
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.