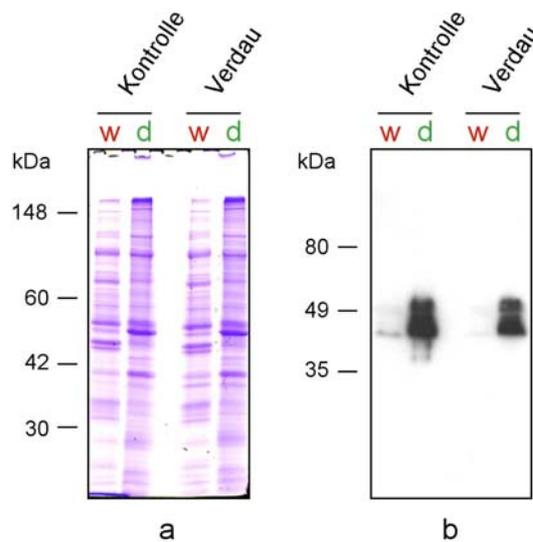


Abbildung 18: Untersuchung zur Abspaltung von ARIEL unter Verwendung von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C. Zur möglichen Abspaltung des GPI-Ankers wurden *E. histolytica*-Trophozoiten mit rekombinanter Phospholipase C von *Bacillus thuringiensis* inkubiert. Anschließend wurde eine Triton-Phasen-Separation durchgeführt, um (w) wasser- und (d) detergentenlösliche Proteine zu trennen. Dargestellt ist (a) eine Coomassie-gefärbte SDS-PAGE und (b) ein entsprechender Western-Blot, der mit anti-ARIEL-Antikörpern entwickelt wurde (ECL-Plus). Beachte: Der Verdau mit Phospholipase C führt nicht zum Übergang von ARIEL in die wässrige Phase.

Mit Hilfe eines Kontrollproteins (Variant-Surface-Glycoprotein; VSG) konnte jedoch sowohl die Aktivität der PI-PLC in dem, für den Verdau des Proteins in Zellsuspension, verwendeten Puffer-System überprüft, als auch eine erfolgreiche Triton-Phasen-Separation durchgeführt werden. Von den Proben dieses Kontrollverdaus wurden zusätzlich Western-Blots mit einem anti-VSG-Antikörper entwickelt. Dieser Antikörper hat in Vorversuchen gezeigt, dass er nur an die geschnittene Form des VSG, das sogenannte *s(soluble)*-VSG, nicht jedoch an das ungeschnittene sogenannte *mf(membraneform)*-VSG bindet. Nach Inkubation von *mf*-VSG mit PI-PLC war im Gegensatz zur Inkubation ohne Enzym ein Signal im Western-Blot erkennbar. Dazu passte, dass das detektierte *s*-VSG primär in der wässrigen Phase vorlag.

Da durch die PI-PLC-Experimente kein Nachweis einer GPI-Verankerung von ARIEL erbracht werden konnte, sollte der mögliche GPI-Anker chemisch durch saure NO_2 -Deaminierung abgespalten werden. Dabei wird die Bindung zwischen Inositol und Glukosamin gespalten und das Phosphatidylinositol freigesetzt. Nach Inkubation von *E. histolytica* Membransolubilisaten mit NaNO_2 zeigte sich bei Immunoblot-Analysen eine Größenreduktion der ARIEL-spezifischen Proteinbanden im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrollprobe. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich auch für SREHP nachweisen, während das 35 kDa Amöbenlektin nach Deaminierung keine Größenreduktion zeigte (Abbildung 19).

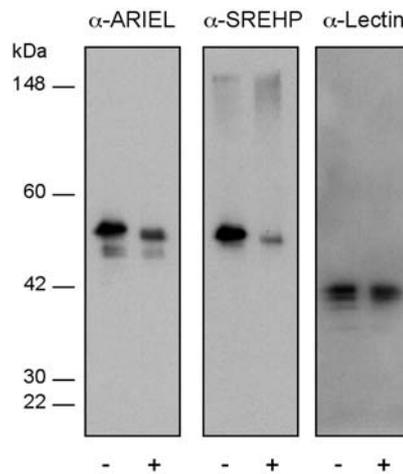


Abbildung 19: Abspaltung von GPI-verankerten Membranproteinen durch saure NO₂-Deaminierung. Zur Abspaltung wurden Amöbenextrakte unter sauren Bedingungen mit (+) und ohne (-) Natriumnitrit inkubiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Anschließend wurden ARIEL, SREHP und das 35kDa-Lektin der Amöben mit Hilfe entsprechender Antiseren dargestellt (ECL-Plus). Lediglich ARIEL und SREHP zeigten nach Deaminierung eine Größenreduktion.

3.8 Rekombinante Expression von ARIEL in *E. dispar*

Das besondere Interesse an ARIEL liegt in erster Linie in der Tatsache begründet, dass das Protein in dem pathogenen Organismus *E. histolytica* vorhanden ist, jedoch in der phylogenetisch eng verwandten aber apathogenen Spezies *E. dispar* fehlt. SREHP hingegen kommt in beiden Spezies vor, zeigt aber eine sehr hohe Ähnlichkeit zu ARIEL und gehört zur selben Proteinfamilie. Es lag also nahe, durch Gentransfer ARIEL in *E. dispar* rekombinant zu exprimieren und den resultierenden Phänotyp hinsichtlich seines pathogenen Potenzials zu untersuchen.

Als Ausgangsstamm wurde das *E. dispar* Isolat SAW760 verwendet. Das Fehlen von ARIEL in diesem Isolat wurde durch Western Blot Analysen von Zellextrakten und Immunfluoreszenz-Mikroskopie von fixierten Trophozoiten mit anti-ARIEL-Antikörpern bestätigt (Abbildung 20).

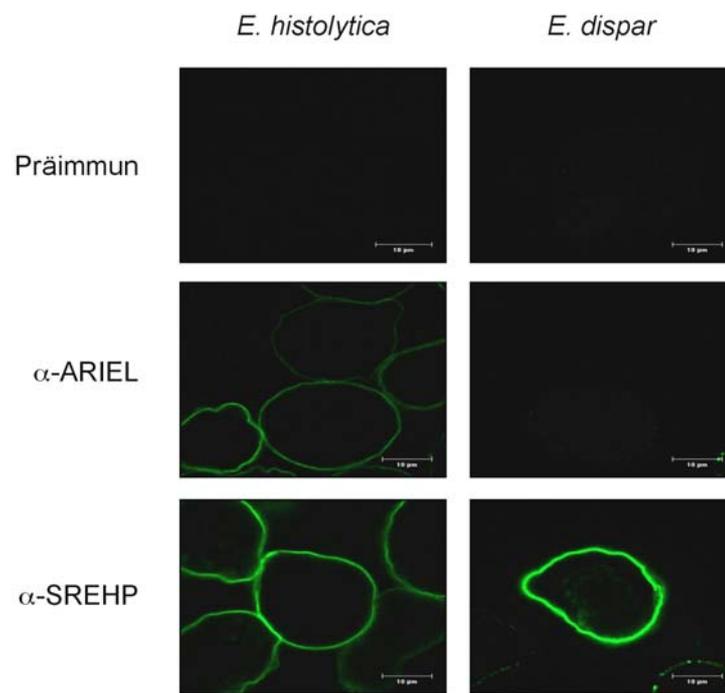


Abbildung 20: Expression und Lokalisation von ARIEL und SREHP in *E. histolytica* und *E. dispar*. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Aufnahmen von fixierten, nicht permeabilisierten Trophozoiten. Nach Inkubation mit einem Präimmun-Kontrollserum, bzw. anti-ARIEL-Immunserum oder anti-SREHP-monoklonalen Antikörpern.

Durch Transfektion von SAW760 mit dem bereits beschriebenen Vektor pNeoAriel und nachfolgender Selektion mit G418 gelang es in der Tat ARIEL-exprimierende *E. dispar*-Trophozoiten zu generieren (Abbildung 21). Immunfluoreszenz-Untersuchungen an ganzen Zellen ergaben, dass das rekombinante Protein, wie ARIEL in *E. histolytica*, primär auf der Oberfläche lokalisiert ist. Die rekombinanten *E. dispar* zeigten hinsichtlich ihrer Morphologisch und in Bezug auf das Wachstumsverhalten keinen Unterschied zu entsprechenden Kontrollzellen.

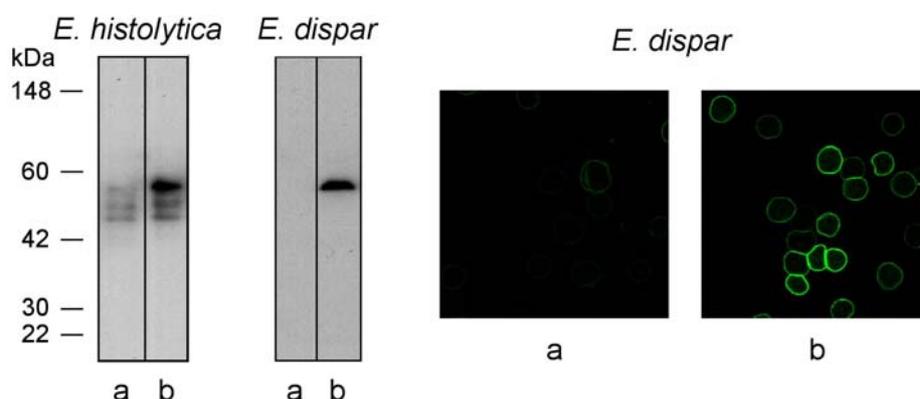


Abbildung 21: Expression von ARIEL in rekombinanten *E. dispar*. Amöben wurden mit (a) dem Kontrollvektor und (b) dem Expressionsvektor, der für vollständiges ARIEL kodiert, transfiziert, mit G418 selektioniert und anschließend (linke Bildhälfte) Western-Blots von Zellextrakten mit anti-ARIEL-Antikörpern (ECL-Plus, Exposition: 3 s) entwickelt. In der rechten Bildhälfte sind Immunfluoreszenz-Aufnahmen der transfizierten *E. dispar* (fixiert, nicht permeabilisiert) ebenfalls mit anti-ARIEL-Antikörpern dargestellt.

3.9 Untersuchungen zum Einfluss der ARIEL-Expression in rekombinanten *E. dispar*

Eine Reihe von Testsystemen wurde in den letzten Jahren entwickelt, um die Virulenz von *E. histolytica* *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Hierzu zählen die Adhärenz der Amöben an eukaryotische Zelllinien, die Zerstörung von Zellmonolayern bei Co-Kultur mit *E. histolytica* (Zytopathogenität), die Erythrophagozytose-Rate und die bereits beschriebene Induktion von Leberabszessen nach Injektion von kultivierten *E. histolytica*-Trophozoiten in die Leber von Wüstenrennmäusen. Die meisten dieser Eigenschaften sind in *E. dispar* nur sehr gering oder gar nicht ausgebildet. Es sollte daher im folgenden untersucht werden, ob irgendwelche dieser Eigenschaften in ARIEL exprimierenden *E. dispar* verändert sind.

3.9.1 Adhärenz von rekombinanten *E. dispar* an CHO-Zellen

Da ARIEL ein Membranprotein ist und der Kontakt von Amöben an Zielzellen ein entscheidender, initialer, pathophysiologischer Schritt ist, sollte der Einfluss von ARIEL auf die Adhärenz von Amöben an Zielzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Amöben mit CHO-Zellen inkubiert. Diese Inkubation wurde bei 4°C durchgeführt, um zu verhindern, dass die CHO-Zellen von den Amöben lysiert werden. Die CHO-Zellen lagern sich an die Amöben und es bilden sich sogenannte Rosetten (Abbildung 22), die anschließend mikroskopisch ausgezählt werden können.

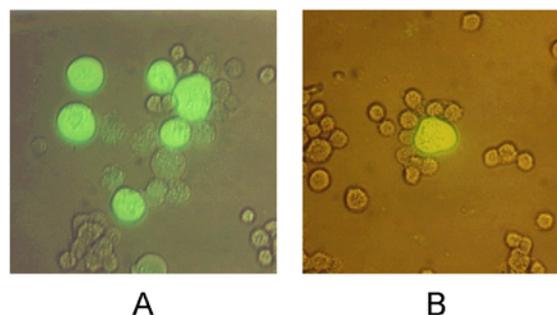


Abbildung 22: CHO-Rosettenbildung von *E. dispar* und *E. histolytica*. (A) *E. dispar*-Trophozoiten bilden kaum Rosetten, sind leicht abgerundet und zeigen viele schwach fluoreszierende Zellreste. Mehrere adhärennte CHO-Zellen wie im Bild rechts oben sind nur selten zu finden und (B) ein *E. histolytica*-Trophozoit bildet eine sogenannte Rosette aus 7 adhärennten CHO-Zellen.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, bildeten *E. dispar* im Gegensatz zu *E. histolytica*-Trophozoiten kaum Rosetten. Pro Experiment wurde für je 100 Amöben die individuelle Anzahl an adhärennten CHO-Zellen gezählt. Es wurden insgesamt sechs unabhängige Versuche in zweifachen Ansätzen durchgeführt. Vergleicht man die Summe der adhärennten CHO-Zellen pro 100 Amöben, ergibt sich für die ARIEL-exprimierenden *E. dispar* ein Wert von $97,6 \pm 28,8$.

Dieses Ergebnis entsprach dem entsprechender Kontrollzellen ($99,8 \pm 21,8$) (Abbildung 23). Es bestand also hinsichtlich der Adhärenz an CHO-Zellen kein signifikanter Unterschied. Es adhärierte im Durchschnitt knapp 1 CHO-Zelle an einem *E. dispar*-Trophozoiten. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde bei untransfizierten *E. histolytica* mehr als die dreifache Anzahl an adhärennten CHO-Zellen gezählt.

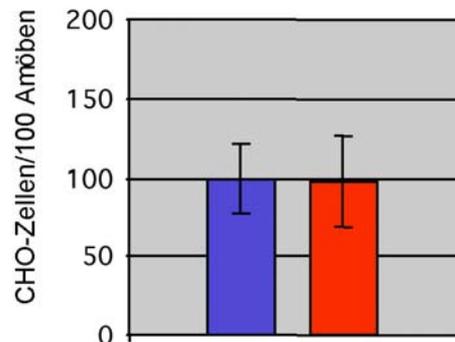


Abbildung 23: Einfluss von ARIEL auf die Adhärenz von CHO-Zellen an rekombinante *E. dispar*. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von CHO-Zellen, die an je 100 gezählten Amöben adhärten. Kontrollzellen (blau), *ariel*-transfizierte *E. dispar*-Trophozoiten (rot).

Betrachtet man die Zahlen innerhalb von Kategorien, die angeben an wieviel Prozent der Amöben keine, 1, 2, 3, 4, 5 oder mehr als 5 CHO-Zellen adhärten, war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den ARIEL-exprimierenden *E. dispar* und den Kontrollzellen feststellbar (Abbildung 24). Nur etwa 53 % der Amöben hatten überhaupt CHO-Zellen adhärnt. Im Gegensatz dazu hatten unter vergleichbaren Bedingungen etwa 82 % der *E. histolytica*-Trophozoiten CHO-Zellen adhärnt. Zusätzlich fand sich ein deutlich höherer Anteil an Amöben mit 4, 5 oder mehr adhärennten CHO-Zellen.

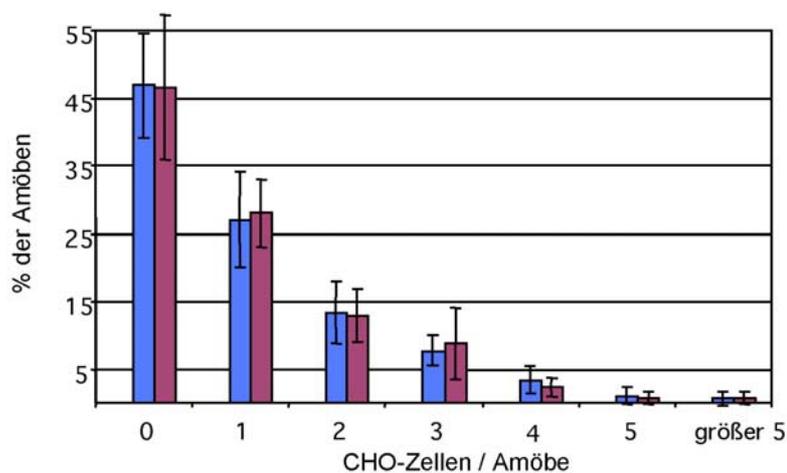


Abbildung 24: Einfluss von ARIEL auf die Bildung von CHO-Zell-Rosetten durch rekombinante *E. dispar*. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Amöben, an denen die, jeweils auf der X-Achse angegebene Anzahl, CHO-Zellen adhärten. Kontrollzellen (blau), *ariel*-transfizierte *E. dispar*-Trophozoiten (rot).

3.9.2 Zytopathogenität rekombinanter *E. dispar*

Die Zytopathogenität, also die Fähigkeit einen Zellrasen zu zerstören, gilt als empfindlicher *in vitro* Test zur Bestimmung der Pathogenität von *E. histolytica*. Amöben werden dazu auf einen konfluenten CHO-Zellrasen gegeben und für eine Stunde bei 37°C co-kultiviert. Anschließend werden die verbliebenen, adhärenen, vitalen CHO-Zellen quantifiziert. Das Ausmaß der Zellrasenzerstörung korreliert dabei direkt mit der Virulenz der Amöben.

Um zu untersuchen, ob die Expression von ARIEL, die geringe Zytopathogenität von *E. dispar* beeinflusst, wurden rekombinante *E. dispar* so wie entsprechende Kontrollzellen in den CHO-Zelltest eingesetzt. Dabei zeigte sich eine relativ starke Interassay-Varianz. ARIEL-exprimierende *E. dispar* zeigten eine Zellrasenzerstörung zwischen 1 und 59 %. Die Werte der Kontrollamöben lagen zwischen 10 und 56 %. Es wurden deshalb insgesamt 11 unabhängige Experimente jeweils mit 6fach-Bestimmung durchgeführt, wobei die Intraassay-Varianz nur gering war. Im Mittel zerstörten ARIEL-exprimierende *E. dispar* 24,8 % ± 18,8 eines CHO-Zellrasens. Die Kontrollzellen zeigten eine Zellrasenzerstörung von 25,4 % ± 14,7. Es bestand somit kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zytopathogenität zwischen ARIEL-exprimierenden *E. dispar* und entsprechenden Kontrollzellen (Abbildung 25).

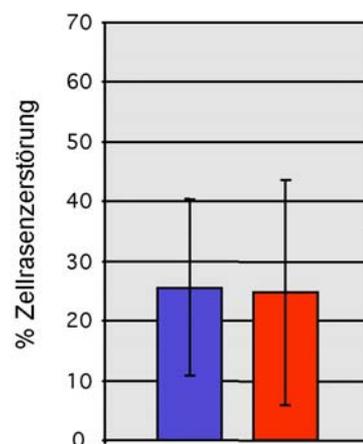


Abbildung 25: Einfluss von ARIEL auf die Zytopathogenität von rekombinanten *E. dispar*. Dargestellt ist der relative Anteil eines CHO-Zellrasens der nach Inkubation mit rekombinanten *E. dispar* zerstört wurde. Kontrollzellen (blau) und *ariel*-transfizierte *E. dispar*-Trophozoiten (rot).

3.9.3 Erythrophagozytose-Rate rekombinanter *E. dispar*

Neben der Adhärenz und der Zytopathogenität gilt die Fähigkeit ganze Erythrozyten zu phagozytieren als wichtig für die Pathogenität von *E. histolytica*. Die Erythrophagozytose der Amöben ist ein Rezeptor-vermittelter Prozess. Allerdings ist der Rezeptor bisher nicht bekannt. Die Erythrophagozytose-Rate rekombinanter, ARIEL-exprimierender *E. dispar* wurde untersucht und mit der entsprechender Kontrollzellen verglichen. In diesem Versuch wurde photometrisch die relative Menge an Hämoglobin quantifiziert, die durch Phagozytose von Erythrozyten in den Amöben in einer Zeiteinheit akkumuliert. Die entsprechenden Versuche wurden 4 mal als

Doppelbestimmungen durchgeführt. Die relative Menge der phagozytierten Erythrozyten wurde nach 5, 10, 20, 30 und 50 min bestimmt. Längere Inkubationszeiten zeigten keinen weiteren Anstieg an phagozytierten Erythrozyten. Wie schon beim Zytopathogenitäts-Assay war auch hier die Interassay-Varianz im Gegensatz zur Intraassay-Varianz relativ hoch. Der Maximalwert der Absorption lag nach 50 min bei ca. 0,12. Es fand sich jedoch kein Unterschied zwischen rekombinanten ARIEL exprimierenden *E. dispar* und den Kontrollzellen (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu wurde in *E. histolytica* unter vergleichbaren Bedingungen nach einer Stunde ein Wert von 0,8 gemessen. Dies entspricht einer vielfach höheren Erythrophagozytose-Rate als in *E. dispar*.

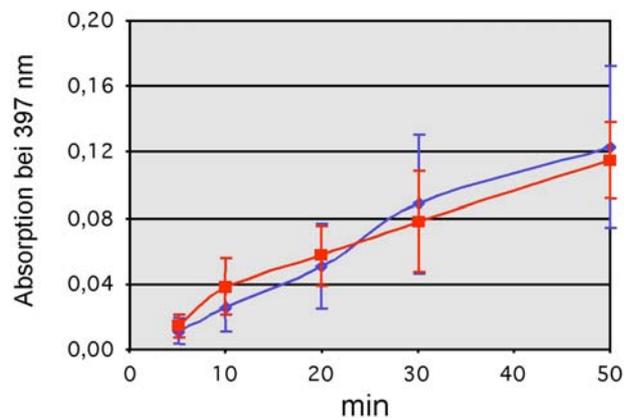


Abbildung 26: Einfluss von ARIEL auf die Erythrophagozytose von rekombinanten *E. dispar*. Dargestellt ist die zeitabhängige Erythrophagozytose-Rate von Kontrollzellen (blau) und *ariel* transfizierten *E. dispar*-Trophozoiten (rot).

3.9.4 Induktion von Leberabszessen nach Injektion von kultivierten Trophozoiten in die Leber von Wüstenrennmäusen

In Abhängigkeit der Virulenz führt die intrahepatische Injektion von 1×10^3 bis 1×10^5 *E. histolytica*-Trophozoiten in Wüstenrennmäusen regelmäßig zur Leberabszessbildung. *E. dispar* fehlt diese Eigenschaft. Selbst die Applikation einer 10fach höheren Dosis (1×10^6 Zellen) führt nicht zur Leberabszessbildung. Es sollte daher untersucht werden, ob die Expression von ARIEL in *E. dispar* die Leberabszessbildung beeinflusst. Dazu wurden 6 Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) mit je 1×10^6 rekombinanten *E. dispar*-Trophozoiten intrahepatisch infiziert. Die Untersuchung dieser Tiere nach einer Woche ergab, dass sich in keinem der Tiere ein Amöbenleberabszess entwickelt hatte.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von ARIEL, einem Protein des pathogenen Protozoons *E. histolytica*, welches in der ansonsten eng verwandten aber apathogenen Spezies *E. dispar* fehlt. Neben der Lokalisation in *E. histolytica* und der biochemischen Charakterisierung des Proteins wurden transgene ARIEL-exprimierende *E. dispar* generiert. Der Phänotyp dieser Zellen, insbesondere hinsichtlich einer möglichen Steigerung pathogener Eigenschaften, wurde analysiert. Darüber hinaus wurden Untersuchungen bezüglich einer möglichen Verwendung von ARIEL als Vakzine zum Schutz vor Amöbiasis durchgeführt sowie der Einsatz als serodiagnostisches Antigen geprüft.

4.1 Mehrere ARIEL-Proteine werden in *E. histolytica*-Trophozoiten exprimiert

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass das Genom von *E. histolytica* mehrere ARIEL-kodierende Gene enthält. Aufgrund von Southern-Blot und cDNA-Analysen wurde vermutet, dass etwa 8 solcher Gene existieren. Da entsprechende Genkopien in *E. dispar* fehlen, ist anzunehmen, dass die *ariel*-Genfamilie in *E. histolytica* durch Genduplikationen entstanden ist, die erst nach der Trennung der beiden Organismen von einem gemeinsamen Vorläufer stattgefunden haben. Die verschiedenen Genprodukte besitzen identische amino- und carboxyterminale Sequenzen und unterscheiden sich lediglich in der Anzahl interner *repeat*-Domänen. Aufgrund von cDNA-Sequenzen war schon vermutet worden, dass verschiedene Mitglieder der ARIEL-Genfamilie in *E. histolytica* Trophozoiten exprimiert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunoblot-Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörpern gegen ARIEL bestätigen diese Vermutung und zeigen, dass in der Tat mindestens 5 ARIEL-Homologe unterschiedlicher Molekularmassen in den Trophozoiten gebildet werden. Die gezielte Überexpression eines einzelnen ARIEL-Gens führte zur Verstärkung einer einzelnen Proteinbande im Western-Blot. Daher kann angenommen werden, dass die einzelnen ARIEL-Homologe offenbar unterschiedliche Genprodukte darstellen und nicht primär das Resultat von Modifikationen eines einzelnen Proteins sind. Auffällig war, dass die im Western-Blot nachgewiesenen Proteine gegenüber dem theoretischen Molekulargewicht von etwa 11 bis 23 kDa deutlich höhere Molekulargewichte von etwa 44 bis 55 kDa aufwiesen. Die Diskrepanz zwischen theoretischem und tatsächlichem Molekulargewicht zeigte sich auch in der SDS-PAGE des bakteriell exprimierten ARIEL (~44 kDa statt 23 kDa), so dass die Größendifferenz offenbar nicht durch posttranslationelle Modifikationen wie N- oder O-Glykosylierung erklärt werden

kann. Vermutlich ist der beobachtete Effekt auf ein retardiertes Laufverhalten des Proteins im Gel zurückzuführen, bedingt durch den hohen Prolin-Gehalt und die Hydrophilizität der *repeats*. Ein ähnliches Phänomen wurde auch für das ARIEL-ähnliche Serin-reiche *E. histolytica* Protein (SREHP) beschrieben (Stanley, 2000).

4.2 Ähnlichkeiten von ARIEL mit bekannten Proteinen

Sieht man von der starken Verwandtschaft zu SREHP einmal ab, so ergeben sich Sequenzhomologien für ARIEL mit anderen Proteinen in erster Linie aus dem hohen Gehalt bestimmter Aminosäuren innerhalb der *repeats*, sind also eher in sogenannten *low-complexity*-Regionen zu finden und somit nur wenig aussagekräftig. Variable *Oktarepeats*, die in bis zu vier Aminosäuren (G-K-E-D-N/G-N/K-K-P) mit denen von ARIEL übereinstimmen, findet man im Protein A, einem Zellwand-assoziierten Protein aus Staphylokokken. Protein A und Immunglobulin-bindende Proteine anderer Pathogene binden die Fc-Regionen der Immunglobuline und bilden vermutlich so einen Schutzmantel aus diesen Molekülen, da deren Fc-Regionen nicht mehr von den Rezeptoren der Leukozyten erkannt werden können. Auch Bindungsstellen für Opsonine werden so maskiert. Daher gilt Protein A als ein Virulenz-Faktor der Staphylokokken (Foster and McDevitt, 1994). Homologe der Protein A-typischen Immunglobulin-bindenden Domänen, die für dessen Funktion essentiell sind, sind in ARIEL jedoch nicht vorhanden. Die Ähnlichkeit dieser beiden Proteine scheint demnach nicht hinreichend für die Annahme einer vergleichbaren Funktion von ARIEL in *E. histolytica* hinsichtlich der Überwindung des Wirts-Immunsystems.

Ähnlichkeiten findet man beim Vergleich der Hydrophobizitätprofile von ARIEL (und auch SREHP) mit den S-Antigenen und dem CS(*circumsporozoite*)-Protein aus Plasmodien. Hydrophobe Amino- und Carboxytermini flankieren charakteristische hydrophile, saure *repeat*-Domänen. Zwischen den *repeat*-Domänen und den hydrophoben Regionen findet man beidseitig kurze Bereiche mit vorwiegend geladenen Aminosäuren (carboxyterminal fehlen diese jedoch bei ARIEL und SREHP). CSP ist ein Membranprotein, welches nur im Sporozitenstadium exprimiert wird und die Bindung an Hepatozyten und somit die Infektiosität der Sporoziten beeinflusst. Die meisten Antikörper gegen CSP sind zwar gegen die *repeats* gerichtet (was auch bei SREHP gezeigt wurde; Wang et al., 1997), weswegen sich Untersuchungen zunächst auf diese Region fokussierten. Wie sich jedoch herausstellte, sind es andere konservierte Regionen innerhalb des CSP, die die Bindung an Zielzellen vermitteln (Holder, 1994), so dass auch hier kein Hinweis auf eine mögliche Funktion von ARIEL zu erhalten ist. S-Antigene werden von den erythrozytären Stadien in die parasitäre Vakuole sezerniert und bei Ruptur des Erythrozyten freigesetzt. Sie sind insbesondere in der *repeat*-Region sehr polymorph und ermöglichen dadurch die Typisierung verschiedener Isolate. S-Antigene haben sich jedoch als nicht besonders

immunogen erwiesen. Ihre Funktion ist nicht bekannt, man stellt sich aber vor, dass sie den Parasiten „verschleiern“ und so eine effektive Immunantwort vermindern. Eine alternative Vorstellung ist, dass sie wie ein „zirkulierender Schwamm“ anhand der vielfach wiederholten Epitope innerhalb der *repeats* effektive Wirts-Antikörper „aufsaugen“ (Bickle et al., 1993).

4.3 ARIEL ist membranständig

ARIEL ist primär auf der Zelloberfläche lokalisiert. Antikörper gegen ARIEL zeigen jedoch in permeabilisierten *E. histolytica*-Trophozoiten auch eine Markierung kleiner intrazellulärer Vesikel. Diese ähneln den sekretorischen Vesikeln durch deren Fusion mit der Zellmembran vermutlich Proteine zur Zelloberfläche transportiert werden. Diese Lokalisation ist vergleichbar mit der von SREHP (Ghosh et al., 1999; Stanley et al., 1995a).

Für die Verankerung der ARIEL-Proteine in der Membran ist der Carboxyterminus des prematuren Polypeptids notwendig, denn das Expressionsprodukt eines Konstruktes, das für ein ARIEL ohne diesen Carboxyterminus kodiert, war nicht mehr auf der Zellmembran zu finden. Es erscheint in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie homogen im Zytoplasma verteilt und in Western-Blots von Zellextrakten in der zytoplasmatischen Fraktion, in der endogenes ARIEL praktisch nicht nachzuweisen ist. Es ist möglich, dass es sich bei dieser carboxyterminalen Sequenz um eine Signalsequenz für einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker handelt. Diese Art der Verankerung von Membranproteinen ist in Eukaryoten und insbesondere in Protozoen weit verbreitet und ein großes Spektrum von Proteinen ist GPI-verankert. Dazu gehören u.a. Enzyme, Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren (Hooper, 2001). GPI-verankerte Proteine findet man in Zellmembranen sowie vielen zellulären Kompartimenten wie endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat oder auch exo- und endozytotischen Strukturen (Weise et al., 2000). Im Unterschied zu Transmembran-Proteinen, in denen der Transmembran-Region carboxyterminal eine hydrophile, zytosolische Domäne folgt, reichen die hydrophoben Signalsequenzen für GPI-Anker bis zum Carboxyterminus des prematuren Polypeptids (Ferguson, 1999). Eine übergeordnete Funktion der GPI-Verankerung von Molekülen kennt man nicht. Die Bedeutung der GPI-Verankerung für die spezifische Funktion von Proteinen ist unklar, da zumindest bei einigen Proteinen ihre Funktion durch Austausch des GPI-Ankers gegen eine Transmembran-Domäne nicht beeinflusst wird (beschrieben in Chatterjee und Mayor, 2001).

Die aminoterminalen Signalsequenz ist ebenfalls Bedingung für eine GPI-Verankerung, da das Protein für diese posttranslationelle Modifikation zum endoplasmatischen Retikulum transportiert werden muss. Hier wird dann von einem Transamidase-Komplex das carboxyterminale Signalpeptid des Proteins abgeschnitten und der so genannte GPI-Anker *en bloc* mit dem neuen Carboxyterminus verknüpft. Eine mögliche aminoterminalen Signalsequenz lässt sich mit Hilfe des Programms SignalP V2.0 (unter www.cbs.dtu.dk) nach der Regel von Heijne (Nielsen et al.,

1997) vorhersagen. Dieser Vorhersage nach endet das Signalpeptid nach Ala₁₃ der ARIEL-(und auch SREHP-)Sequenz. Ghosh und Mitarbeiter (1999) bestimmten so die Signalsequenz der Chitinase aus *E. histolytica* und konnten im Experiment zeigen, dass eine um diese Sequenz verkürzte Chitinase nicht mehr in sekretorischen Vesikeln sondern im Zytoplasma vorlag. Diese Vorhersage-Methode scheint also prinzipiell für Proteine von *E. histolytica* anwendbar zu sein. Wie die aminoternale Signalsequenz unterliegt auch das carboxyterminale Signalpeptid keinem konservierten Sequenz-Motiv sondern kann durch charakteristische Eigenschaften bestimmter Aminosäure-Reste innerhalb der Erkennungs-Sequenz identifiziert werden. Mit Hilfe von Computerprogrammen lassen sich so putative GPI-Verankerungen und die zugehörigen Schnittstellen vorhersagen. Die Vorhersage über den "big-PI Prediction-Server" ergab eine potentielle GPI-Modifikationsstelle für ARIEL zwischen D₂₁₃ und A₂₁₄ der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Eine von dieser Position abweichende GPI-Modifikationsstelle ergab die "DGPI"-Vorhersage (beide zu finden unter www.expasy.org/tools) zwischen Ser₂₀₄ und Ser₂₀₅ (Eisenhaber et al., 1999). Sequenzanalysen von SREHP ergaben diesbezüglich vergleichbare Ergebnisse (Ala₂₁₆-Ala₂₁₇ bzw. Ser₂₀₅-Ser₂₀₆; siehe auch Abbildung 27). In *E. histolytica* findet man bei vier kürzlich identifizierten Cystein-Proteinasen weitere putative GPI-Signalsequenzen mit Hilfe der DGPI-Vorhersage (Bruchhaus et al., 2003).

Der gängigste experimentelle Nachweis einer GPI-Verankerung ist der Verdau mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) und die daraus resultierende Freisetzung des Proteins aus der Membran. Dieser enzymatische Nachweis ist jedoch nur bei GPI-Ankern möglich, die nicht am Inositol acyliert sind (Udenfriend und Kodukula, 1995; Roberts et al., 1988). Diese Modifikation findet man vorwiegend, aber nicht ausschließlich, bei Säugetieren (Brown und Wanek, 1992). Eine weitere Methode zur spezifischen Bestimmung eines GPI-Ankers ist die saure NO₂-Deaminierung (Varki et al., 1999). Beide Methoden wurden in dieser Arbeit zum Nachweis einer möglichen GPI-Verankerung von ARIEL angewendet. Ein GPI-Anker ließ sich allerdings damit nicht nachweisen.

Experimentell nachgewiesen wurden GPI-Anker in *E. histolytica* bisher nur an der 31 kDa Untereinheit eines Oberflächenlektins und der Molekül-Klasse der Proteophosphoglykane (PPG). Die 31 kDa-Untereinheit des Gal/GalNAc-inhibierbaren Lektins ist über einen GPI-Anker, der PI-PLC-resistent ist, mit der Zellmembran verbunden. (McCoy et al., 1993). Man kennt bisher keine Funktion der kleinen Lektin-Untereinheit, und auch die Funktion der GPI-Verankerung ist unbekannt. Es gibt bisher lediglich Hinweise darauf, dass eine Expression dieser Untereinheit ohne carboxyterminale Signalsequenz die Aggregation mit der 170 kDa-Untereinheit zum nativen Heterodimer verhindert (Ramakrishnan et al., 2000). Hinsichtlich einer Notwendigkeit des GPI-Ankers für die Funktion der 31 kDa-Untereinheit ist zu erwähnen, dass eine zweite kleine Untereinheit (35 kDa) des Lektins nachweislich nicht GPI-verankert ist. Vielleicht ist ein GPI-Anker hier nicht notwendig, da die kleine Untereinheit jeweils kovalent mit der großen Untereinheit verbunden ist (McCoy et al., 1993).

Die einzigen PI-PLC-sensitiven GPI-Anker in *E. histolytica* wurden 1992 an Oberflächen-Glykokonjugaten nachgewiesen, gereinigt und untersucht (Stanley et al., 1992; Moody et al., 1997; Moody et al., 1998). Moody-Haupt und Mitarbeiter charakterisierten detailliert die molekularen Beschaffenheiten und insbesondere die GPI-Ankerstrukturen dieser Moleküle. Die GPI-Anker der von ihnen als Proteophosphoglykane (PPG) bezeichneten Molekül-Klasse wiesen eine bis dahin unbekannte und einzigartige Modifikation innerhalb der ansonsten in allen bekannten GPI-Ankern konservierten Glykan-Kernstruktur auf. Neben dieser Substitution des konservierten α 1-2Man-Rests durch einen α Gal-Rest fanden sie eine weitere ungewöhnliche Modifikation der Glykan-Kernstruktur in Form von heterogenen Seitenketten aus 1-20 α Gal-Resten (Moody-Haupt et al., 2000). *E. histolytica* verfügt also nachweislich über GPI-Anker, die jedoch einzigartige Strukturen zeigen und nicht obligatorisch PI-PLC-sensitiv sind.

Trotz einer putativen GPI-Signalsequenz konnten Stanley und Mitarbeiter (1995) für SREHP ebenfalls keinen GPI-Anker nachweisen. Gereinigtes SREHP ist resistent gegenüber PIPLC-Verdau und saurer NO_2 -Deaminierung. SREHP ist über O-Ester-Bindungen acyliert und so vermutlich über einen der zwei Serin-Reste des ansonsten hydrophoben Carboxyterminus in der Membran verankert (Stanley et al., 1995a). Der entsprechende Bereich der diese zwei Serine umgebenden 11 Aminosäuren ist interessanterweise auch in ARIEL hoch konserviert, so dass eine vergleichbare Acylierung und die daraus folgende Membranständigkeit wahrscheinlich ist (siehe Abbildung 27). Außer ARIEL und SREHP konnten jedoch in öffentlichen *E. histolytica*-Datenbanken keine weiteren Proteine mit diesem Motiv identifiziert werden.

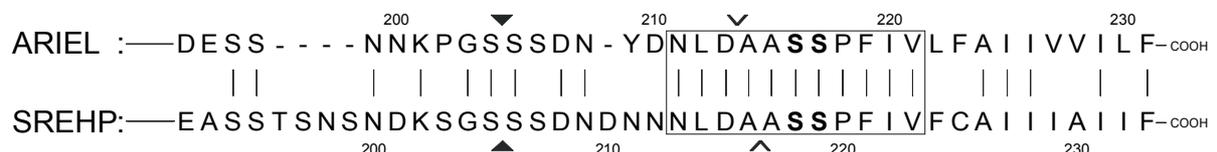


Abbildung 27: Vergleich der carboxyterminalen Aminosäuresequenzen von ARIEL und SREHP. Dargestellt sind abgeleitete Aminosäuresequenzen kodierender Regionen von *ariel* und *srehp*. Innerhalb der Box befinden sich die 11 konservierten Aminosäuren, die die Serin-Reste (fett gedruckt) umgeben, von denen einer vermutlich acyliert ist, und die Membranverankerung vermittelt. Zusätzlich sind die putativen GPI-Schnittstellen nach (v ^) „big PI“- bzw. (v ^) „DGPI“-Vorhersage angegeben.

Für eine GPI-Verankerung von ARIEL spricht lediglich die leichte Veränderung der Mobilität in der SDS-PAGE nach saurer NO_2 -Deaminierung. Da dies unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen auch für SREHP beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass die Mobilität der beiden Proteine durch chemische Nebenreaktionen verändert wurde. Dies insbesondere, da alle Versuche aufgrund des Fehlens gereinigter Proteine nur mit Zellextrakten durchgeführt werden konnten.

4.4 Reinigung und posttranslationelle Modifikationen von ARIEL

Die Reinigung von ARIEL aus *E. histolytica*-Trophozoiten ist trotz Einsatz einer breiten Palette experimenteller Ansätze nicht in ausreichendem Maße gelungen. Insbesondere die unbefriedigenden Ergebnisse der Immunpräzipitationen mit verschiedenen anti-ARIEL-Antikörpern wie auch die NiNTA-Präzipitationen sind hier zu erwähnen und stehen teilweise im Widerspruch zu den hohen Affinitäten der eingesetzten Antikörper in Western-Blot- oder Immunfluoreszenz-Analysen. Die vermutlich geringe Abundanz des Proteins oder auch die notwendige Anwesenheit von Detergenzien in den Extrakten sind vermutlich Ursache für die geringen Proteinausbeuten während der verschiedenen Reinigungsschritte. Die Fusion von ARIEL mit einem HisTag sollte Abhilfe schaffen und die Reinigung des modifizierten Proteins aus rekombinanten Trophozoiten mit einem etablierten System (NiNTA-Chromatographie) ermöglichen. Die mit den entsprechenden Plasmiden transfizierten Trophozoiten exprimierten Genprodukte von erwartetem Molekulargewicht in den entsprechenden Zellfraktionen. Im Fall der membranständigen Form (HisARIEL) fand sich jedoch keine Bindung mit der NiNTA-Matrix. Das carboxyterminal verkürzte HisTag-ARIEL (ARIELHisGPI) band hingegen an die Matrix und ließ sich spezifisch eluieren. Hier befand sich der HisTag direkt carboxyterminal. Der Grund für das unterschiedliche Verhalten der beiden HisTag-ARIELs ist unklar.

Wegen des Fehlens ausreichender Mengen an gereinigtem ARIEL wurden weiterführende Untersuchungen zu posttranslationellen Modifikationen von ARIEL an Trophozoiten-Extrakten durchgeführt und aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich möglicher N-Glykosylierungen erzielt. Insgesamt ist bisher sehr wenig über die Glykosylierungen von Proteinen in *Entamoeba* bekannt. Für Glykoproteine anderer Organismen ist jedoch gezeigt, dass Glykosylierungen eine entscheidende Rolle bei der Funktion spielen. Sie können z.B. Proteine vor proteolytischem Verdau schützen, sie können Affinitäten zwischen Rezeptor und Ligand beeinflussen oder als Signal für intrazellulären Transport dienen. Außerdem können sie essentiell für die korrekte Faltung des naszierenden Polypeptids sein (Lodish et al., 2001). Der bisher einzige experimentelle Nachweis N-glykosidisch gebundener Zucker an einem Amöbenprotein erfolgte am Gal/GalNAc-inhibierbaren Lektin (16 putative N-Glykosylierungsstellen). Mit Hilfe von Tunicamycin, einem spezifischen Hemmer der N-Glykosylierung, bzw. chemischer Deglykosylierung des gereinigten Proteins durch Trifluoromethansulfonsäure (TMFS) reduzierte sich die elektrophoretische Mobilität der 170 kDa-Untereinheit um ca. 10 kDa (Mann et al., 1991).

Trotz der hohen Zahl putativer N-Glykosylierungsstellen (3-10 mal Asn-Glu-Ser in den bekannten ARIELs) scheint ARIEL jedoch nicht derart modifiziert zu sein. Nach Verdau von Amöben-Extrakten mit N-Glycosidase F war keine Änderung der Mobilität von ARIEL in der SDS-PAGE festzustellen. Der N-Glycosidase F-Verdau findet zwar eine breite Verwendung bei der Analyse von Glykoproteinen, ist aber bisher noch nicht mit Proteinen von *E. histolytica*

durchgeführt worden. Da jedoch andere Proteine im Amöbenextrakt nach Behandlung mit N-Glycosidase F eine Größenreduktion in der SDS-PAGE zeigten, scheint ein N-Glycosidase F-Verdau von *E. histolytica*-Glykoproteinen prinzipiell möglich zu sein. Innerhalb der Erkennungssequenz für N-Glykosylierungen (Asn-X-Ser/Thr) steht X für eine beliebige Aminosäure außer Prolin. Prolin in dieser Position verhindert vermutlich die Übertragung des vorsynthetisierten Tetradekasaccharids auf das Amid-Stickstoffatom des Asparagin-Restes der Peptidkette. Einen ähnlichen, wenn auch schwächeren Einfluss hat Prolin in der carboxyterminalen Position nach Ser/Thr (Kobata, 1992; Gavel und von Heijne, 1990). Alle putativen N-Glykosylierungsstellen in ARIEL besitzen einen Prolin-Rest unmittelbar aminoterminal zum Asparagin-Rest. Nach Bause (1983) hat der Prolin-Rest in dieser Position hingegen keinen Einfluss auf mögliche N-Glykosylierungen. Ein Fehlen N-glykosidisch gebundener Zucker trotz einer hohen Zahl (17) putativer Bindungsstellen findet man in *Entamoeba* auch beim 125 kDa-Antigen (Edman et al., 1990). Die Anwesenheit der Erkennungssequenz besagt, wie auch beim 125 kDa-Antigen, nicht die tatsächliche Glykosylierung *in vivo*. Zudem können Glykosylierungen in Anwesenheit, Anzahl oder Art innerhalb einzelner Proteine variieren (Furukawa und Kobata, 1992). Schätzungen zufolge sind insgesamt mehr als die Hälfte aller Proteine glykosyliert, wovon wiederum 90 % entweder nur N- oder aber N- und O-glykosyliert sind (Apweiler et al., 1999).

Beim klassischen N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharid befindet sich ein bestimmtes Kernoligosaccharid kovalent verknüpft am Amid-Stickstoffatom des Asparagins der Peptidkette. Dieses Kernoligosaccharid trägt wiederum verschiedene weitere Oligosaccharid-Ketten. Man kennt bei Eukaryoten bisher nur eine Ausnahme N-glykosidisch gebundener Zucker, bei denen nicht dieses Kernoligosaccharid über das Asparagin mit der Peptidkette verbunden ist (Spiro, 2002). Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, dass ARIEL N-glykosyliert ist, aber das Oligosaccharid nicht die Spezifität der N-Glycosidase F erfüllt und deshalb nicht geschnitten werden kann, eher gering einzuschätzen. Eine andere Modifikation, die einen Verdau durch die N-Glycosidase F verhindern würde, ist ein zusätzlicher α 1-3Fucose-Rest am Kernoligosaccharid, der jedoch nur bei Glykoproteinen aus Pflanzen und Insekten verbreitet ist. Insgesamt ist daher davon auszugehen, dass zumindest keine klassische N-Glykosylierung von ARIEL unter den gegebenen Kulturbedingungen erfolgt.

Ein Nachweis O-glykosidisch gebundener Zucker ist im Vergleich zu N-Glykosylierungen aus mehreren Gründen schwieriger. Es fehlt ein Enzym mit vergleichbar breiter Spezifität, da die kommerziell erhältliche O-Glycosidase ausschließlich das unsubstituierte Disaccharid Gal β (1-3)-GalNAc von Ser/Thr-Resten entfernt. Trotz der Tatsache, dass O-gebundene Zucker generell wesentlich weniger komplexe und kleinere Oligosaccharid-Ketten tragen, sind Modifikationen des verdaubaren Disaccharids sehr verbreitet und reduzieren somit den Nutzen der O-Glycosidase. Durch die kleineren Zuckerketten wird der Nachweis durch die Veränderung der Mobilität in der SDS-PAGE erschwert. Spezifische Inhibitoren der O-Glykosylierung sind bisher

nicht bekannt (Rehm, 2000). Eine O-Glykosylierung von ARIEL konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Interessant ist hinsichtlich möglicher posttranslationeller Modifikationen von ARIEL ein Vergleich der Ergebnisse entsprechender Untersuchungen von SREHP und den ebenfalls bereits erwähnten Proteophosphoglykanen (PPG). Sie geben gleichzeitig Beispiele für weitere Arten von Glykosylierungen (Phosphoglykosylierung und Modifikation durch O-GlcNAc) und Phosphorylierung.

PPG sind auf der Zelloberfläche der Trophozoiten zu finden. Man unterscheidet PPG1 und PPG2. PPG2 erscheinen in der SDS-PAGE als polydisperse Bande mit einer Größe von 33-56 kDa (PPG1: 100-190 kDa). Sie sind weniger negativ geladen als PPG1 und zeigen einen geringen Peptid-Gehalt. Die Peptidkomponenten der PPG sind relativ sauer und reich an Asp-, Glu-, Lys- und Ser-Resten (Moody-Haupt et al., 2000). Die sauren *repeat*-Domänen von SREHP und ARIEL zeigen ebenfalls einen hohen Gehalt an diesen Aminosäuren (insbesondere Serin), wobei ARIEL sich von den PPGs und SREHP durch die charakteristisch hohe Anzahl an Asn-Resten unterscheidet. ARIEL und SREHP sind, wie auch die PPG, negativ geladen, wie durch die zweidimensionale SDS-PAGE gezeigt werden konnte. Innerhalb der PPG-Polypeptide ist weiterhin eine Glykosylierung auffällig. Wahrscheinlich spielen dabei die Serin-Reste eine entscheidende Rolle, da sie zu 60% als Phosphoserine vorliegen, über die vermutlich lineare, 2-23 α 1-6Glc-Reste lange Glykane verknüpft sind. SREHP ist zwar an Serin-Resten phosphoryliert, Glykane, wie sie in den PPG vorkommen, sind jedoch nicht nachgewiesen worden. Aufgrund des hohen Serin-Gehalts innerhalb der *repeats* ist diese Modifikation jedenfalls auch für ARIEL vorstellbar. Es ist nach wie vor ungeklärt, warum SREHP als Membranprotein (ein Protein des sekretorischen Weges, das keine zytosolische Domäne aufweist) Modifikationen zeigt, die ansonsten zytoplasmatischen oder nukleären Proteinen vorbehalten sind. Dies gilt ebenso für die terminalen O-GlcNAc-Monosaccharide, die für SREHP nachgewiesen wurden. Diese Art der Modifikation findet man in allen bisher untersuchten Eukaryoten. Sie hat induzierbaren, dynamischen Charakter und ist eher analog zur Phosphorylierung als zur klassischen O-Glykosylierung. Es sind ebenfalls Serin und Threonin-Reste, die derart modifiziert werden und die Regionen ähneln denen, die auch durch Protein-Kinasen phosphoryliert werden. Verschiedene Moleküle wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Zytoskelett-Komponenten oder metabolische Enzyme unterliegen dieser, vermutlich der Phosphorylierung entgegenwirkenden, Regulation (Hart, 1997; Wells und Hart, 2003). Obwohl diese Modifikationen ebenfalls für ARIEL denkbar sind, konnten sie hier nicht untersucht werden, da hierfür eine Reinigung des Proteins notwendig gewesen wäre.

4.5 Expression von ARIEL in *E. histolytica* und *E. dispar*

Anhand der bisher ermittelten Unterschiede zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* lässt sich der Unterschied der beiden Amöbenspezies hinsichtlich ihres pathogenen Potentials nicht ausreichend erklären. Die postulierten Pathogenitätsfaktoren Gal/GalNAc-inhibierbares Lektin, Cystein-Proteinasen und Amoebapores kommen ausnahmslos in beiden Organismen vor, wengleich *E. dispar* im Vergleich zu *E. histolytica* geringere Cystein-Proteinase- und Amoebapore-Aktivitäten und eine schwächere Expression des Lektins aufweist (Bruchhaus et al., 1996; Leippe et al., 1993; Pillai et al., 2001). Wenn auch nicht davon auszugehen ist, dass die Pathogenität von *E. histolytica* nur durch einen einzigen Faktor bedingt wird, so ist doch die *E. histolytica*-Spezifität von ARIEL einer der auffälligsten bisher ermittelten Unterschiede.

Es existieren in *E. histolytica* bisher nur begrenzte Möglichkeiten, durch gezielte genetische Einflussnahme die Bedeutung einzelner Moleküle *in vivo* zu untersuchen. Dazu gehört die stabile episomale Transfektion (Hamann et al., 1995). Mit dieser Methode konnte die Überexpression eines ARIEL-Proteins um das ca. 5fache in *E. histolytica* bewirkt werden. Diese Überexpression hatte jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf Morphologie oder Wachstum der rekombinanten Amöben. Eine erfolgreiche Überexpression ist nicht zwingend zu erwarten gewesen. Zwar konnten bereits verschiedene heterologe und homologe Proteine (Chloramphenicol-Acetyltransferase, antioxidative Enzyme, eine leichte Meromyosin-Domäne, Myosin IB, ein organell-spezifisches HSP60 und Cystein-Proteinase 2) rekombinant in Amöben exprimiert werden (Hamann et al., 1995; Wassmann et al., 1999; Arhets et al., 1998; Mai et al., 1999; Hellberg et al., 2001), die Cystein-Proteinasen 1 und 5 sowie Amoebapores ließen sich jedoch mit demselben Expressionssystem nicht überexprimieren. Unter Umständen ist dies darauf zurückzuführen, dass diese Proteine, da sie an Proteinabbau und Zell-Lyse beteiligt sind, bei erhöhter Expression für die Amöben toxisch sind (Hellberg et al., 2001). Die Transfektion von *E. dispar* mit denselben Vektoren lieferte vergleichbare Ergebnisse wie in *E. histolytica*. Die *E. histolytica*-Lektin-Promotoren der verwendeten Vektoren ermöglichen also prinzipiell auch eine Genexpression in *E. dispar* (Hellberg et al., 2001). In der Tat konnte ARIEL nicht nur in *E. histolytica* überexprimiert werden sondern ließ sich auch in *E. dispar* exprimieren. Somit wurde erstmalig ein *E. histolytica*-spezifisches Protein von *E. dispar* produziert. Rekombinante *E. dispar* zeigten jedoch keine auffälligen Veränderungen hinsichtlich Morphologie oder Wachstum, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Expression von ARIEL unter den normalen Kulturbedingungen keinen negativen Einfluss auf die Zellen zu haben scheint. Die Lokalisation des rekombinanten ARIEL in *E. dispar* war mit der des endogenen und des rekombinanten ARIEL in *E. histolytica* vergleichbar. Auch die Mobilität der rekombinanten Proteine beider Amöbenspezies in der SDS-PAGE war identisch, so dass man vermuten kann, dass die Proteine auch identisch prozessiert werden. Mit der Möglichkeit der Expression von

ARIEL in *E. dispar* stand somit ein Modell zur Verfügung, um mögliche phänotypische Eigenschaften zu untersuchen und so eine mögliche Funktion für ARIEL zu identifizieren.

4.6 Ein Einfluss von ARIEL auf Pathogenität oder Virulenz konnte nicht nachgewiesen werden

Eine Vielzahl biologischer Assays wurde in der Vergangenheit eingesetzt um Pathogenität und Virulenz verschiedener *Entamoeba*-Populationen *in vitro* und *in vivo* vergleichen bzw. quantifizieren zu können. Dazu gehören vor allem die Induktion von Leberabszessen in Wüstenrennmäusen (Chadee und Meerovitch, 1984) oder die Bestimmung der Zytopathogenität, (die Eigenschaft, Säugetier-Zellrasen zu zerstören; Bracha und Mirelman, 1984), der Erythrophagozytose-Rate (Orozco et al., 1988) oder der Adhärenz an Zielzellen (Ravdin und Guerrant, 1981). Diese Untersuchungen wurden im Zuge dieser Arbeit mit rekombinanten *E. dispar* durchgeführt, um eine mögliche Bedeutung von ARIEL für die Pathogenität von Amöben festzustellen. Sollte ARIEL eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von *E. histolytica* spielen, wären die rekombinanten, ARIEL-exprimierenden *E. dispar* vermutlich gut geeignet, dies in den genannten *in vitro* oder *in vivo*-Experimenten darzustellen.

Ein erster und essentieller pathophysiologischer Schritt ist die Adhärenz der Trophozoiten an Zielzellen. Da CHO-Zellen deutlich weniger (ca. 40 %) an *E. dispar* als an *E. histolytica* adhäreren (Dodson et al., 1997), bestand die Möglichkeit, dass ARIEL als Oberflächenprotein von *E. histolytica* an dieser Adhärenz beteiligt ist. Die erzielten Ergebnisse lieferten hierfür jedoch keine Hinweise. Im Gegensatz zu ARIEL scheinen SREHP, PPG und insbesondere das Gal/GalNAc-inhibierbare Lektin jedoch einen Einfluss auf die Adhärenz zu haben, denn Antiserum und monoklonale Antikörper gegen rekombinantes SREHP oder auch PPG reduzieren die Adhärenz von Trophozoiten an CHO-Zellen (Stanley et al., 1990; Zhang et al., 1994a; Stanley et al., 1992). Antikörper gegen die 170 kDa-Untereinheit des Lektins können sogar, in Abhängigkeit der gebundenen Domäne, die Adhärenz inhibieren oder stimulieren (Petri et al., 1990), weswegen dem Lektin neben der Adhärenz noch weitere für die Pathogenität wichtige Funktionen zugeschrieben werden. Natürlich besteht die Möglichkeit, dass ARIEL Einfluss auf die Adhärenz an andere Zellen oder Moleküle hat, die hier nicht untersucht wurden.

Auch ein Einfluss von ARIEL auf die Zytopathogenität von Trophozoiten konnte nicht festgestellt werden. *E. dispar* weist in der Regel eine geringere Zytopathogenität als *E. histolytica* auf (Burchard und Bilke, 1992; Hellberg et al., 2001). Die Zytopathogenität beruht zwar zum Teil auf einer unterschiedlichen Expression und Aktivität von Cystein-Proteinasen (Hellberg et al., 2001), weitere Moleküle wie z.B. das Lektin oder Amoebapores scheinen jedoch ebenfalls einen Einfluss zu haben, da durch Inhibition der Expression von Amoebapore A oder der 35 kDa-Untereinheit des Lektins die Zytopathogenität reduziert wurde (Ankri et al., 1999; Bracha et al.,

1999). Die rekombinante Expression von ARIEL in *E. dispar* hatte keinen Einfluss auf die begrenzte Fähigkeit dieser Amöben, CHO-Zellverbände zu zerstören.

In einem weiteren *in vitro*-Assay wurde die Erythrophagozytose rekombinanter *E. dispar* gemessen. Über den Zusammenhang zwischen Erythrophagozytose und Virulenz von Amöben werden in der Literatur widersprüchliche Angaben gemacht. In einigen Arbeiten wurde eine klare Korrelation zwischen Erythrophagozytose-Rate und Pathogenität von *E. histolytica* beschrieben (Trissl et al., 1978; Gonzalez-Garza et al., 2000), während dies in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden konnte (Tsutsumi et al., 1992; Montfort et al., 1993). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde im Vergleich zu *E. histolytica* eine deutlich geringere Phagozytose-Rate für *E. dispar* gefunden. Allerdings wurde diese durch rekombinante Expression von ARIEL nicht beeinflusst.

Ein weiterer gravierender Unterschied zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* besteht in der Fähigkeit, Leberabszesse in Labortieren zu induzieren. Während die Injektion von 1×10^4 bis 1×10^5 *E. histolytica*-Trophozoiten in die Leber von Wüstenrennmäusen regelmäßig zur Bildung von Leberabszessen führt, werden solche pathologischen Veränderungen nach Injektion von *E. dispar* selbst bei Applikation von 100fach höheren Dosen nicht gesehen. Lediglich kleine, lokale Entzündungen sind vorübergehend beobachtet worden (Espinosa-Cantellano et al., 1997). Es bestand die Möglichkeit, dass ARIEL für die Ausbildung von Leberabszessen oder für das Überleben der Amöben im Gewebe von Bedeutung ist. Die durchgeführten Experimente lieferten jedoch auch hierfür keine Hinweise, da die ARIEL-exprimierenden *E. dispar* wie auch die Kontrollen nach intrahepatischer Injektion in den Wüstenrennmäusen keine Abszessbildung induzierten. Für eine Untersuchung des Einflusses von ARIEL auf den Verlauf einer invasiven Amöbiasis bis hin zur hämatogenen Streuung der Trophozoiten im Menschen steht allerdings noch kein etabliertes Tiermodell zur Verfügung.

Die hier durchgeführten Untersuchungen erbrachten keinen Hinweis dafür, dass ARIEL ein Pathogenitätsfaktor ist. Wie bereits erwähnt, ist jedoch die Pathogenität vermutlich das Resultat einer Interaktion mehrerer Faktoren, so dass die Expression von ARIEL in *E. dispar* nur bedingt Rückschlüsse erlaubt. Zudem wäre es möglich, dass die Funktion von ARIEL auch an die gleichzeitige Expression mehrerer Genkopien gekoppelt ist und deswegen durch Transfektion von nur einer Genkopie kein Effekt erzielt wird.

4.7 ARIEL besitzt kein Impfstoff-Potenzial und eignet sich nicht als diagnostisches Antigen

Da der Mensch der einzige relevante Wirt für *E. histolytica* ist und kein weiteres Reservoir existiert, könnte allein durch die schlichte Verbesserung der Hygiene eine Übertragung der Amöben maßgeblich unterbunden werden und im günstigsten Fall zur Ausrottung der Amöbiasis führen. Aufgrund der gegenwärtigen Situation in vielen Ländern der Erde ist dieses jedoch in absehbarer Zeit nicht zu erwarten. Ganz im Gegenteil wurden in neueren Studien teils unerwartet hohe Prävalenzen von *E. histolytica* in einigen Ländern festgestellt (Braga et al., 1998; Abd-alla und Ravdin, 2002). Eine effektive Kontrolle der Amöbiasis scheint daher nur durch den Einsatz einer geeigneten Vakzine realisierbar (Stanley, 2003). Bisherige epidemiologische Studien in endemischen Gebieten haben jedoch noch keine Hinweise auf eine langanhaltende Schutzwirkung nach einer vorausgegangenen Amöbeninfektion ergeben (Blessmann et al., 2002; Haque et al., 2001). Andererseits wurden im Tiermodell insbesondere mit SREHP und dem oben beschriebenen Oberflächenlektin vielversprechende Impfergebnisse erzielt. Es bleibt jedoch abzuwarten, inwieweit die Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen übertragbar sind. Es wurde auch bisher keines der untersuchten Antigene im Menschen getestet. Zudem ist die Form der Induktion der Leberabszesse durch intrahepatische Injektion von bis zu 1×10^6 Amöben nicht mit der natürlichen Infektion vergleichbar, da die Infektion im Menschen über den Blutkreislauf durch vergleichsweise wenige Trophozoiten erfolgt. Auch der Zeitraum innerhalb dessen die Schutzwirkung untersucht wurde, ist mit 1-3 Wochen nur sehr kurz und sagt daher wenig über einen Langzeitschutz aus. Darüber hinaus wird für die Induktion der Abszesse in der Regel ein Laborstamm (HM1:IMSS) verwendet, der unter Umständen eine andere Virulenz aufweist als „wild-typ“-*E. histolytica* (Stanley, 2000).

Die ausbleibende Schutzwirkung nach Immunisierung mit rekombinantem ARIEL im Vakzinierungs-Versuch (siehe 3.2.1) ist aufgrund gegenteiliger Ergebnisse mit SREHP (Zhang et al., 1994a/b), das im gleichen Tiermodell bis zu 100 % Schutz vor Abszessbildung bewirkt, etwas unerwartet gewesen. Das Potenzial von ARIEL wurde diesbezüglich, insbesondere aufgrund der Ähnlichkeit zu SREHP, sehr viel höher eingeschätzt. Auch die anti-ARIEL-Antikörper-Titer der immunisierten Versuchstiere (siehe Tabelle 5) waren zwar signifikant, im Vergleich zu anderen rekombinanten Antigenen aber deutlich geringer (persönliche Mitteilung Dr. H. Lotter). Dass signifikante Serumantikörper-Titer gegen Oberflächenstrukturen der Amöben nicht automatisch Schutz vor Abszessbildung bewirken, wurde auch schon bei früheren Untersuchungen mit rekombinanten Domänen der 170 kDa-Untereinheit des Gal/GalNAc-inhibierbaren Lektins beobachtet. Dieselbe Studie zeigte jedoch gleichzeitig die strenge Korrelation zwischen dem Antikörper-Titer gegen andere Domänen des Moleküls und einer deutlichen Schutzwirkung (Lotter et al., 1997). Warum ARIEL und SREHP sich in ihrer Immunogenität so deutlich

voneinander unterscheiden ist nicht klar. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Antigenität von SREHP im wesentlichen auf die *repeat*-Region beschränkt ist. Wang und Mitarbeiter (1997) hatten die Reaktivitäten von Seren von Amöbenleberabszess-Patienten mit synthetischen überlappenden Oktapeptiden der kompletten SREHP-Sequenz (ohne das aminoterminal Signalpeptid) untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Oktapeptide, die mit den Patientenserum reagierte, fast ausschließlich aus der zentralen charakteristischen *repeat*-Region von SREHP stammten. Diese immunogenen *repeats* von SREHP sind hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung und Sequenz den *repeats* von ARIEL sehr ähnlich. Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied im Asparagin-, Alanin- und Threonin-Gehalt, der möglicherweise den ermittelten Unterschied in der Antigenität ausmacht.

Die Ergebnisse der im ELISA untersuchten Seren (siehe 3.2.2) bestätigten das Gesamtbild der schwachen Immunogenität von ARIEL in Form der durchgehend geringen Reaktivität mit dem rekombinanten Protein und lassen neben dem fehlenden Impfstoff-Potenzial ebenfalls keine besondere Eignung von ARIEL zur spezifischen Serodiagnose einer *E. histolytica*-Infektion erkennen. Die Kontrolluntersuchungen derselben Seren im ELISA gegen rekombinantes P1, einem immunogenen Oberflächen-Antigen aus *E. histolytica*, zeigten erwartete Ergebnisse von über 80 % der *E. histolytica*-Infizierten, obwohl die Reaktion von Seren von Abszess-Patienten mit diesem Antigen bis zu 100 % betragen kann (Lotter et al., 1997). Weitere Antigene wie z.B. rekombinantes SREHP oder auch ein 29 kDa-Oberflächen-Antigen reagierten in anderen Studien ebenfalls zu 82 bzw. 92 % mit Seren von Leberabszesspatienten bzw. von Patienten mit amöbenbedingten Durchfällen (Stanley et al., 1991; Lee et al., 2000). In Übereinstimmung mit früheren Studien zeigten selbst asymptomatische Träger von *E. histolytica* überzufällig häufig eine positive Antikörperantwort gegen rekombinantes P1 (Ravdin et al., 1990; Jackson et al., 1985), während dies bei Trägern von *E. dispar* nicht nachzuweisen war. Die relativ hohe Zahl an reaktiven Seren nicht-infizierter Personen ist darauf zurückzuführen, dass Antikörper vorausgegangener *E. histolytica*-Infektionen über längere Zeit im Serum persistieren können (Lotter et al., 1997). Daraus ergibt sich in Endemie-Gebieten ein gewisser Prozentsatz an nicht-infizierten Personen mit positiver Serologie, was ein Grundproblem der serologischen Diagnostik darstellt.

4.8 Ausblick

Vergleiche zwischen pathogenen Mikroorganismen und eng verwandten aber apathogenen Spezies ist ein häufig verwendetes Verfahren, insbesondere in der Bakteriologie, um mögliche Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren. Allerdings werden regelmäßig mehrere Unterschiede gefunden, die dann im Einzelnen auf ihre Bedeutung für die Pathogenität untersucht werden müssen. Entsprechend wurde in dieser Arbeit das Asparagin-reiche *E. histolytica* Protein (ARIEL) näher charakterisiert. Die durchgeführten Untersuchungen lieferten allerdings keinen Hinweis, dass das Protein für die Pathogenität von *E. histolytica* von Bedeutung ist. Die Versuchsanordnungen, mit denen dies hier untersucht wurde, können jedoch einen Zusammenhang zwischen ARIEL und der Pathogenität von *E. histolytica* nicht ausschließen. Die fehlende Expression von ARIEL in *E. dispar* ist bisher einer der auffälligsten Unterschiede zwischen den beiden Spezies, weswegen die weitere Suche nach einer Funktion durchaus sinnvoll erscheint. Hinweise auf eine Funktion von ARIEL könnte z.B. die Untersuchung der ARIEL-Expression unter verschiedenen Lebens- bzw. Stressbedingungen liefern. Es gibt auch noch keine Daten über die Varianz von ARIEL zwischen verschiedenen *E. histolytica*-Isolaten, z.B. unter besonderer Berücksichtigung der jeweiligen Virulenz.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass durch fortschreitende Genom-Sequenzierungen weitere Spezies-spezifische Gene in *E. histolytica* nachgewiesen werden. Zur Einschätzung möglicher Funktionen neuer putativer Pathogenitätsfaktoren wäre die Untersuchung mit dem hier angewandten Methodenspektrum sicherlich sinnvoll. Darüber hinaus könnten in Zukunft andere Methoden, insbesondere solche zur spezifischen Inhibition der Genexpression mittels antisense-RNA, RNAi (RNAinterference) oder andere derzeit in Entwicklung stehende Techniken, zur Funktionsanalyse beitragen. Erste Versuche zur antisense-RNA oder RNAi Inhibition in *E. histolytica* sind zwar schon mit Erfolg durchgeführt worden, die Systeme sind jedoch noch nicht soweit ausgearbeitet, dass sie routinemäßig für die Amöben anzuwenden sind.

Die Bestrebungen, eine Vakzine gegen die Amöbiasis zu entwickeln, sind bisher zum größten Teil auf das mehrfach erwähnte Lektin und SREHP bzw. Domänen dieser Moleküle gerichtet. Die Untersuchung des möglichen Vakzine-Potenzials von ARIEL war aufgrund seiner Ähnlichkeit mit SREHP vielversprechend und damit notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch an der Nutzbarkeit von ARIEL als Vakzine zweifeln. Es erscheint daher sinnvoll zunächst andere Impfkandidaten weiter zu verfolgen. Ähnliches gilt für die Eignung von ARIEL als serodiagnostisches Antigen. Wie bereits erwähnt, ist die Serodiagnostik in endemischen Gebieten aufgrund der erhöhten Antikörperprävalenz von Personen ohne akute Infektion problematisch. Ein spezifischer Nachweis von Amöbenantigenen im Stuhl hingegen ermöglicht

auch in Endemie-Gebieten die Diagnose einer akuten Infektion. ARIEL wäre aufgrund seines Fehlens in *E. dispar* prinzipiell ein ideales Antigen für den spezifischen Nachweis von *E. histolytica* in Stuhlproben und hätte in dieser Hinsicht u.U. einen Vorteil gegenüber den bisher kommerziell erhältlichen Assays. Voraussetzung dafür wäre allerdings eine ausreichende Menge von ARIEL in *E. histolytica* positiven Stuhlproben. Die geringe Abundanz des Proteins, zumindest in Trophozoiten, spricht bisher allerdings gegen die Möglichkeit das Molekül als Zielprotein zum Antigennachweis in Stuhlproben zu verwenden.

Obwohl die Funktion von ARIEL bisher nicht geklärt wurde, ist die Tatsache, dass das Protein rekombinant in *E. histolytica* wie auch in *E. dispar* exprimiert werden konnte, sicherlich hilfreich für zukünftige Studien. Der Unterschied in der Pathogenität der beiden Organismen basiert vermutlich auf der Interaktion verschiedener Faktoren. In zukünftige Untersuchungen zur Klärung dieser Interaktionen wird dabei sicherlich ARIEL miteinbezogen werden müssen.

5. Zusammenfassung

Entamoeba histolytica und *Entamoeba dispar* sind zwei phylogenetisch eng verwandte Protozoen-Spezies. Beide können den Darm des Menschen besiedeln, aber nur die Infektion mit *E. histolytica* führt zu invasiven Krankheitsverläufen wie Amöbenruhr oder Amöbenleberabszess (Amöbiasis). Die genauen Pathomechanismen, die zu diesen zum Teil lebensgefährlichen klinischen Manifestationen führen, sind bisher nur unzureichend verstanden, insbesondere da solche Parasitenproteine, die für die Pathogenität von *E. histolytica* verantwortlich gemacht werden, auch in *E. dispar* nachgewiesen wurden. Umfangreiche genetische Vergleichsuntersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass sich die beiden Spezies kaum unterscheiden. Einer der wenigen Unterschiede besteht in einer Familie Asparagin-reicher Proteine, genannt ARIEL, die in *E. histolytica* von mindestens 8 Genen kodiert werden, während entsprechende Genkopien in *E. dispar* vollständig fehlen. Im Zuge dieser Arbeit wurde ARIEL näher untersucht.

Mindestens 5 verschiedene ARIEL-Proteine mit Molekulargewichten von ~44 bis 55 kDa werden von den Amöben unter Kulturbedingungen exprimiert. Es handelt sich dabei nicht um Isoformen eines einzelnen Genproduktes sondern um die Genprodukte verschiedener *ariel*-Gene, wie durch Überexpression einer einzelnen *ariel*-Genkopie in *E. histolytica* gezeigt werden konnte. ARIEL ist membranständig und sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Transfektionsexperimente mit entsprechenden Deletionskonstrukten ergaben, dass der carboxyterminale Bereich des prematuren Proteins für die Membranständigkeit von Bedeutung ist. Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine Membranverankerung durch die in Protozoen weitverbreiteten GPI-Anker unwahrscheinlich erscheinen. Vermutlich erfolgt die Membranverankerung über eine Acylierung eines carboxyterminal gelegenen Serin-Restes, wie es bereits für ein sehr ähnliches Oberflächenprotein von *E. histolytica* postuliert wurde.

Trotz Anwendung eines breiten Methodenspektrums gelang es nicht, ARIEL aus Amöbenlysaten zur Homogenität zu reinigen. Mögliche posttranslationelle Modifikationen ließen sich daher nur unzureichend charakterisieren. Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass eine klassische N-Glykosylierung trotz mehrerer putativer N-Glykosylierungsstellen innerhalb der ARIEL-Sequenz weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Um das Protein weitergehend zu charakterisieren und insbesondere um eine mögliche Bedeutung für die Pathogenität der Amöben zu untersuchen, wurden transgene *E. histolytica* generiert, die ARIEL überexprimierten. Durch episomale Transfektion eines entsprechenden Expressionsvektors, der eine vollständige *ariel*-Genkopie enthielt, konnte eine signifikant verstärkte Expression eines einzelnen ARIEL-Proteins in *E. histolytica* erzielt werden.

Gegenüber entsprechenden Kontrollzellen zeigten diese ARIEL-überexprimierenden Zellen jedoch keinerlei Auffälligkeiten hinsichtlich ihrer Morphologie oder ihres Wachstums.

Neben der Überexpression von ARIEL in *E. histolytica* gelang es, ARIEL auch in *E. dispar* zu exprimieren. Das Protein wurde in transgenen *E. dispar* in etwa vergleichbarer Menge wie bei der Überexpression in *E. histolytica* gebildet. Darüber hinaus stimmten Mobilität in der SDS-PAGE und zelluläre Lokalisation des rekombinanten Proteins in beiden Organismen überein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Prozessierung des Proteins in beiden Organismen identisch verläuft.

Verschiedene etablierte *in vitro*- und *in vivo*-Testsysteme zur Abschätzung der Virulenz transgener, ARIEL-exprimierender *E. dispar* wurden durchgeführt. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen weder die pathophysiologisch wichtige Adhärenz der Amöben an Zielzellen, noch die Eigenschaft Säugetier-Zellrasen zu zerstören (Zytopathogenität) gesteigert war. Auch die Phagozytose-Fähigkeit der Amöben war nicht beeinflusst, und im Gegensatz zu *E. histolytica* waren die transgenen *E. dispar* nicht in der Lage, Leberabszesse in entsprechenden Labortieren zu induzieren.

Die Vakzinierung von Labortieren mit gereinigtem, in *Escherichia coli* rekombinant exprimierten, ARIEL erzeugte im Gegensatz zu anderen Membranproteinen aus *E. histolytica* keinen Schutz vor der Ausbildung von Amöbenleberabszessen. Es zeigte sich, dass ARIEL offenbar wenig immunogen ist, da immunisierte Tiere nur sehr schlecht Antikörper gegen das Protein bildeten. Darüber hinaus ergaben serologische Untersuchungen, dass nur wenige Menschen mit Amöbiasis signifikante Antikörperspiegel gegen ARIEL entwickeln.

Zusammengenommen ergaben die durchgeführten Untersuchungen keinen Hinweis dafür, dass ARIEL für die Pathogenität von *E. histolytica* von Bedeutung ist. Eine abschließende Bewertung steht allerdings noch aus. Wie in anderen Mikroorganismen ist vermutlich auch in *E. histolytica* die Pathogenität ein multifaktorieller Prozess. Die Rolle von ARIEL in diesem Prozess kann erst dann beurteilt werden, wenn es gelingt, nicht nur die Expression des Proteins in *E. histolytica* zu steigern sondern auch zu unterbinden und den resultierenden Phänotyp hinsichtlich seines pathogenen Potenzials zu untersuchen. Entsprechende Methoden des „gene knock-out“ oder „gene silencing“ sind für *E. histolytica* allerdings noch nicht etabliert.

6. Literatur

- Ackers, J.P.** (2002). The diagnostic implications of the separation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Biosci (Suppl 3)* 27, 573-78.
- Abd-Alla, M.D. und Ravdin, J.I.** (2002). Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. *Trop Med Int Health* 7(4), 365-70.
- Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U. und Mirelman, D.** (1999). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol Microbiol* 33(2), 327-37.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. und Sharon, N.** (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1473(1), 4-8
- Arhets, P., Olivo, J.C., Gounon, P., Sansonetti, P. und Guillen, N.** (1998). Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* 9, 1537-47.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A.** (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. Volume 3,17.8. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Bause, E.** (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* 209, 331-6.
- Bhattacharya, A., Arya, R., Clark, C.G. und Ackers, J.P.** (2000). Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitology* 120, 31-5.
- Bickle, Q., Anders, R.F., Day, K. und Coppel, R.L.** (1993). The S-antigen of *Plasmodium falciparum*: repertoire and origin of diversity. *Mol Biochem Parasitol* 61, 189-96.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. und Gotschlich, E.C.** (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136, 175-9.
- Blessmann, J., Van Linh, P., Nu, P.A., Thi, H.D., Muller-Myhsok, B., Buss, H. und Tannich, E.** (2002). Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 66(5), 578-83.
- Bordier, C.** (1981). Phase separation of integral membrane proteins in Triton-X-114 solution. *J Biol chem* 256, 1604-7.

- Bracha, R. und Mirelman, D.** (1984). Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J Exp Med* 160, 353-68.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M. und Mirelman, D.** (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* 34(3), 463-72.
- Braga, L.L., Mendonca, Y., Paiva, C.A., Sales, A., Cavalcante, A.L.M. und Mann, B.J.** (1998). Seropositivity for and Intestinal Colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Individuals in Northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 36(10), 3044-45.
- Brown, D. und Wanek, G. L.** (1992). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J Am Soc Nephrol* 3, 895-906.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M. und Tannich, E.** (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol* 22, 255-63.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N. und Tannich, E.** (2003). The Intestinal Parasite *Entamoeba histolytica* Contains 20 Cysteine Protease Genes, of Which Only a Small Subset Is Expressed during In Vitro Cultivation. *Eukaryotic Cell* 2(3), 501-509.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-8.
- Burchard, G.D. und Bilke, R.** (1992). Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. *Parasitol Res* 78, 146-53.
- Chadee, K. und Meerovitch, E.** (1984). The pathogenesis of experimental induced liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am J Pathol* 117, 71-80.
- Chatterjee, S. und Mayor, S.** (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* 58, 1969-87.
- Chavez-Munguia, B., Espinosa-Cantellano, M., Castanon, G. und Martinez-Palomo, A.** (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 31, S165-7.
- Clark, C.G. und Diamond, L.S.** (1991). The Laredo strain and other 'Entamoeba histolytica-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol Biochem Parasitol* 46, 11-18.
- Clark, C.G.** (1995). Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. *J Eukaryot Microbiol* 42, 590-3.
- Clark, C.G., Espinosa-Cantellano, M. und Bhattacharya, A.** (2000). *Entamoeba histolytica*: An Overview of the Biology of the Organism. In: Amebiasis Series on Tropical Medicine: Science and Practice-Vol. 2, (ed.) J.I. Ravdin, Imperial College Press, London, 1-45.

- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci USA 69, 2110-4.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. und Cunnick, C.C.** (1978). A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72 431-2.
- 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, 340-4.
- Dodson, J.M., Clark, C.G., Lockhart, L.A., Leo, B.M., Schroeder, J.W. und Mann, B.J.** (1997). Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitol Int 46, 225-235.
- Edman, U., Meraz, M.A., Rausser, S., Agabian, N. und Meza, I.** (1990). Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 172, 879-88.
- Eisenhaber, B., Bork, P. und Eisenhaber, F.** (1999). Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. J Mol Biol 292, 741-58.
- Espinosa-Cantellano, M., Castanon Gutierrez, G. und Martinez-Palomo, A.** (1997). In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. Arch Med Res 28 Spec No, 204-6.
- Ferguson, M.A.** (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. J Cell Sci 112, 2799-809.
- Foster, T.J. und McDevitt, D.** (1994). Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. FEMS Microbiol Lett 118, 199-205.
- Furukawa, K. und Kobata, A.** (1992). Protein glycosylation. Curr Opin Biotechnol 3, 554-9.
- Gavel, Y. und von Heijne, G.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. Protein Eng 3, 433-42.
- Ghosh, S.K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. und Samuelson, J.** (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. Infect Immun 67, 3073-81.
- Gonzalez-Garza, M.T., Castro-Garza, J., Cruz-Vega, D.E., Vargas-Villarreal, J., Carranza-Rosales, P., Mata-Cardenas, B.D., Siller-Campos, L. und Said-Fernandez, S.** (2000). *Entamoeba histolytica*: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase A(2), and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. Exp Parasitol 96, 116-9.
- 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 USA 92, 8975-9.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Haque, R., Ali, I.M., Sack, R.B., Farr, B.M., Ramakrishnan, G. und Petri, W.A., Jr.** (2001). Amebiasis and Mucosal IgA Antibody against the *Entamoeba histolytica* Adherence Lectin in Bangladeshi Children. *J Infect Dis* 183, 1787-93.
- Hart, G.W.** (1997). Dynamic O-linked Glycosylation of Nuclear and Cytoskeletal Proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 315-35.
- Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E. und Bruchhaus, I.** (2001). Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol* 3, 13-20.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1986). Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Application Note RE-034.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R. und Stüber, D.** (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6, 1321-5.
- Holder, A.A.** (1994). Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitology* 108 Suppl., S5-18.
- Hooper, N.M.** (2001). Determination of glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchorage. *Proteomics* 1, 748-55.
- Jackson, T.F., Gathiram, V. und Simjee, A.E.** (1985). Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1(8431), 716-9.
- Kobata, A.** (1992). Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 209, 483-501.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lee, J., Park, S.J. und Yong, T.S.** (2000). Serodiagnosis of amoebiasis using a recombinant protein fragment of the 29 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* 30, 1487-91.
- Leippe, M., Bahr, E., Tannich, E. und Horstmann, R.D.** (1993). Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 59, 101-9.
- Leippe, M.** (1997). Amoebapores. *Parasitol Today* 13, 178-83.
- Lodish, H. Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.** (2001). *Molekulare Zellbiologie*, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin.

- Lotter, H., Mannweiler, E., Schreiber, M. und Tannich, E.** (1992). Sensitive and specific serodiagnosis of invasive amebiasis by using a recombinant surface protein of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 30, 3163-7.
- Lotter, H., Zhang, T., Seydel, K.B., Stanley, S.L., Jr. und Tannich, E.** (1997). Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kD lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J Exp Med* 185, 1793-801.
- Marinus, M.G. und Morris, N.R.** (1973). Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol* ,114(3), 1143-50.
- Mai, Z., und Samuelson, J.** (1998). A new gene family (ariel) encodes asparagine-rich *Entamoeba histolytica* antigens, which resemble the amebic vaccine candidate serine-rich *E. histolytica* protein. *Infect Immun* 66, 353-5.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R. und Samuelson, J.** (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle („crypton“) in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol* 19, 2198-205.
- McCoy, J.J., Mann, B.J., Vedvick, T.S., Pak, Y., Heimark, D.B. und Petri, W.A., Jr.** (1993). Structural analysis of the light subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adherence lectin. *J Biol Chem* 268, 24223-31.
- 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, 255-62.
- Mann, B.J., Torian, B.E., Vedvick, T.S. und Petri, W.A., Jr.** (1991). Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3248-3252.
- Montfort, I., Olivos, A. und Perez-Tamayo, R.** (1993). Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *E. histolytica*. *Parasitol Res* 79, 160-2.
- Moody, S., Becker, S., Nuchamowitz, Y. und Mirelman, D.** (1997). Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology* 114, 95-104.
- Moody, S., Becker, S., Nuchamowitz, Y. und Mirelman, D.** (1998). Identification of significant variation in the composition of lipophosphoglycan-like molecules of *E. histolytica* and *E. dispar*. *J Eukaryot Microbiol* 45, 9S-12S.
- Moody-Haupt, S., Patterson, J.H., Mirelman, D. und McConville, M.J.** (2000). The major surface antigens of *Entamoeba histolytica* trophozoites are GPI-anchored proteophosphoglycans. *J Mol Biol* 297, 409-20.
- 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, 200-1.

- Nickel, R. und Tannich, E.** (1994). Transfection and transient expression of chloramphenicol-acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 91, 7095-8.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng 10, 1-6.
- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shioiri-Nakano K. und Hiraoka, K.** (1983). Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. J Immunol Methods 16; 75-82.
- Orozco, E., Hernandez, F.C. und Rodriguez, M.A.** (1988). Virulence-related properties in *Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica* (Ravdin, J.I., Hrsg.), Wiley, New York, 314-38.
- Petri, W.A., Jr., Snodgrass, T.L., Jackson, T.F., Gathiram, V., Simjee, A.E., Chadee, K. und Chapman, M.D.** (1990). Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of *Entamoeba histolytica* enhance adherence. J Immunol 144, 4803-9.
- Petri, W.A., Jr. und Ravdin, J.I.** (1991). Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. Infect Immun 59, 97-101.
- Petri, W. A., Jr.** (2002). Pathogenesis of amebiasis. Curr Opin Microbiol 5, 443-7.
- Pillai, D.R., Kobayashi, S. und Kain, K.C.** (2001). *Entamoeba dispar*: molecular characterization of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. Exp Parasitol 99, 226-34.
- Ramakrishnan, G und Petri, W.A., Jr.** (2000). Pathogenesis and Molecular Biology. In: Amebiasis Series on Tropical Medicine: Science and Practice-Vol. 2, (ed.) J.I. Ravdin, Imperial College Press, London, 91-112.
- Ramakrishnan, G., Lee, S., Mann, B.J. und Petri, W.A., Jr.** (2000). *Entamoeba histolytica*: deletion of the GPI anchor signal sequence on the Gal/GalNAc lectin light subunit prevents its assembly into the lectin heterodimer. Exp Parasitol 96, 57-60.
- Ravdin, J.I., Croft, B.Y. und Guerrant, R.L.** (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 152, 377-90.
- Ravdin, J.I. und Guerrant, R.L.** (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. J Clin Invest 68, 1305-13.
- Ravdin, J.I., Jackson, T.F., Petri W.A., Jr., Murphy, C.F., Ungar, B.L., Gathiram, V., Skilogiannis, J. und Simjee, A.E.** (1990). Association of serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis 162(3), 768-72.
- Rehm, H.** (2000). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, 3.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin.

- Roberts, W.L., Myher, J.J., Kuksis, A., Low, M.G. und Rosenberry, T.L.** (1988). Lipid Analysis of the Glycoinositol Phospholipid Membrane Anchor of Human Erythrocyte Acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 263, 18766-75.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J. und Roe, B.A.** (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* 143, 161-78.
- Sargeant, P.G.** (1987). The Reliability of *Entamoeba histolytica* Zymodemes in Clinical Diagnosis. *Parasitol Today* 3(2), 40-43.
- Spiro, R.G.** (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R-56R.
- Stanley, S.L.,Jr., Becker, A., Kunz-Jenkins, C., Foster, L. und Li, E.** (1990). Cloning and expression of a membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4976-80.
- Stanley, S.L.,Jr., Jackson, T.F., Reed, S.L., Calderon, J., Kunz-Jenkins, C., Gathiram, V. und Li, E.** (1991). Serodiagnosis of invasive amebiasis using a recombinant *Entamoeba histolytica* protein. *Jama* 266, 1984-6.
- Stanley, S.L.,Jr., Huizenga, H. und Li, E.** (1992). Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 50, 127-38.
- Stanley, S.L.,Jr., Tian, K., Koester, J.P. und Li, E.** (1995a). The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem* 270, 4121-6.
- Stanley, S.L.,Jr., Blanchard, J.L., Johnson, N., Foster, L., Kunz-Jenkins, C., Zhang, T., Tian, K. und Cogswell, F.B.** (1995b). Immunogenicity of the recombinant serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) amebiasis vaccine in the African green monkey. *Vaccine* 13, 947-51.
- Stanley, S.L.,Jr.** (1996). Progress towards an amebiasis vaccine. *Parasitol Today* 12, 7-13.
- Stanley, S.L.,Jr.** (2000). Prevention and Potential of New Interventions. In: *Amebiasis Series on Tropical Medicine: Science and Practice-Vol. 2*, (ed.) J.I. Ravdin, Imperial College Press, London, 137-162.
- Stanley, S.L.,Jr.** (2003). Amoebiasis. *Lancet* 361, 1025-34.
- Strachan, W.D., Spice, W.M., Chiodini, P.L., Moody, A.H. und Ackers, J.P.** (1988). Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet*, i, 561-563.

- Studier, F.W. und Moffat, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30.
- 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 USA* ;86(13), 5118-22.
- Tannich, E.** (1998). Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*: comparison of molecules considered important for host tissue destruction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92, 593-6.
- 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, 1013-21.
- 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 1137-43.
- Tsutsumi, V., Ramirez-Rosales, A., Lanz-Mendoza, H., Shibayama, M., Chavez, B., Rangel-Lopez, E. und Martinez-Palomo, A.** (1992). *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 170-2.
- Udenfriend, S. und Kodukula, K.** (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 64, 563-91.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J.** (1999). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Wang, L., Calderon, J. und Stanley, S.L., Jr.** (1997). Short report: identification of B-cell epitopes in the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein. *Am J Trop Med Hyg* 57, 723-6.
- Wassmann, C., Hellberg, A, Tannich, E. und Bruchhaus, I.** (1999). Metronidazol 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, 26051-6.
- Weber, K. und Osborn, M.** (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 224, 4406-12.
- Weise, F., Stierhof, Y.D., Kuhn, C., Wiese, M. und Overath, P.** (2000). Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* 113, 4587-4603.
- Wells, L. und Hart, G.W.** (2003). O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modifications of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Letters* 546, 154-158.

- Willhoeft, U., Hamann, L. und Tannich, E.** (1999a). A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun* 67, 5925-9.
- Willhoeft, U., Buss, H. und Tannich, E.** (1999b). DNA sequences corresponding to the ariel gene family of *Entamoeba histolytica* are not present in *E. dispar*. *Parasitol Res* 85, 787-9.
- Willhoeft, U., Buss, H. und Tannich, E.** (2002). The Abundant Polyadenylated Transcript 2 DNA Sequence of the Pathogenic Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica* Represents a Nonautonomous Non-Long-Terminal-Repeat Retrotransposon-Like Element Which is Absent in the Closely Related Nonpathogenic Species *Entamoeba dispar*. *Infect Immun* 70(12), 6798-804.
- World Health Organization Expert Consultation on Amoebiasis.** (1997). Amoebiasis. *WHO Weekly Epidem Rec* 72, 97-100.
- Zhang, T., Cieslak, P.R., Foster, L., Kunz-Jenkins, C. und Stanley, S.L.,Jr.** (1994a). Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amoebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite Immunol* 16, 225-30.
- Zhang, T., Cieslak, P.R., und Stanley, S.L.,Jr.** (1994b). Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 62, 1166-70.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARIEL	Asparagine-Rich Entamoeba histolytica-Protein
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCECF AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonium-1-propansulfonat
CHO	“Chinese Hamster Ovary”
CP	Cystein-Proteinase
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminomethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
F	forward
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HisTag	Peptid aus acht Histidin-Resten
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LB	Luria-Bertani
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PIPLC	Phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Revers
RT	Raumtemperatur
S	Sense
SDS	Natrium-dodekylsulfat
SREHP	Serine-Rich Entamoeba histolytica-Protein

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxy-Aminoethan
mf/sVSG	membraneform/soluble variant-surface-glycoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	F	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Vergleich der Primärstrukturen von ARIEL und SREHP	5
Abbildung 2:	Expression und Reinigung von rekombinantem ARIEL	52
Abbildung 3:	Zeitlicher Ablauf der Immunisierung der Wüstenrennmäuse mit rekombinantem ARIEL und anschließenden Induktion von Amöbenleberabszessen	54
Abbildung 4:	Reaktivität verschiedener anti-ARIEL-Antikörper mit <i>E. histolytica</i> -Extrakten	56
Abbildung 5:	Lokalisation von ARIEL in Extrakten definierter Zellfraktionen.....	58
Abbildung 6:	Lokalisation von ARIEL <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten.....	59
Abbildung 7:	Expression von ARIEL in transfizierten <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten.....	61
Abbildung 8:	Reinigung von ARIEL aus <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten.....	62
Abbildung 9:	Anionenaustausch-Chromatographie von solubilisierten Membranfraktionen von <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten bei unterschiedlicher Detergenz-Konzentration	63
Abbildung 10:	Schema der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der modifizierten <i>ariel</i> -Konstrukte.....	65
Abbildung 11:	Expression von ARIEL und seinen modifizierten Varianten in transfizierten <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten	66
Abbildung 12:	Lokalisation von ARIELHisGPI ^r in transfizierten <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten.....	67
Abbildung 13:	Versuchte Reinigung von HisARIEL aus rekombinanten <i>E. histolytica</i>	68
Abbildung 14:	Reinigung von ARIELHisGPI- aus rekombinanten <i>E. histolytica</i>	69
Abbildung 15:	Bestimmung des isoelektrischen Punktes von ARIEL	70
Abbildung 16:	Bestimmung der isoelektrischen Punkte von ARIEL und SREHP.....	71
Abbildung 17:	Nachweis möglicher N-glykosidisch gebundener Zucker	72
Abbildung 18:	Untersuchung zur Abspaltung von ARIEL unter Verwendung von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C	74
Abbildung 19:	Abspaltung von GPI-verankerten Membranproteinen durch saure NO ₂ -Deaminierung	75

Abbildung 20: Expression und Lokalisation von ARIEL und SREHP in <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	76
Abbildung 21: Expression von ARIEL in rekombinanten <i>E. dispar</i>	76
Abbildung 22: CHO-Rosettenbildung von <i>E. dispar</i> und <i>E. histolytica</i>	77
Abbildung 23: Einfluss von ARIEL auf die Adhärenz von CHO-Zellen an rekombinante <i>E. dispar</i>	78
Abbildung 24: Einfluss von ARIEL auf die Bildung von CHO-Zell-Rosetten durch rekombinante <i>E. dispar</i>	78
Abbildung 25: Einfluss von ARIEL auf die Zytogenität von rekombinanten <i>E. dispar</i>	79
Abbildung 26: Einfluss von ARIEL auf die Erythrophagozytose von rekombinanten <i>E. dispar</i>	80
Abbildung 27: Vergleich der carboxyterminalen Aminosäuresequenzen von ARIEL und SREHP	85
Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
Tabelle 2: Klonierungsvektoren und rekombinante Plasmide	22
Tabelle 3: Medienzusätze	24
Tabelle 4: Verdünnung der Sekundär-Antikörper für den spezifischen Nachweis von Proteinen auf Membranen mit unterschiedlichen Detektionsmethoden	40
Tabelle 5: Induktion von Amöbenerabszessen in Wüstenrennmäusen nach Immunisierung mit rekombinantem ARIEL	54
Tabelle 6: Antikörper gegen rekombinante Amöbenproteine in Personen mit und ohne <i>E. histolytica</i> -Infektion	55

7.3 Danksagung

Als erstes danke ich Prof. Dr. Egbert Tannich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante und vielseitige Projekt in seiner Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Besonders in den Momenten, in denen ich nicht mit dem Verlauf meiner Experimente zufrieden war, ist seine Kompetenz, sein Blick für das Wesentliche, sein ungetrübter Blick nach vorn und nicht zuletzt seine persönliche Art und Weise für mich von entscheidender Bedeutung gewesen.

Prof. Dr. Rolf D. Walter danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens für diese Arbeit.

Natürlich bedanke ich mich bei der gesamten Besatzung um und ganz besonders in Labor 6. Neben dem tollen persönlichen Klima während der gesamten Zeit d.h. vor und nach Dienstbeginn, vor und nach der Säule, während und nach der Happy Hour, vor Abadi nach Abadi, auf und im Wasser, beim vietnamesischen Billard usw. gilt mein spezieller „wissenschaftlicher“ Dank eben diesen Personen, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Hanna danke ich für ihre große, allumfassende Hilfe und natürlich besonders für alles rund um Gerbil, Langohr und Federvieh (nicht zu vergessen die trockenen Schuhe). Heidrun unter anderem für alles was erfolgreiches Klonieren betrifft und ihre Dichtkunst (wir sehen uns im Buß von Thien-Eck). Ina „Nurse on duty“ für die tolle Zusammenarbeit und ihre schnellen, helfenden Hände zu jeder Tag- und Nachtzeit (Gruß ans Yersinchen auch von Hearty und Sobri). Ein Riesendank geht an Sassia für die Vielzahl intensiver und wichtiger Diskussionen und Gespräche und ich hoffe, dass unser Buch weitergeschrieben wird (Ich sag´ s Dir noch mal mit Worten). Ich danke den Jungs aus dem Männerlabor: Andreas „Krüsch-Man“ für sein objektives analytisches Ohr (niemals den Acyl-Rest vergessen!) und Frank für seine stete „unterschwellige“ Motivation und Hilfe in „schlechten“ Zeiten. Dr. Eddi (me enloquezez). Christoph „Gelman“ für die Reise in die zweite Dimension. Britta für viele, viele Amöben. Nicht zuletzt Iris, die mir auch den Weg zu den Amöben geebnet hat...und vielen anderen.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung während dieser Zeit.

Hanna danke ich für Zuspruch, Zuhören, ihre Geduld in den letzten Monaten und natürlich dafür, dass sie so ist wie sie ist.

...und Schreck, wofür auch immer.