

Charakterisierung des pathogenen Phänotyps von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

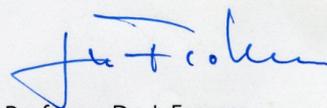
Jenny Matthiesen

aus Hamburg

Hamburg 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. I. BRUCHHAUS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. E. TANNICH
Tag der Disputation: 20. April 2012

Hamburg, den 12. April 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	IV
II	Zusammenfassung	VIII
1	Einleitung	1
1.1	<i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.2	Biologie, Morphologie und genetische Organisation von <i>E. histolytica</i>	4
1.3	Kulturisolate von <i>E. histolytica</i>	4
1.4	Pathogenitätsfaktoren von <i>E. histolytica</i>	5
1.5	Cysteinpeptidasen von <i>E. histolytica</i>	6
1.6	Vergleichende Genom-Analysen	9
1.7	Vergleichende Proteom-Analysen	11
1.8	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Geräte und <i>Software</i>	14
2.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.3	Chemikalien	15
2.4	Enzyme und Enzyminhibitoren	16
2.5	Marker und Ladepuffer	16
2.6	Assay-Systeme (Kits)	17
2.7	Immunreagenzien und Seren	17
2.8	Puffer und Lösungen	18
2.9	Kulturmedien und Medienzusätze	21
2.10	Organismen	22
2.10.1	<i>Entamoeba histolytica</i>	22
2.10.2	<i>Meriones unguiculatus</i>	23
2.10.3	<i>Mus musculus</i>	23
2.10.4	<i>Escherichia coli</i> – Stämme	24
2.11	Plasmide	24
2.12	Oligonukleotide	25
2.13	Zellkultur von <i>E. histolytica</i>	25
2.13.1	Kultivierung von <i>E. histolytica</i>	25
2.13.2	Klonierung von <i>E. histolytica</i>	26
2.13.3	Zellernte von <i>E. histolytica</i>	26
2.13.4	Transfektion von <i>E. histolytica</i>	26
2.14	Bakterienzellkultur	27
2.14.1	Herstellung kompetenter Zellen	27
2.14.2	Transformation kompetenter Bakterien	27
2.15	Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.15.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>E. histolytica</i>	28
2.15.2	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	28
2.15.3	Plasmid-Maxi-Präparation aus <i>E. coli</i>	28
2.16	Isolierung, Reinigung und Fällung von RNA aus <i>E. histolytica</i>	29
2.16.1	RNA-Isolierung mit TRIzol (Invitrogen)	29
2.16.2	RNA-Reinigung und DNA-Verdau mit dem <i>RNeasy[®]-Mini-Kit</i> (Qiagen)	29
2.16.3	Fällung der RNA	29
2.17	DNA-Analysen	30
2.17.1	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	30

2.17.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.17.3	DNA- Präparation und Extraktion aus Agarosegelen.....	30
2.17.4	DNA-Sequenzanalysen.....	30
2.17.5	SNP (<i>single nucleotide polymorphism</i>)-Analysen.....	31
2.17.5.1	Probendesign.....	31
2.17.5.2	PCR-Optimierung.....	32
2.18	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	33
2.18.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.18.2	Restriktionsanalyse von DNA.....	34
2.18.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
2.19	RNA-Analysen.....	35
2.19.1	Erststrangsynthese (cDNA-Synthese).....	35
2.19.2	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	36
2.20	Proteinanalysen.....	37
2.20.1	Rekombinante Expression.....	37
2.20.2	Reinigung der Histidinpeptid markierten rekombinant exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie.....	38
2.20.3	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>E. histolytica</i>	38
2.20.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	39
2.20.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung.....	39
2.20.6	Substrat-SDS-PAGE zum Nachweis von Peptidasen.....	40
2.20.7	Western-Blot und Immunodetektion.....	41
2.20.8	CP- <i>Assay</i> zur Bestimmung der proteolytischen Cysteinpeptidase-Aktivität.....	42
2.21	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	43
2.22	Immunfluoreszenzanalyse.....	43
2.22.1	Immunfluoreszenzfärbung von <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten.....	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Klonierung der <i>E. histolytica</i> -Zelllinien HM-1:IMSS A und HM-1:IMSS B.....	45
3.1.1	Analyse der Pathogenität der generierten Klone der Zelllinien A und B.....	45
3.1.2	Subklonierung der Klone B8 und B9.....	47
3.2	Vergleichende <i>single nucleotide polymorphism</i> (SNP) -Analysen zwischen <i>E. histolytica</i> Klon A1 und Klon B2.....	48
3.2.1	Validierung der identifizierten SNPs und Überprüfung der Korrelation zwischen SNPs und Pathogenität.....	49
3.3	Analyse der Korrelation zwischen Cysteinpeptidasen und Pathogenität bei <i>E. histolytica</i>	54
3.3.1	Transfektion von <i>E. histolytica</i> Klon A1 Trophozoiten mit ausgewählten Cysteinpeptidase-Überexpressionsvektoren.....	55
3.3.2	Überexpression ausgewählter Cysteinpeptidasen in Trophozoiten von Klon A1.....	56
3.3.3	Überprüfen der Cysteinpeptidaseaktivität der Klon A1 Überexpressionstransfektanten.....	57
3.3.4	Einfluss von Cysteinpeptidasen auf die Amöbenleberabszess (ALA)-Bildung im Mausmodell.....	59
3.3.5	Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität der A- und B-Klone.....	60
3.4	Auswertung und Validierung des Membranoberflächenproteoms von <i>E. histolytica</i>	63
3.4.1	Validierung der Membranproteom-Daten auf Transkriptom-Ebene via <i>real-time</i> PCR.....	65
3.4.2	Herstellung von Überexpressionskonstrukten mit cMyc als Markierungssystem.....	66
3.4.3	Detektion der cMyc-Fusionsproteine mittels Westernblot-Analysen.....	68

3.4.4	Lokalisierung ausgewählter potentieller Membranoberflächenproteine mittel c-Myc-Markierung in der IFA.....	71
3.4.5	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen ausgewählte Membranproteine	83
3.4.6	Lokalisationsstudien potentieller Membranoberflächenproteine in <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten mittels Immunfluoreszenz.....	86
4	Diskussion	95
4.1	Vergleichende Analysen der Zelllinien A und B.....	95
4.2	Klonierung der Zelllinien A und B	96
4.3	Vergleichende SNP-Analysen bei <i>E. histolytica</i>	96
4.4	Analyse der Korrelation zwischen CPs und Pathogenität.....	97
4.4.1	Überexpression von ausgewählten Cysteinpeptidasegenen in Klon A1.....	98
4.4.2	Einfluss einzelner Cysteinpeptidasen auf die ALA-Bildung bei <i>Mus musculus</i>	100
4.5	Auswertung und Validierung des Membranoberflächenproteoms von <i>E. histolytica</i>	102
4.5.1	Lokalisation ausgewählter putativer Membranoberflächenproteine als cMyc-Fusionsproteine	104
4.5.2	Lokalisation ausgewählter potentieller Membranoberflächenproteine mit Hilfe polyklonaler Antikörper	106
5	Literaturverzeichnis	108
6	Anhang	118
	Danksagung	160
	Eidesstattliche Versicherung	161

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A	Adenin
A. dest	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ad.	Auffüllen bis
<i>aig</i>	<i>avrRpt2-induziertes gen</i>
Ak	Antikörper
ALA	Amöbenleberabszess
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
<i>as</i>	<i>Antisense</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bidest.	Bidestilliert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
C	Cystein
cDNA	komplementäre DNA
CP	Cysteinpeptidase
Cy2	Carbocyanin 2
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat

dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
E-64	L-trans-Epoxy succinyl-1-leucylamido-4-(guanidino)-buta
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence Detection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eh/eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
EtOH	Ethanol
F	Farad
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
g	Gramm
G418	G418-Sulfat (Geneticin)
gDNA	Genomische DNA
GTP	Guanosintriphosphat
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i>
IFA	Immunfluoreszenz-Analyse
IFA-D	Immunfluoreszenz-Analyse Dekonvolution
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktosid
Kb	Kilobase
L	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
M	Milli

mA	Milliampere
Max	Maximal
Mbp	Megabasenpaare
min	Minute
n	Nano
NaAcetat	Natrium-Acetat
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Neo	Neomycinphosphotransferase
Nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
r	Rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>s</i>	<i>Sense</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisboratessigpuffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
T _M	Schmelzpunkt
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan

Tween20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	World Health Organisation
x-Gal	Galaktopyranosid
α	Anti
Δ	Delta
μ	mikro

Einbuchstabencode	Aminosäure
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

II. Zusammenfassung

Das Protozoon *Entamoeba histolytica* ist der Erreger der Amöbiasis. Die Amöben können entweder den Darm besiedeln ohne den Wirt zu schädigen oder ein invasives Verhalten zeigen und damit die Amöbiasis auslösen. Im letzteren Fall führt dies zu Krankheitssymptomen wie Amöbenkolitis und der Bildung von Amöbenleberabszessen. Bisher konnten nur wenige Moleküle mit der Invasion der Amöben assoziiert werden. Vor allem wurden ein Adhärenzlektin, porenbildende Peptide (*Amoebapores*) sowie einige Cysteinpeptidasen mit der Pathogenität von *E. histolytica* in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurde daher das Ziel verfolgt, bereits bekannte Pathogenitätsfaktoren näher zu charakterisieren und neue zu identifizieren.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde durch genotypische und phänotypische Charakterisierung der HM-1:IMSS Zelllinien A und B gezeigt, dass beide Zelllinien denselben genetischen Ursprung haben, sich aber in ihrem Phänotyp konstant unterscheiden. Während Zelllinie A sich apathogen im Tiermodell verhält, ist Zelllinie B pathogen und verursacht große Amöbenleberabszesse (ALAs). In dieser Arbeit konnte durch die Klonierung beider Zelllinien und anschließender Pathogenitätsstudien mit allen generierten Klonen (A1-A12 und B1-B12) festgestellt werden, dass es sich bei den Zelllinien A und B um Mischkulturen aus Trophozoiten mit unterschiedlicher Virulenz handelt. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit dem apathogenen Klon A1, dem pathogenen Klon B2 oder aber allen Klonen durchgeführt.

Erstmals wurden genomweite, vergleichende *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Analysen zwischen Klon A1 und Klon B2 durchgeführt. 201 SNPs konnten identifiziert werden von denen 14 als potentiell relevant für die Pathogenität eingestuft wurden. Zur Validierung und der Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen SNPs und Pathogenität wurden alle Klone (A1-A12, B1-B12) auf diese SNPs hin getestet. Es konnte, im Rahmen dieser Studie, keine derartige Korrelation aufgezeigt werden.

Die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* waren bereits Gegenstand diverser Studien, in denen ihnen eine wichtige Rolle beim invasiven und extra-intestinalen Verlauf der Amöbiasis zugeordnet wurde. Der pathogene Klon B2 weist eine 10fach höhere Cysteinpeptidase-Aktivität auf als der apathogene Klon A1. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich mit der Frage beschäftigt, ob die Gesamtheit der Cysteinpeptidasen oder eine einzelne Cysteinpeptidase die Pathogenität von *E. histolytica* beeinflussen. Durch die Überexpression ausgewählter einzelner Cysteinpeptidasegene im apathogenen Klon A1 konnte der unter Kulturbedingungen

schwach bis gar nicht synthetisierten EhCP-B8 eine Beteiligung an der ALA-Bildung im Mausmodell zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Überexpression von Kombinationen ausgewählter Cysteinpeptidasen ebenfalls zur Induktion von Leberabszessen führt. Hingegen konnte beim Vergleich der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität aller Klone mit den von ihnen verursachten Abszessgrößen keine Korrelation festgestellt werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Auswertung und Validierung des in vorangegangenen Studien erstmals beschriebenen Membranoberflächen-Proteoms der Zelllinien A und B. Dort wurden 765 Proteine identifiziert, die im Rahmen dieser Arbeit kategorisiert und mit bioinformatischen Mitteln weitergehend charakterisiert wurden. Etwa 20 % der identifizierten Proteine weisen vorhergesagte Transmembrandomänen und Signalpeptide auf, wodurch sie sehr wahrscheinlich an Membranen lokalisiert sind. Für die Lokalisation einzelner ausgewählter Proteine bei denen keine weiteren Hinweise auf eine Lokalisation in der Zellmembran hindeuten, wurde sowohl ein Protein-Markierungssystem als auch spezifische Antikörper verwandt, um die erwartete Membranlokalisation zu validieren. Über Westernblot- und Immunfluoreszenzanalysen konnte für die 14 untersuchten potentiellen Membranoberflächen-Proteine eine Membranassoziation nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten zeigen, dass einfache SNPs keine Erklärung für die Pathogenitätsunterschiede zwischen den A und B-Klonen liefern können. Hingegen hat sich die bislang kaum beachtete Cysteinpeptidase EhCP-B8 als ein äußerst interessanter Kandidat für weiterführende Studien herauskristallisiert.

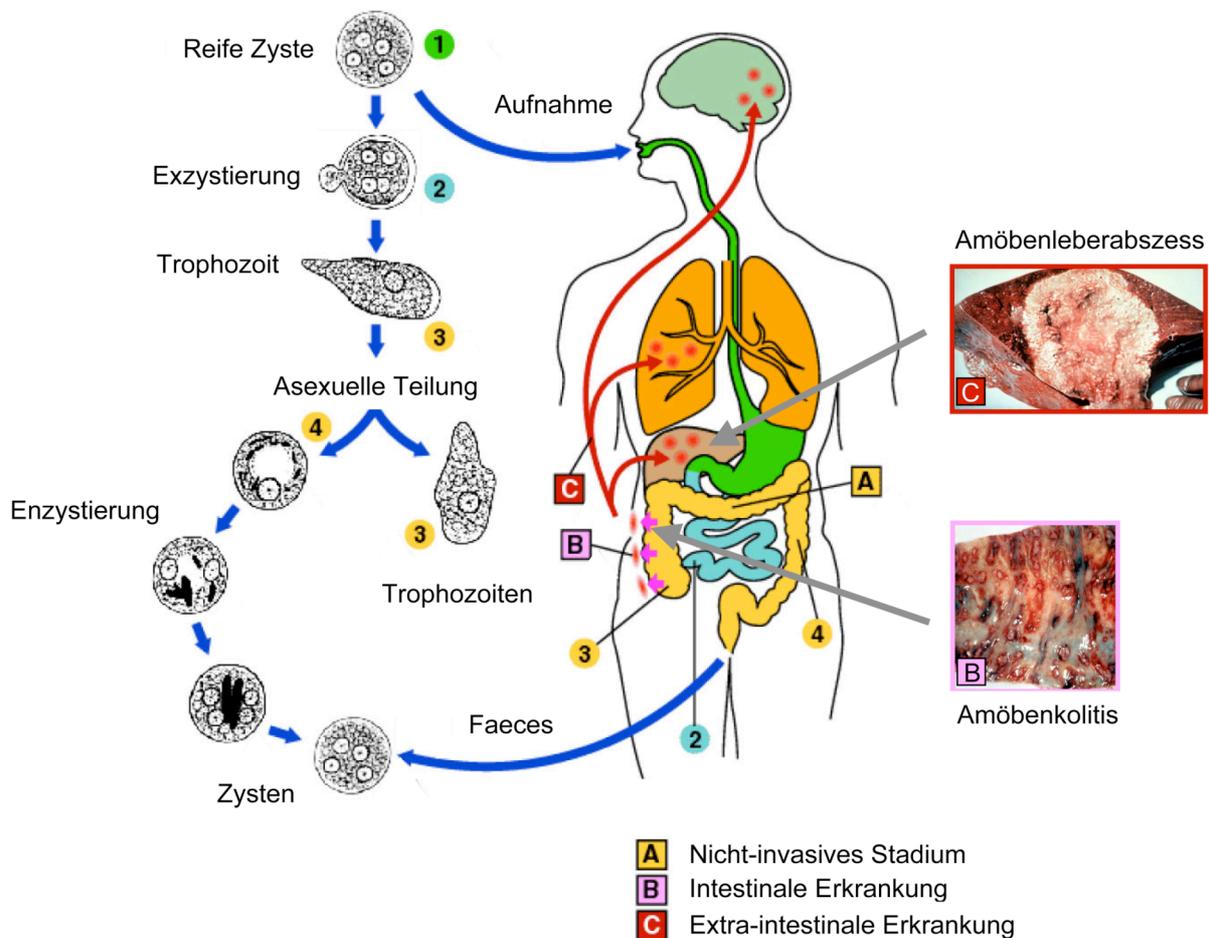
1 Einleitung

1.1 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica (SCHAUDINN 1903) ist ein einzelliger, humanpathogener Parasit und der Erreger der Amöbiasis. Weltweit sind ca. 50 Millionen Menschen von einer Amöbiasis betroffen (WHO 1998). Die Zahl der Todesfälle beläuft sich pro Jahr auf etwa 70.000 (Clark *et al.*, 2007). Die meisten Infektionen treten hierbei aufgrund mangelnder Hygiene in tropischen und subtropischen Gebieten auf.

E. histolytica durchläuft einen biphasischen, monoxenen Lebenszyklus (Abb. 1.1), bestehend aus einer säureresistenten, chitinhaltigen Zyste (10 – 15 µm) und einem, durch Pseudopodien beweglichen, vegetativen Trophozoiten (10 – 50 µm) (Marshall *et al.*, 1997). Bis auf wenige Affenarten ist der Mensch der einzige natürliche Wirt des Erregers (van Lunzen, 1996). Die infektiöse Form stellt die fäkal-oral verbreitete 4-kernige Zyste dar. Diese passiert das saure Milieu des Magens und exzystiert sich, sobald sie auf den neutralen bis basischen pH-Wert im Dünndarm trifft, zu 4-kernigen metazystischen Trophozoiten. Diese wandern weiter und besiedeln den oberen Dickdarm, wo durch Kern- und Plasmateilungen acht einkernige Trophozoiten entstehen (Marshall *et al.*, 1997), welche dort mehrere Monate bis Jahre un bemerkt verweilen können (Knobloch *et al.*, 1983).

Die Trophozoiten ernähren sich durch die Phagozytose von Bakterien und Nahrungsresten. Ihre Vermehrung erfolgt durch asexuelle Teilung. Im unteren Dickdarm enzystieren die Trophozoiten, gefolgt von zwei Kernteilungen. Die so entstandenen 4-kernigen Zysten werden mit dem Stuhl ausgeschieden und können direkt oder durch kontaminierte Nahrung bzw. Trinkwasser vom nächsten Wirt aufgenommen werden, womit sich der Kreislauf schließt.



Quelle: Verändert nach <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/e-histol-life.gif>

Abb. 1.1: Lebenszyklus von *E. histolytica*. Die vierkernige Zyste wird oral über kontaminiertes Trinkwasser oder Nahrung aufgenommen (1). Durch ihre säureresistente, chitinhaltige Außenmembran geschützt gelangt sie über den Magen in den Dünndarm, wo sie sich nach der Exzystierung in einen 4-kernigen Trophozoiten transformiert. Aus diesem entstehen durch Plasma- und Kernteilungen acht einkernige, bewegliche Trophozoiten (2 und 3). Diese besiedeln den oberen Dickdarm. Bei einem nicht-invasivem Verlauf (A) enzystieren sich die Trophozoiten nach asexuellen Teilungen im unteren Dickdarm und werden mit den Faeces ausgeschieden (4). Im Fall einer intestinalen Erkrankung (B) schädigen die Amöben die Mukosa der Darmwand und können dadurch eine Amöbenruhr auslösen. Durchdringen die Amöben die Darmwand und gelangen in den Blutstrom entsteht eine extra-intestinale Erkrankung (C). Hier können sie in andere Organe transportiert werden, vorzugsweise in die Leber und dort Abszesse verursachen, welche unbehandelt zum Tod des Patienten führen können.

Bei den meisten Menschen ($\geq 90\%$) verläuft die Infektion ohne Symptome (nicht-invasive Amöbiasis) (Blessmann *et al.*, 2003). Bei ca. 4-10% der Infektionen entwickelt sich eine invasive, intestinale Amöbiasis. Bei diesem, als Amöbenruhr bezeichneten, Krankheitsbild dringt der im hohen Maße zur Phagozytose befähigte Trophozoit unter massiver Gewebszerstörung in die Mukosa und die Darmwand ein (Stanley, 2003). Zu den typischen Symptomen

zählen Fieber, Kolitis und blutige Durchfälle. Gelangen die Trophozoiten nach dem Durchdringen der Darmwand über den Blutstrom in weitere Organe wie die Leber, Lunge oder das Gehirn, kann sich eine invasive, extraintestinale Amöbiasis entwickeln, bei der es zur Abszessbildung kommt.

Das am häufigsten befallene Organ mit Abszessbildung ist die Leber, in welche die Trophozoiten mit dem Blutstrom durch die große Pfortader gelangen (Joyce und Ravdin, 1988; Rigother *et al.*, 2002). Von den leberinvasiven Amöben überleben im Hamstermodell nur wenige die ersten 6-12 Stunden (Rigother *et al.*, 2002). Die überlebenden Trophozoiten sind an die Leber adaptiert und vermehren sich trotz der im Vergleich zum Darm höheren Temperatur und höherem Sauerstoffanteil. Sie sind überwiegend in der Randzone des Amöbenleberabszesses (ALA) lokalisiert und von neutrophilen Granulozyten umgeben. Durch die von den Trophozoiten lysierten Immunzellen freigesetzten, aggressiven Abwehrstoffe, wie z.B. saure Hydrolasen und Peptidasen, stirbt das umliegende Wirtsgewebe ab. Aufgrund der hohen Regenerationsfähigkeit der Leber können Amöbenleberabszesse bei rechtzeitiger Diagnose und medikamentöser Behandlung vollständig ausheilen. Als Therapie gegen die nicht-invasive Erkrankung wird Paromomycin verabreicht, welches durch Bindung an die Ribosomen die Proteinbiosynthese der Amöben blockiert. Handelt es sich um die invasive Form ist Metronidazol das Mittel der Wahl. Unter anaeroben Bedingungen werden Elektronen des Ferredoxins der Amöbe auf die Nitrogruppe des Metronidazols übertragen und es entstehen hochreaktive Nitroradikale, welche durch DNA-Strangbrüche und die Zerstörung von Proteinen und Lipiden den Parasiten schädigen. Bislang ist nicht geklärt, welche Signale für die kommensale Besiedlung des Dünndarms, die Gewebsinvasion oder die Enzystierung der Trophozoiten entscheidend sind. Sowohl wirts- als auch parasitenspezifische Faktoren, deren Wechselwirkungen allerdings noch nicht vollständig bekannt sind, scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Mit der Invasion in das Wirtsgewebe ist es *E. histolytica* nicht mehr möglich Zysten zu bilden und sich weiter zu verbreiten. Der Lebenszyklus des Parasiten ist mit der Invasion in das Wirtsgewebe beendet. Durch die Nichtvollendung des Zyklus ist es nicht möglich auf Mutationen zu selektionieren, welche zu einer gesteigerten Pathogenität führen.

Eine weitere Spezies der Gattung *Entamoeba* ist *Entamoeba dispar*. Hierbei handelt es sich um einen apathogenen Kommensalen im menschlichen Darm. Für lange Zeit galt die Annahme, dass es sich bei *E. histolytica* und *E. dispar* um denselben Organismus handelt, bei dem *E. dispar* die apathogene Form darstellt, da die beiden morphologisch nicht zu unterscheiden

sind. Bereits 1925 entdeckte Brumpt, dass es sich um zwei unterschiedliche Arten handelt. Doch erst Isoenzymanalysen, der Nachweis von Antigenvariationen und molekularbiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei *E. dispar* um eine eigenständige Art handelt (Clark and Diamond, 1993; Strachan *et al.*, 1988; Tannich *et al.*, 1989). Dies ist besonders für die Klinik von großer Bedeutung, da der apathogene Kommensale *E. dispar* keiner Behandlung bedarf.

1.2 Biologie, Morphologie und genetische Organisation von *E. histolytica*

Taxonomisch wird *E. histolytica* in den Stamm Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Ordnung Entamoebida, Familie Entamoebidae, Gattung *Entamoeba* eingeteilt (Adl *et al.*, 2005). Sie ist mikroaerophil und dadurch gut an die Bedingungen im menschlichen Darm angepasst. Die Trophozoiten besitzen eine einfache Zellmembran, welche ihre amöboide Bewegung durch Pseudopodien ermöglicht, die aus der Plasmamembran ausgestülpt werden. Auch an der phagozytotischen Nahrungsaufnahme ist die Cytoplasmamembran beteiligt. Das Endoplasma von *E. histolytica* besteht zu ca. 40 % aus Vakuolen und Vesikeln welche zu den Lysosomen und cytotoxischen Vesikeln höherer eukaryotischer Organismen äquivalent sind (Scholze und Tannich, 1994). Ein Endoplasmatisches Retikulum (ER) konnte in den Zellen beobachtet werden. Für einen Golgi-Apparat, wie er typischerweise bei eukaryotischen Zellen vorliegt, gibt es bislang keinen Nachweis. Es wurden aber Golgi-ähnliche Vesikel beschrieben (Bredston *et al.*, 2005). Die Trophozoiten verfügen über ein Mitosom welches vom Mitochondrium abgeleitet ist, ein echtes mitochondriales Genom fehlt jedoch (Tovar *et al.*, 1999).

Das Genom von *E. histolytica* umfasst in etwa 20 Mb und weist mit ca. 75 % einen sehr hohen AT-Gehalt auf (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010). Die Analyse des Genoms führte zu 8.201 vorhergesagten Genen welche mit einer durchschnittlichen Länge von 1,26 Kb 49 % des gesamten Genoms ausmachen (Lorenzi *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2007). Nur 25 % aller Gene beinhalten eine Intronsequenz, wovon wiederum 6 % multiple Intron-Bereiche aufweisen (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010). Die genaue Anzahl an Chromosomen und deren Organisation ist ungeklärt.

1.3 Kulturisolate von *E. histolytica*

Amöben werden aus Stuhlproben infizierter Patienten isoliert und können unter axenischen Bedingungen als Zelllinien in Kultur genommen werden. Zur näheren phänotypischen Bestimmung werden diverse *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt. Wichtiger Parameter für die Pathogenität ist die Fähigkeit der Trophozoiten, Leberabszesse im Tiermodell zu induzie-

ren. Für die Identifizierung von putativen Pathogenitätsfaktoren eignen sich besonders vergleichende Studien zwischen pathogenen und apathogenen Zelllinien.

In dieser Arbeit werden Vergleiche zwischen zwei Subtypen des Amöben-Kulturoisolats HM-1:IMSS durchgeführt, die im Folgenden als Zelllinie A und Zelllinie B bezeichnet werden. Bei HM-1:IMSS handelt es sich um einen pathogenen Stamm von *E. histolytica* der 1964 aus einem Patienten mit Kolitis isoliert wurde. Heutzutage existieren verschiedene in Kultur gehaltene Subtypen. Beide *E. histolytica* Zelllinien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten von der ATCC als HM-1:IMSS-Isolat (Katalog-Nr. 30459) erhalten. Zelllinie A befindet sich seit 2001 durchgehend in Kultur und wird ohne Wirtspassagen in axenischer, mikroaerophiler Kultur gehalten. Zelllinie B wurde bereits 1991 direkt von der ATCC bezogen und wurde seitdem unter den gleichen Bedingungen wie Zelllinie A kultiviert. Zelllinie A und B haben einen identischen genetischen Hintergrund. Die beiden Zelllinien sind somit syngenisches. Im Tiermodell ist allerdings nur Zelllinie B in der Lage Amöbenleberabszesse (ALAs) zu induzieren und weist somit eine höhere Pathogenität auf als Zelllinie A.

Die beiden Zelllinien wurden bereits näher charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass neben der höheren Pathogenität von Zelllinie B, diese Zellen größer sind als die von Zelllinie A und außerdem eine höhere Wachstumsrate und eine höhere Cysteinpeptidaseaktivität aufweisen. Weitere Versuche zeigten, dass Hitze und reaktive Stickstoffspezies geringere Auswirkungen auf Zelllinie B ausüben. Keine signifikanten Unterschiede zwischen A und B konnten bei der cytopathischen Aktivität, dem *Rosetting* (Bindung von Erythrozyten an Amöben), dem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies und der Erythrophagozytose festgestellt werden. Bei Zelllinie A konnte einzig eine stärkere hämolytische Aktivität als bei Zelllinie B gemessen werden (Biller *et al.*, 2009).

1.4 Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

E. histolytica besitzt, wie der Name impliziert, die Fähigkeit Gewebe mit hoher Effizienz zu lysieren und Zellverbände aufzulösen. Bisher wurden drei Gruppen von Pathogenitätsfaktoren identifiziert, welche an Adhärenz und Lyse beteiligt sind.

Im ersten Schritt muss der parasitäre Organismus einen festen Halt an der Mukosa des Darms herstellen. Dies erfolgt über ein membrangebundenes Galaktose/*N*-Acetyl-D-Galaktosamin spezifisches Lektin welches an Mucin bindet (Petri, 1996; Horstmann *et al.*, 1992). Erst die

Adhäsion mittels des β -D-Galaktose/*N*-Acetylgalaktosamin-spezifischen Adhärenzlektins an eine Zielzelle oder Substrat ermöglicht vermutlich die Wirkung der weiteren Pathogenitätsfaktoren, den *Amöbapores* und Cysteinpeptidasen. Mittels der "Antisense"-Technologie, die zu einer deutlichen Reduktion der Abszessbildung im Tiermodell führte, wurde die Bedeutung des Lektins für die Pathogenität demonstriert (Ankri *et al.*, 1999).

Als zweiter Schritt folgt die kontaktabhängige Lyse der Wirtszellen durch porenbildende und antibakteriell wirkende Proteine, die von den Trophozoiten sezerniert werden. Diese werden als *Amoebapores* bezeichnet. Bei *E. histolytica* konnten drei Isoformen dieser Proteine aus im Cytoplasma lokalisierten Granula isoliert werden. Die drei entdeckten *Amoebapores* A, B und C weisen unterschiedliche Primärstrukturen auf. Sie können sowohl prokaryotische, als auch eukaryotische Membranen permeabilisieren und dadurch die Lyse der Zellen auslösen (Leippe *et al.*, 1994). Wird bei Trophozoiten die *Amoebapore*-Synthese durch die transkriptionelle Inaktivierung des entsprechenden Gens verhindert, verlieren diese ihre Virulenz (Bracha *et al.*, 2003). Als dritter wichtiger Virulenzfaktor von *E. histolytica* wurden die Cysteinpeptidasen identifiziert. Diese können die extrazelluläre Matrix der Wirtszellen angreifen und dadurch Gewebe auflösen (Olivos-Garcia *et al.*, 2004; Bruchhaus *et al.*, 2003; Que *et al.*, 2002; Stanley *et al.*, 1995; Scholze und Tannich, 1994; Keene *et al.*, 1986).

1.5 Cysteinpeptidasen von *E. histolytica*

Das Genom von *E. histolytica* enthält 50 Cysteinpeptidase-Gene (Loftus *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; Tillack *et al.*, 2009). Diese teilen sich in den 47 CPs umfassenden Clan CA und den drei CPs enthaltenden Clan CE auf (siehe Abb. 1.2). Mit 37 Cysteinpeptidasen ist der Großteil strukturell mit der C1 Papain-Superfamilie verwandt. Diese Superfamilie wird in drei Familien unterteilt: EhCP-A, EhCP-B und EhCP-C (Clark *et al.*, 2007; Tillack *et al.*, 2006).

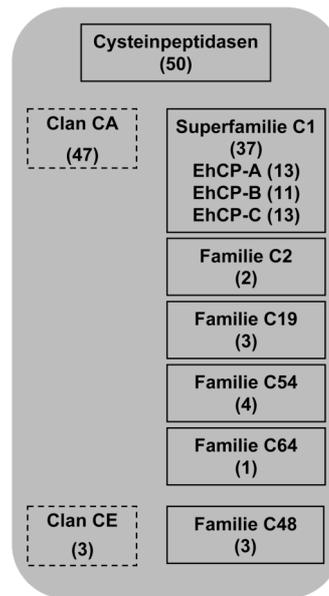


Abb. 1.2: Übersicht der Cysteinepeptidasen bei *E. histolytica*. Angegeben sind die Clans und Familien. In Klammern steht die Anzahl der Cysteinepeptidasen.

Es konnte eine direkte Korrelation zwischen der Virulenz verschiedener *E. histolytica* Isolate und der von ihnen produzierten Menge aktiver Cysteinepeptidasen festgestellt werden (Gadasi und Kessler, 1983; Lushbaugh *et al.*, 1985; Keene *et al.*, 1990). Lokalisiert sind diese in Vesikeln (Scholze und Tannich, 1994), von wo aus Cysteinepeptidasen von den Amöben sezerniert werden (Leippe *et al.*, 1995). Die Cysteinepeptidasen von *E. histolytica* sind unter anderem in der Lage adhärent wachsende Fibroblasten abzulösen (Keene *et al.*, 1986 + 1990; Ankri *et al.*, 1998) und verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren (Keene *et al.*, 1986; Luaces *et al.*, 1988; Schulte *et al.*, 1989). Der zytotoxische Effekt der Cysteinepeptidasen kann durch die Zugabe spezifischer Inhibitoren aufgehoben werden (Bracha *et al.*, 1984; Luaces *et al.*, 1988; Hellberg *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte im Hamstermodell gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibition der Cysteinepeptidasen von *E. histolytica* die Fähigkeit zur Induktion von Amöbenleberabzessen stark vermindert (Stanley *et al.*, 1992). Weiterhin kann die Bildung von Leberabzessen in Hamstern durch Expression einer „Antisense“-RNA nahezu vollständig inhibiert werden (Ankri *et al.*, 1999). Der größte Teil der Studien über die Cysteinepeptidasen von *E. histolytica* untersuchen Effekte welche von der Gesamtheit der Cysteinepeptidasen ausgelöst werden, nur in den seltensten Fällen konnte etwas einer bestimmten Peptidase zugeordnet werden. Nur der EhCP-A5 konnte bis jetzt ein direkter Einfluss auf die Pathogenität von *E. histolytica* nachgewiesen werden (Nowak, 2005; Tillack *et al.*, 2006; Ankri *et al.*, 1999a; Zhang *et al.*, 2000). Unter Kulturbedingungen sind

die Gene der Cysteinpeptidasen *ehcp-a1*, *ehcp-a2*, *ehcp-a5* und *ehcp-a7* in *E. histolytica* am stärksten exprimiert und diese vier EhCPs sind auch für ca. 90 % der Gesamtpeptidase-Aktivität verantwortlich (Bruchhaus *et al.*, 1996; Bruchhaus *et al.*, 2003; Tillack *et al.*, 2007; Irmer *et al.*, 2009).

Namensgebend ist der Cysteinrest im aktiven Zentrum der Peptidasen, welcher mit einem Histidinrest eine katalytische Dyade bildet, die durch andere Aminosäuren, hauptsächlich einem Asparagin und/oder Glutamin stabilisiert werden kann. Synthetisiert wird der Großteil der Cysteinpeptidasen (CPs) als Prä-Pro-Enzyme. Dies dient dem Transport des Moleküls an den richtigen Ort und dem Schutz der Zelle. Die Prä-Domäne enthält die Information für den Zielort und die Pro-Sequenz hält das Enzym in seiner inaktiven Form und ist wichtig für die richtige Faltung des Proteins (Que *et al.*, 2002).

Bei den Proteinen der Familien EhCP-A und EhCP-B handelt sich um klassische Prä-Pro-Enzyme welche eine Cathepsin L-ähnliche Struktur aufweisen (Abb. 1.3). Bisher wurden in der EhCP-A-Familie drei Moleküle charakterisiert (EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5) die alle eine Cathepsin B-ähnliche Substratspezifität besitzen (Jacobs *et al.*, 1998). In den Pro-Domänen beider Familien findet sich das konservierte Sequenzmotiv E-(X)₃-R-(X)₂-I/V-F-(X)₂-N-(X)₃-I-(X)₃-N (ERFNIN-Motiv), dessen Funktion noch unbekannt ist. Die beiden Familien unterscheiden sich in der Länge ihrer Pro-Region und den konservierten Sequenzmotiven in der N-terminalen Region der Cysteinpeptidasen. Während bei EhCP-A das Motiv P-(X)₃-D-W-R-(X)₂-G-K (DWR-Motiv) zu beobachten ist, findet man bei EhCP-B das Motiv P-(X)₅-C-(X)₆-N-(X)₁₋₈-C (PCNC-Motiv). In weiterführenden Sequenzanalysen konnten für zehn der elf Mitglieder der EhCP-B-Familie GPI-Anker oder putative Transmembrandomänen (TMD) vorhergesagt werden (Bruchhaus *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2007; Tillack *et al.*, 2007). Eine stark von EhCP-A und EhCP-B abweichende vorhergesagte Struktur weist die EhCP-C-Familie auf. Statt der klassischen Prä-Pro-Domänen findet man bei ihnen eine hydrophobe Region im N-terminalen Bereich, welche als Signalanker fungieren könnte. Im C-terminalen Bereich verfügen sie über ein HSYSIC-Motiv. In anderen Organismen wurde bisher keine strukturell verwandte CP identifiziert, somit ist noch keine Aussage über ihre Funktion möglich (Clark *et al.*, 2007).

Bei den Familien C2, C19, C48, C54 und C65 handelt es sich um putative Enzyme zu deren Funktion nur über Homologievergleiche mit Peptidasen anderer Organismen Informationen generiert werden konnten. Ihnen wird eine Beteiligung an verschiedenen Signalwegen, der

Apoptose und der Autophagie zugeordnet (Goll *et al.*, 2003; Mariño *et al.*, 2003; Mariño und Lopez-Otin, 2004).

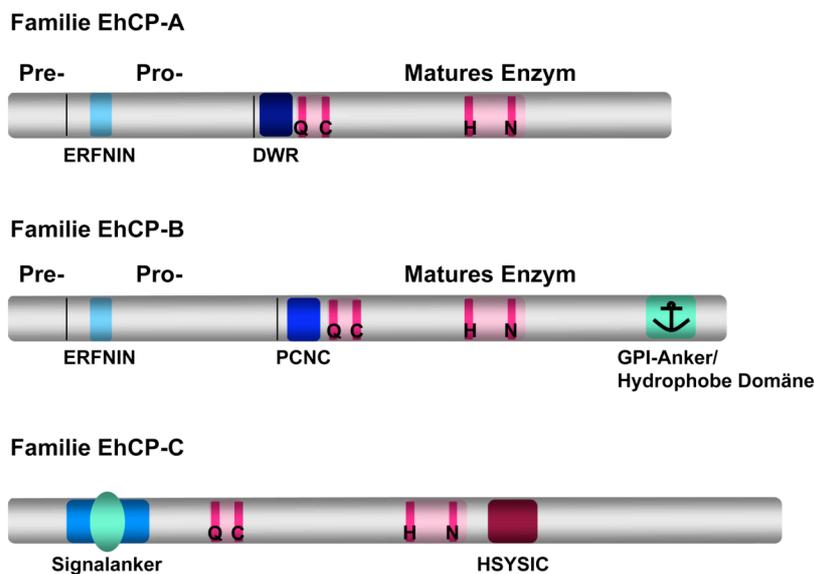


Abb. 1.3: Organisation der C1-Familien EhCP-A, EhCP-B und EhCP-C. Hellblau: ERFNIN-Motiv; dunkelblau: DWR-Motiv; blau: PCNC-Motiv; violett: HSYSIC-Motiv; grünes Oval: Signalankermotiv; grün mit Ankersymbol: GPI-Anker-Sequenzmotiv/hydrophobe Domäne; rosa: katalytisches Zentrum; Q (Glutamin), C (Cystein), H (Histidin), N (Asparagin): katalytisch wirksame Aminosäuren

1.6 Vergleichende Genom-Analysen

Vergleichende Genom-Analysen können zur Identifizierung von Kandidatengenomen beitragen, welche für die Pathogenität des Parasiten mitverantwortlich sind. Hierbei gibt es diverse Ansätze auf welcher Ebene diese Untersuchungen stattfinden. Bei *E. histolytica* wurden bereits mehrere vergleichende Studien mit unterschiedlichen Zelllinien, meist auf Transkriptomeebene, durchgeführt (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufner *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Die am häufigsten verwendete Technik ist der *Microarray*. Mit dieser Technik ist es möglich mit einer kleinen Menge einer Probe mehrere tausend Einzelnachweise durchzuführen. Als Oligonukleotide dienen geeignete Bereiche von bereits bekannten Genen, welche auf einer Matrix fixiert werden. Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA wird diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit den fixierten Oligonukleotiden inkubiert. Findet eine Hybridisierung von Oligonukleotid und Probe statt werden detektierbare Fluoreszenzsignale frei. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich zwei Proben auf einem *Microarray* kohybridisieren, wobei sich differentielle Signale von dem Fusionsignal beider Proben unterscheiden. Für die Erforschung von *E. histolytica* wurden bereits von ver-

schiedenen Arbeitsgruppen Microarray-Experimente durchgeführt. Für Vergleichende Studien wurden meist die pathogene Zelllinie HM-1:IMSS und die apathogene Zelllinie Rahman verwendet (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufner *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Hier wurden unter als am stärksten differentiell exprimierte Gene sehr unterschiedliche identifiziert. Neben vielen anderen sind bei der pathogenen Zelllinie HM-1:IMSS Gene für die EhCP-A4, EhCP-A6, verschiedene AIG 1 Proteine und eine Alkoholdehydrogenase differentiell stärker exprimiert. Im Gegensatz dazu sind z.B. die EhCP-A3, die Cysteinpeptidase 112, ein C2-Domänen-Protein so wie eine Fe-Hydrogenase differentiell höher in der apathogenen Zelllinie Rahman exprimiert. Auch die EhCP-A1 und EhCP-A7 wurden hier stärker transkribiert. Da die Rahman-Zelllinie nicht ideal für die Suche nach potentiellen Pathogenitätsfaktoren, wurden vergleichende Analysen mit den Zelllinien A und B von *E. histolytica* durchgeführt. Hier umfasste der verwendete Microarray 6242 Gene von denen 87 als differentiell exprimiert gefunden wurden. Die meisten gehören zu der Familie der kleinen GTPasen, welche seitdem als putative Pathogenitätsfaktoren in den Fokus gelangten. Die meisten Mitglieder dieser Familie, welche die AIG1-GTPasen codieren, sind in der pathogenen Zelllinie B hochreguliert, während in der Zelllinie A einige RabGTPasen-Gene als stärker exprimiert gefunden wurden (Biller *et al.* 2010). Zusätzlich zum Vergleich der zwei Zelllinien wurde in *in vitro*-Experimenten versucht Gene zu identifizieren, welche mit der Pathogenität korrelieren. Hierzu wurde beispielsweise die Genexpression der Trophozoiten in Anwesenheit von Gal/GalNac-Lektin, eukaryotischen Zellen und Bakterien untersucht, als Simulation der Bedingungen im menschlichen Darm (Gilchrist *et al.*, 2006; MacFarlane und Singh, 2006; Beck *et al.*, 2005). Ein weiterer Ansatz bei vergleichenden Genomanalysen sind die Identifizierung von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). SNPs können einen Einfluss auf viele unterschiedliche Bereiche ausüben. Durch den Austausch einer Base besteht die Möglichkeit einer stillen Mutation, er kann aber auch zu einem Codon für eine andere Aminosäure oder zu einem Stopcodon führen. Außerdem kann das *Splicing* beeinflusst oder verhindert werden, wodurch eine veränderte mRNA und eventuell ein neues Protein entstehen kann. Auch Transkriptionsfaktoren können in ihrer Bindung an die DNA verstärkt oder behindert werden, was in einer Zu- oder Abnahme der Expression eines Gens resultieren kann. Zusätzlich ist es möglich, dass ein SNP allein noch keine Auswirkungen hat und erst in Kombination mit anderen SNPs Wirkung zeigt. Alle diese Veränderungen können zu einer höheren oder niedrigeren Pathogenität einer Zelllinie beitragen. Zur Detektion wird das gesamte Genom einer Zelllinie in 50 Bp große Fragmente zerlegt, mehrfach durchsequenziert und anschließend an das

bereits vorhandene Referenzgenom (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010) angelegt, geordnet und mögliche SNPs identifiziert. Zur Kategorisierung werden die SNPs danach eingeteilt, ob sie sich in kodierenden oder nicht kodierenden Bereichen befinden und ob sie zu Aminosäureaustauschen führen. Anschließend wird festgestellt ob eine Korrelation mit der Pathogenität des verwendeten Organismus zu beobachten ist. Bis jetzt bei *E. histolytica* durchgeführte SNP-Analysen dienten zur Feststellung der genomischen Diversität im Vergleich mit anderen apathogenen Stämmen wie *E. dispar* (Shah *et al.*, 2005). Es wurden aber noch nie die SNPs selbst auf einen Zusammenhang mit der Pathogenität hin untersucht.

1.7 Vergleichende Proteom-Analysen

In vielen Studien wurden die oben beschriebenen bereits bekannten Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* identifiziert, doch ist es unwahrscheinlich, dass der pathogene Phänotyp nur durch ein oder nur sehr wenige Proteine induziert wird (Stanley, 2003; Davis *et al.*, 2006; Petri *et al.*, 2003; Tillack *et al.* 2006; Bracha *et al.*, 1999). Die Möglichkeit ganze Proteome miteinander zu vergleichen bietet die Chance im großen Ansatz nach weiteren Virulenzfaktoren zu suchen. Mit der zweidimensionalen differentiellen in-Gelelektrophorese (DIGE) separiert man komplexe Proteingemische entsprechend ihrer molekularen Massen und ihres isoelektrischen Punktes. Um einen Vergleich zwischen zwei Proben anstellen zu können werden sie mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert und dann gemeinsam in einem Gel getrennt und sichtbar gemacht. Somit kann man sofort erkennen, ob ein Protein exklusiv in einer der Proben vorkommt oder in beiden vertreten ist. Die detektierten differentiellen Proteine können mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert werden. Eine Bestimmung der Molekülmassen kann durch die *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI TOF MS) erreicht werden (Karas und Hillenkamp, 1988). Für Vergleichende Studien wurden die pathogene Zelllinie HM-1:IMSS und die apathogene Zelllinie Rahman bereits verwendet (Davis *et al.*, 2006). Hier konnten sechs Proteine identifiziert werden welche differenziell vorlagen. Ein cytoskelett-assoziiertes LIM-Domänen-Protein, eine Alkoholdehydrogenase und das an der oxidativen Stressantwort beteiligte Peroxiredoxin waren in der pathogenen Zelllinie in größeren Mengen nachzuweisen, während in der apathogenen Zelllinie Rahman die Superoxiddismutase und Grainin 1 und 2 vermehrt auftraten. Im Rahmen der Anwendung dieser Techniken bei der apathogenen Zelllinie A und der pathogenen Zelllinie B konnten 33 differentielle Proteine detektiert werden, von denen 21 in größerer Menge bei Zelllinie A und 10 bei Zelllinie B auftraten. 23 der 33 Proteine können biologischen Funktionen wie Stressantwort, Cytoskelettstruktur, Transport, Signaltransduktion,

Zellmetabolismus oder Translation zugeordnet werden. Den restlichen 10 konnte keine Funktion zugeordnet werden (Biller *et al.*, 2009). Diese Moleküle könnten eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von *E. histolytica* spielen.

Die DIGE-Technologie eignet sich somit hervorragend um differentielle Proteine im Proteom zu identifizieren. Für die Bestimmung des gesamten Proteoms eines Organismus ist die Technik jedoch nicht sensitiv genug. Probleme gibt es auch bei der Detektion von stark unterrepräsentierten Proteinen in einem komplexen Proteingemisch und membranassoziierten Proteinen (Ong *et al.*, 2001). Hierfür sind so genannte nicht-Gel-basierte Proteom-Analysen geeignet. Diese basieren auf der Trennung von Peptiden, welche durch den Verdau der Proteine mit Trypsin erhalten werden. Fraktioniert werden die erhaltenen Peptide durch die *Liquid Chromatography* unter Verwendung von Mikrosäulen (Nano-LC) und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die Identifikation von Oberflächenproteinen auf der Plasmamembran von pathogenen Organismen ist von großer Bedeutung für das Verständnis von Wirt-Parasit-Interaktionen, wie der Kontaktvermittlung und den daraus resultierenden intra- und extrazellulären Signalen. Analysen bei *Trichomonas vaginalis* zeigen, dass die Identifikation des Membranoberflächenproteoms in Verbindung mit dem Vergleich von Parasitenstämmen unterschiedlicher Virulenz einen effektiven Ansatz darstellt um neue Pathogenitätsfaktoren zu ermitteln (Miguel *et al.*, 2010). Zusätzlich können Moleküle welche sich an der Oberfläche von *E. histolytica* befinden als Impfkandidaten in Frage kommen.

1.8 Zielsetzung

Bis heute sind die Faktoren die zu den unterschiedlichen Verläufen einer *E. histolytica*-Infektion führen, weitestgehend ungeklärt. Durch die Möglichkeit mit zwei syngenischen Zelllinien des Isolats HM-1:IMSS von *E. histolytica* arbeiten zu können, welche unter anderem ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Pathogenität aufweisen, sollte sich im Rahmen dieser Arbeit sowohl mit bereits bekannten als auch neuen putativen Pathogenitätsfaktoren beschäftigt werden. Hierzu wurden Untersuchungen sowohl auf Genom- und Transkriptom- als auch auf Proteom-Ebene durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den verwendeten Zelllinien A und B nicht um Mischkulturen handelt, in denen eine Varianz in der Pathogenität vorliegt, sollten Klone generiert werden, welche im Tiermodell auf ihre Fähigkeit ALAs zu bilden getestet werden sollten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte mit Hilfe dieser Klone die Validierung von erhaltenen SNP-Daten durch Hybridisierungsstudien und die Überprüfung einer Korrelation zwischen den gefundenen SNPs und der festgestellten Pathogenität vorgenommen werden.

Ein weiteres Thema stellen die Cysteinpeptidasen dar. Bereits als Pathogenitätsfaktoren bekannt, konnte bisher keine abschließende Klärung erreicht werden. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Transfektanten eines apathogenen A-Klones generiert werden, die gezielt verschiedene Cysteinpeptidasen überexprimieren. Anhand dieser Transfektanten sollte überprüft werden, ob die Überexpression bestimmter Peptidasen den pathogenen Phänotyp wieder herstellen kann. Zusätzlich sollte unter Verwendung aller generierten Klone die allgemeine Korrelation zwischen spezifischer CP-Aktivität und Virulenz überprüft werden.

Außerdem sollten die in vorausgegangenen Studien erhaltenen putativen Membranoberflächenproteome von Zelllinie A und Zelllinie B kategorisiert und mit Hilfe von bioinformatischen Datenbanken analysiert werden, um anschließend eine Validierung der Daten vorzunehmen. Diese sollte mittels ausgewählter Proteine sowohl auf Transkriptom-Ebene via *Real-time* PCR als auch Proteom-Ebene durch Lokalisations-Studien passieren.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Software

In den folgenden Tabellen befindet sich eine Aufstellung der verwendeten Geräte (Tab. 2.1), sowie der verwendeten *Software* (Tab. 2.2).

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
BioPhotometer 6131	Eppendorf
<i>ELISA Reader</i> Dynatech MRX	<i>Dynex Technologies</i>
Fluoreszenzmikroskop <i>DM BR</i>	Leica
<i>Gene Amp</i> [®] PCR System 9700	<i>PE Applied Biosystems</i>
<i>Genepulser Xcell</i> [™]	BioRad
<i>Light Typer</i>	Roche
<i>Rotor-Gene</i> 3000	<i>Corbett Life Science</i>
<i>Tank-Electroblotter PerfectBlue</i> [™]	<i>PeqLab</i>
Ultraschallbad Soriorex Super	Bandelin
Ultraschallgerät <i>Sonifier</i> 250	Branson

Alle weiteren laborüblichen Geräte werden nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 2.2: Verwendete *Software*

Software	Hersteller
MacVektor 10.0.2	<i>International Biotechnologies</i>
<i>OpenLab</i> 4.0.2/5.0.1	<i>Improvision</i> [®]
<i>Rotor-Gene real time Analysis</i> 6.0	<i>Corbett Life Sciences</i>
<i>LightTyper</i> 1.5	Roche
<i>Revelation</i> [™] 1.0	<i>Dynex Technologies</i>
Bioinformatische Datenbanken	
<i>SignalP</i> 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
<i>SecretomeP</i> 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP
<i>TMHMM Server</i> 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0
<i>NMT – the MYR Predictor</i>	http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor

2.2 Verbrauchsmaterialien

In der nachstehenden **Tab. 2.3** folgt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, sowie die jeweilige Bezugsquelle.

Tab. 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well-Platten mit rundem/flachem Boden	Sarsted
Einmalimpfösen	Carl Roth
Einmalpipetten 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Beckton Dickinson
Einmalspritzen 2 mL, 5 mL, 20 mL	B. Braun Aesculap
Gap Elektroporationsküvetten 4 mm	Eurogentec
Kulturflaschen 40mL, 70 mL, 300 mL	Becton Dickenson
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	Schleicher&Schuell Bioscience
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen gestopft, nicht gestopft	Greiner <i>Bio-One</i> , Sarstedt
Röntgenfilme	<i>GE Healthcare</i>
<i>Safe-Lock-Tubes</i> 0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL	Eppendorf
Säule #S10149	MoBiTec
Skalpelle (Einweg)	B. Braun Aesculap
Sterican Einmalinjektionskanülen	B. Braun Aesculap
<i>Stericup</i> [®]	<i>Millipore Cooperation</i>
Sterilfilter 0.2 µm	Sarstedt
<i>Steritop</i> [™]	<i>Millipore Cooperation</i>
<i>STRIP Tubes</i> 0.1 mL, 0.2 mL für <i>Rotor Gene</i>	<i>Corbett Research</i>
UVette	Eppendorf
Whatman-Papier	Biometra

2.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Neu-Ulm), GIBCO BRL *Life Technologies* (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) im Reinheitsgrad „*pro analysis*“ bezogen. Ausnahmen wurden ergänzend im Folgenden (**Tab. 2.4**) aufgelistet.

Tab. 2.4: Ausnahmen der oben angegebenen Firmen

Chemikalie	Hersteller
Albumin Standard Fraktion V	PIERCE <i>Chemicals</i>
APS	Serva
<i>Diamond Vitamin Tween 80 Solution (40x)</i>	JRH Biosciences
Hefeextrakt und Trypticase	Becton Dickinson
Penicillin	Grünenthal

2.4 Enzyme und Enzyminhibitoren

In **Tab. 2.5** sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Enzyminhibitoren aufgeführt.

Tab. 2.5: Verwendete Enzyme und Enzyminhibitoren

Enzyme und Enzyminhibitoren	Hersteller
E-64 (L-trans-Epoxyuccinyl-1-leucylamido-4-(guanidino)-buta)	Sigma-Aldrich
<i>Pwo</i> -Polymerase	Roche Applied Science
Restriktionsendonukleasen <i>FastDigest</i> TM	Fermentas
RNase A	Invitrogen
<i>RNase free DNase</i>	Qiagen
<i>RNase Out</i>	Invitrogen
<i>Superscript III</i> TM Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase	Promega

2.5 Marker und Ladepuffer

In **Tab. 2.6** sind die in dieser Arbeit verwendeten Marker und Ladepuffer aufgeführt.

Tab. 2.6: Verwendete Marker und Ladepuffer

Marker	Hersteller
DNA-Ladepuffer 6x <i>Loading Dye</i>	Fermentas
<i>GeneRuler</i> TM 1 kb DNA Ladder	Fermentas
<i>PageRuler</i> TM <i>Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>PageRuler</i> TM <i>Unstained Protein Ladder</i>	Fermentas

2.6 Assay-Systeme (Kits)

In **Tab. 2.7** sind die in dieser Arbeit verwendeten *Assay*-Systeme aufgelistet.

Tab. 2.7: Verwendete *Assay*-Systeme

<i>Assay</i> -System	Hersteller
BCA Protein <i>Assay</i>	Pierce <i>Thermo Scientific</i>
<i>Easy</i> -DNA™ Kit	Invitrogen
<i>Fast Plasmid</i> Mini	Eppendorf
<i>NucleoBond</i> ® Xtra Maxi	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin</i> ® <i>Extract II</i>	Macherey-Nagel
<i>RealMasterMix SYBR ROX</i>	5 Prime
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen
<i>RNeasy</i> ® Mini Kit	Qiagen
<i>SuperScriptIII First-Strand Synthesis System</i>	Invitrogen
TOPO TA® <i>Cloning Kit</i>	Invitrogen

2.7 Immunreagenzien und Seren

In **Tab. 2.8** sind die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Immunreagenzien und Seren aufgeführt.

Tab. 2.8: Verwendete Immunreagenzien und Seren

Immunreagenzien und Seren	Hersteller
Rinderserum	Sigma-Aldrich
α -His-Peptid IgG primärer Antikörper (maus)	Quiagen
α -c-Myc monoclonal primärer Antikörper (<i>mouse</i>)	Sigma-Aldrich
α - <i>mouse</i> -HRP sekundärer Antikörper	DAKO A/S
α - <i>mouse</i> ALEXA Fluor® 488 sekundärer Antikörper	Invitrogen
α -rEhDnaJ (maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung
α -rEhGrainin1 (maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung
α -rEhguanine_nucbdprot. (maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung
α -rEhHydA (maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung
α -rEhHyp (maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung
α -rEhKinase (maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung

α -rEhURE3-BP(maus) primärer Antikörper	eigene Herstellung
------------------------------------------------	--------------------

2.8 Puffer und Lösungen

NaPBS (1x), pH 6.8

Na ₂ HPO ₄	6.7 mM
NaH ₂ PO ₄	3.3 mM
NaCl	140 mM

TBE (10x)

Tris	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	25 mM

TE (10x)

Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
EDTA (pH 8.0)	5 M

Sammelgelpuffer PAGE

(4x Tris/SDS pH 6.8)	
Trisbase	500 mM
SDS	0.4 %

Sterilfiltrieren

Gelpuffer (3x) Tricingele, pH 8.45

Trisbase	3 M
SDS	0.3 %

PBS (10x), pH 7.4

Na ₂ HPO ₄	570 mM
KH ₂ PO ₄	180 mM
NaCl	750 mM

TBS (10x)

Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
NaCl	1.5 M

Trenngelpuffer für PAGE

(4x Tris/SDS pH 8.8)	
Trisbase	1,5 M
SDS	0.4 %

Sterilfiltrieren

Laufpuffer (10x) PAGE

Trisbase	250 mM
Glycin	1.9 M
SDS	1 %

Kathodenpuffer (10x) Tricingele,

<u>pH 8.25</u>	
Trisbase	1 M
Tricine	1 M
SDS (w/v)	1 %

Lösung A (ECL-Detektion)

TrisHCl (pH6.8) 200 mL 0.1 M

Luminol 50 mg

Lagerung bei 4 °C

Lösung B (ECL-Detektion)

DMSO 10 mL

Para-Hydroxycoumarinsäure 11 mg

Dunkel lagern bei RT

Lösung C (ECL-Detektion)

H₂O₂ 30 %

Lagerung bei 4 °C

Elektroporationspuffer

(Cytomix inkomplett)

KCl 120 mM

CaCl₂ 0.15 mM

Arbeitslösung ECL-Detektion

Lösung A 5 mL

Lösung B 500 µL

Lösung C 1,5 µL

Kaliumphosphatpuffer(pH 7.6) 10 mM

HEPES (pH 7.6) 25 mM

EDTA (pH 7.6) 2 mM

MgCl₂ 5 mM

Transferpuffer (1x)(Towtrin-Puffer), pH 8.3

Tris 25 mM

HEPES

HEPES 10 mM

Triton X-100

1 % Triton X-100 in 1 x NaPBS

Elektroporationspuffer (Cytomix inkomplett)

KCL 120 mM

CaCl₂ 0,15 mM

Kaliumphosphatpuffer 10 mM

(pH 7,6)

HEPES (pH 7,6) 25 mM

EDTA (pH 7,6) 2 mM

MgCl₂ 5 mM

TAE (50x)

NaAcetat x 3H₂O 5 mM

Tris Pure 40 mM

Na₂EDTA 2 mM

CP-Assay-Puffer (pH 7,0)

KH₂PO₄ 100 mM

EDTA 2 mM

2.9 Kulturmedien und Medienzusätze

LB-Medium:

Lennox L Broth Base 20 g

ad 1 L A. dest, autoklavieren

LB-Agar zur Herstellung von Agarplatten:

Lennox L Broth Agar 32 g

ad 1 L A. dest, autoklavieren

TY-I-SS Medium (Diamond *et al.*, 1978):

Trypticase	80 g
Hefeextrakt	40 g
Glucose	40 g
NaCl	8 g
K ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
L-Cystein	4 g
Ascorbinsäure	0.8 g
Fe(III)-Ammoniumcitrat	0.0912 g

Die Bestandteile des TY-I-SS-Mediums wurden in 3480 mL H₂O_{bidest.} gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf pH 6.8 eingestellt. Zum Autoklavieren des inkompletten Mediums wurde ein Dampfkochtopf genutzt, in dem es bei einem Druck von 1.4 bar für 30min auf 120 °C erhitzt wurde. Durch die Zugabe von 50 mL inaktiviertem Rinderserum (2 x 30min bei 56 °C), 15 mL *Diamond Vitamin Tween 80 Solution*, 200 U/mL Penicillin und 200 µg/mL Streptomycin wurden vor Gebrauch jeweils 400 mL Medium komplettiert und anschließend steril filtriert.

In der folgenden Tabelle (**Tab. 2.9**) sind alle Antibiotika aufgeführt die als Medienzusätze zur Selektion eingesetzt wurden.

Tab. 2.9: Verwendete Antibiotika (als Medienzusätze)

Mediumzusatz	Stammlösung in A. dest	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg / mL	100 µg/mL LB-Medium
G418-Sulfat	50 mg / mL	10 – 65 µg/mL TY-Medium
Kanamycin	50 mg / mL	50 µg/mL LB-Medium
Streptomycin	200 mg / mL	200 µg/mL TY-Medium
Penicillin	2 x 10 ⁵ U / mL	200 U/mL TY-Medium

2.10 Organismen

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Organismen näher beschrieben.

2.10.1 *Entamoeba histolytica*

Systematik von *Entamoeba histolytica*

Domäne: Eukaryota

Stamm: Amoebozoa

Klasse: Entamoebidea

Gattung: *Entamoeba*

Art: *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)

Tab. 2.10: *Entamoeba histolytica*-Stämme

Art	Isolat / genetischer Subtypus	Bezug
<i>E. histolytica</i>	HM-1:IMSS-„Zelllinie A“	2001 von ATCC
<i>E. histolytica</i>	HM-1:IMSS-„Zelllinie B“	1991 von ATCC

HM-1:IMSS: Pathogener Stamm, isoliert 1964 aus einem Patienten mit Kolitis. Heutzutage existieren verschiedene, in Kultur gehaltene Subtypen.

HM-1:IMSS Zelllinie A: Isolat, welches im TIGR-Sanger-Genomprojekt sequenziert wurde (Loftus *et al.*, 2005). Im Folgenden wird dieses Isolat immer als Zelllinie A bezeichnet.

HM-1:IMSS Klon A1-A12: Generiert aus Zelllinie A im Rahmen dieser Arbeit

HM-1:IMSS Zelllinie B: Syngenisches zu Zelllinie A. Besitzt eine hohe Pathogenität im Tiermodell (Wüstenrennmaus). Zelllinie B wurde seit ihrer Isolierung durchgängig in axenischer,

mikroaerophiler Kultur ohne Wirtspassage gehalten, was ihre Pathogenität nicht beeinflusst hat. Im Folgenden wird dieses Isolat immer als Zelllinie B bezeichnet.

HM-1:IMSS Klon B1-B12: Generiert aus Zelllinie B im Rahmen dieser Arbeit

2.10.2 *Meriones unguiculatus*

Systematik:

Stamm: Chordata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Rodentia

Überfamilie: Muroidea

Familie: Muridae

Unterfamilie: Gerbillinae

Gattung: *Meriones*

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

2.10.3 *Mus musculus*

Stamm: Chordata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Rodentia

Überfamilie: Muroidae

Familie: Muridae

Unterfamilie: Murinae

Gattung: *Mus* (Mäuse)

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

2.10.4 *Escherichia coli* – Stämme

In **Tab. 2.11** sind die beiden in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme aufgeführt

Tab. 2.11: Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3) pAPlac ^Q	HsdS, gal(λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)[pAPlac ^Q]	Dr. O. Fayet, Toulouse
<i>OneShotTop10</i> TM	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 lacX74 deoR rec A1 araD139 Δ (araleu)7697 gal U gal K rpsL (Str ^R) end A1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe

2.11 Plasmide

In **Tab. 2.12** sind alle im Verlauf dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide aufgeführt.

Tab. 2.12: Verwendete und hergestellte Plasmide

Bezeichnung	Größe (kb)	Merkmale	Referenz
pCR [®] 2.1 TOPO [®] Vector	3.9	siehe Produktbeschreibung	Invitrogen, Karlsruhe
pJC45	2.4	Amp ^r , colE1 ori, T7-Polymerase unter λ p _L -lacOperator, 10His, Faktor Xa, Terminator	(Clos and Brandau 1994)
pJCrEhCopine	2.8	siehe pJC45, Gesamtes Gen XM_644108	diese Arbeit
pJCrEhDnaJ	2.6	siehe pJC45, Teil XM_648397	diese Arbeit
pJCrEhHydA	2.6	siehe pJC45, Teil AF262400	diese Arbeit
pJCrEhTred1	2.6	siehe pJC45, Gesamtes Gen XM_651634	diese Arbeit
pJCrEhHyp	2.6	siehe pJC45, Gesamtes Gen XM_647328	diese Arbeit
pJCrEhguanine_nucbdprot.	2.6	siehe pJC45, Teil XM_651958	diese Arbeit
pJCrEhGrainin1	2.8	siehe pJC45, Gesamtes Gen XM_645280	diese Arbeit
pJCrEhKinase	2.8	siehe pJC45, Gesamtes Gen XM_647942	diese Arbeit
pJCrEhURE3-BP	2.8	siehe pJC45, Gesamtes Gen AF291721	diese Arbeit
pJCrEh40SribS10	2.6	siehe pJC45, Gesamtes Gen XM_648051	diese Arbeit
pJCrEh60SribL3	2.6	siehe pJC45, Teil XM_646950	diese Arbeit

pNC	6.0	Neo ^r , 5'/3'-Aktinbereiche und Lektinpromotor aus <i>E. histolytica</i>	(Hamann <i>et al.</i> , 1995)
pNCcMyc	6.1	siehe pNC, <i>c-myc</i>	(Matthiesen, Diplomarbeit 2009)
pNCEhClathrin-ac-cMyc	6.5	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_651158	diese Arbeit
pNCEhCOP9-sigcom-cMyc	7.4	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_650063	diese Arbeit
pNCEhTred1-cMyc	6.4	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_651634	diese Arbeit
pNCEhRho-GTPase-cMyc	6.7	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_649396	diese Arbeit
pNCEhAldehyd-cMyc	7.3	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_650258	diese Arbeit
pNCmaldehyd-cMyc	7.1	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_645763	diese Arbeit
pNCEhGrainin1-cMyc	6.7	Siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_645280	diese Arbeit
pNCEhV-type_ATPase-cMyc	6.5	siehe pNC, <i>c-myc</i> , XM_649277	diese Arbeit
pNB-CPA1	7	siehe PBS(+), Neo ^r , <i>ehcp-a1</i>	(Tillack <i>et al.</i> , 2006)
pNB-CPA2	6.9	siehe PBS(+), Neo ^r , <i>ehcp-a2</i>	(Tillack <i>et al.</i> , 2006)
pNB-CPA5	10.7	siehe PBS(+), Neo ^r , <i>ehcp-a5</i>	(Tillack <i>et al.</i> , 2006)
pNC-CPA4	6.9	siehe pNC, <i>ehcp-a4</i>	(Tillack, Dissertation 2009)
pNC-CPA6	6.9	siehe pNC, <i>ehcp-a6</i>	diese Arbeit
pNC-CPA7	6.9	siehe pNC, <i>ehcp-a7</i>	diese Arbeit
pNC-CPB8	7.4	siehe pNC, <i>ehcp-b8</i>	diese Arbeit
pNC-CPC13	7.8	siehe pNC, <i>ehcp-c13</i>	diese Arbeit

2.12 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Einzige Ausnahme bilden die Oligonukleotide für die durchgeführten SNP-Analysen welche von biomers bezogen wurden. Die Stockkonzentration der in TE-Puffer gelösten Oligonukleotide betrug 100 µM, die der Arbeitslösung 10 µM. Für die semiquantitative *Real-Time* PCR war eine niedrigere Konzentration von 5 µM erforderlich. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang zu finden.

2.13 Zellkultur von *E. histolytica*

2.13.1 Kultivierung von *E. histolytica*

Die Trophozoiten wurden unter mikroaerophilen, axenischen Bedingungen bei 35 °C in Kulturschalen (75 bzw. 250 mL) in komplettem TY-I-SS Medium kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen in einer bestimmten Menge Medium durch Schütteln abgelöst und, je nach

Wachstum, 4–10 % der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt, welche mit frischem Medium aufgefüllt wurde. Der Rest der Zellen wurde verworfen.

2.13.2 Klonierung von *E. histolytica*

Die Zellen wurden in 5 mL TY aufgenommen und 10 μ L der Zellsuspension in eine Zählkammer gegeben. Nach dem Auszählen von vier Großquadraten wurde folgende Formel angewandt:

Zellzahl aller 4 Großquadrate / 4 = $\bar{\varnothing}$ (Durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat)

$\bar{\varnothing} \times 10000 = \text{Zellen pro mL}$

Zellen pro mL / 1000 = Zellen pro μ L

Ein μ L der Zellsuspension wurde anschließend in der entsprechenden μ L-Anzahl gelöst um ein Verhältnis von einer Zelle pro μ L zu erhalten. Davon wurden ca. 40 μ L (somit ca. 40 Amöben) in 30 mL TY-Medium überführt und auf eine 96 well Platte aufgeteilt (ca. 200 μ L pro well). Die Platte wurde für mindestens 2 Stunden aber höchstens 8 Stunden im anaerob-Topf bei 36 °C stehen lassen damit die Amöben am Boden adherieren aber noch nicht anfangen sich zu teilen. Im Anschluss wurde mit dem Mikroskop jedes Well kontrolliert ob eine Einzelzelle vorliegt.

2.13.3 Zellernte von *E. histolytica*

Die Ernte der Trophozoiten erfolgte, wenn ein einschichtiger Zellrasen vorlag. Sollte eine RNA-Isolation erfolgen, wurden 10^6 Zellen in eine 70 mL Kulturflasche 24 Stunden vor dem Erntezeitpunkt eingesäht. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer. Durch kräftiges Schütteln wurden die Zellen in TY-I-SS Medium abgelöst und dann bei 4 °C und 400 x g für 5 min sedimentiert und zweimal mit NaPBS gewaschen.

2.13.4 Transfektion von *E. histolytica*

Das Prinzip der Transfektion durch Elektroporation beruht auf einer temporären Porenbildung der Zellmembran der Trophozoiten durch ein kurzzeitig einwirkendes elektrisches Feld. Diese Permeabilität ermöglicht den Eintritt der Vektor-DNA in die Zelle.

Für 4 Transfektionen wurden ca. 1×10^7 Zellen (250 mL Kulturflasche) wie in Abschnitt 2.13.3. beschrieben geerntet und anschließend das Sediment einmal mit inkomplettem Cytomix gewaschen. Unmittelbar vorher wurde der Cytomix durch Zugabe von 2.5 mg/mL ATP und 3 mg/mL reduziertem Glutathion komplettiert. Das Zellsediment wurde in 3.4 mL komplettem Cytomix resuspendiert. Pro Ansatz wurden in einer Elektroporationsküvette 800 μ L

der Amöbensuspension zu 100 µg Plasmid-DNA gegeben, durch auf- und abpipettieren vermischt und bei 1200 V und 25 µF zweimal hintereinander im Abstand von 2 s elektroporiert. Je nach ionischer Stärke und daraus resultierendem Widerstand, betrug die Zeitkonstante 0.4–0.6 ms. Direkt im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen zügig in 70 mL Kulturflaschen mit vorgewärmtem TY-I-SS Medium überführt.

Zur Erholung wurden die Amöben 48 h bei 35 °C ohne Selektionsdruck kultiviert, wodurch sich eine Mischkultur entwickelte. Anschließend wurde die Selektion mit 10 µg/mL des Neomycin-Analogons G418, passend zur plasmidspezifischen Antibiotikaresistenz, gestartet und im Laufe der weiteren Kultivierung wurde der Selektionsdruck von 10 µg/mL bis max. 50 µg/mL erhöht.

2.14 Bakterienzellkultur

Die Anzucht von *Escherichia coli* in LB-Medium erfolgte bei 37 °C unter aeroben Bedingungen in Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (150–200 rpm). Für die Isolierung von Klonen wurden Vereinzelungsaustrieche auf LB-Agarplatten hergestellt. Für die Stammhaltung von *E. coli*-Bakterien wurden die Zellen bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in LB-Medium bei 37 °C aerob angezogen, dann mit 1 Vol. 10 % sterilem Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert.

2.14.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um Bakterien zu befähigen, fremde DNA-Moleküle mit großer Effizienz aufzunehmen, werden die Zellen durch die Inkubation mit CaCl₂ kompetent gemacht. Für die Herstellung so genannter kompetenter Zellen wurden *E. coli* pAPlacI^Q-Bakterien in 40 mL LB-Medium inklusive 40 µL Kanamycin (50 mg/mL) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis mit gekühlten Lösungen und Rotoren durchgeführt. Die Kultur wurde in Eiswasser abgekühlt, für 15 min bei 350 x g zentrifugiert und das Sediment in 20 mL CaCl₂ (50 mM) resuspendiert. Nach einer 40-minütigen Inkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 350 x g. Das Zellsediment wurde nun in 5 mL CaCl₂ (50 mM) resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die Bakterien sind für ca. 1 Woche kompetent. Die kompetenten Zellen wurden für Transformationen mit pJC45 (siehe Abschnitt 2.14.2.) mit direkt anschließender rekombinanter Expression (siehe Abschnitt 2.20.1.) genutzt.

2.14.2 Transformation kompetenter Bakterien

Bei der Transformation von kompetenten Zellen mit den entsprechenden Vektoren inklusive spezifischem DNA-Fragment wurde weitestgehend nach der Methode von Cohen *et al.*

(1972) vorgegangen. Im Falle der Top10-Zellen wurden 25 μL Zellen mit 3 μL Ligationsansatz für 10 min auf Eis inkubiert, worauf ein Hitzeschock von 30 s bei 42 °C folgte, an den sich eine weitere Inkubation von 10 min auf Eis anschloss. Nach der Zugabe von 250 μL LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert, nach 1 h auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Bei der Transformation mit dem TOPO-Vektor war die Möglichkeit einer Blau-Weiß-Selektion gegeben. Hierzu wurden dem Ansatz vor dem Ausplattieren 40 μL 2 %ige 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)-Lösung zugegeben.

Kompetente pAPlacI^Q-Zellen wurden in leicht abgewandelter Form transformiert. Zu 200 μL Bakteriensuspension wurde 1 μL einer Plasmid-Mini-Präparation pipettiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte ebenfalls bei 42 °C allerdings für 90 s. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min mit anschließender Zugabe von 300 μL LB-Medium und einer weiteren Inkubation für 1 h bei 37 °C in einem Thermomixer. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz in 30 mL LB-Medium inklusive 30 μL Ampicillin (100 mg/mL) gegeben und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde dann mit einer rekombinanten Expression (siehe Abschnitt 2.20.1.) fortgefahren.

2.15 Isolierung von Nukleinsäuren

2.15.1 Isolierung genomischer DNA aus *E. histolytica*

Die genomische DNA aus *E. histolytica* wurde mit Hilfe des Invitrogen *EasyDNA* Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die daraus gewonnene DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die DNA wurde für PCR (siehe Abschnitt 2.18.1.) und SNP-Analysen (siehe Abschnitt 2.17.5) verwendet.

2.15.2 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA, welche u.a. für DNA-Sequenzierungen und Transformationen verwendet wurde, erfolgte mit Hilfe des *Fast Plasmid Mini Kit* von Eppendorf. Das Protokoll ist den Herstellerangaben zu entnehmen.

2.15.3 Plasmid-Maxi-Präparation aus *E. coli*

Für die Transfektion von *E. histolytica* (siehe Abschnitt 2.13.4) wurden größere Mengen reiner Plasmid-DNA benötigt. Für diesen Zweck wurde das *NucleoBond*[®]Xtra Maxi Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die gewonnene DNA wurde in 0.5–1 mL H₂O_{bidest.} resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.16 Isolierung, Reinigung und Fällung von RNA aus *E. histolytica*

2.16.1 RNA-Isolierung mit TRIzol (Invitrogen)

TRIzol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, welche die Integrität der zu isolierenden RNA erhält, während Zellen und Zellbestandteile lysiert werden. Nach der Ernte (siehe 2.13.3.) wurde das aus Trophozoiten bestehende Sediment in 1 mL TRIzol durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 μL Chloroform, welches durch Invertieren hinzugemischt wurde und einer weiteren Inkubationszeit von 2–3 min bei RT, folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 11500 x g. Anschließend waren deutlich 3 Phasen zu erkennen, bei denen sich in der obersten, wässrigen Phase die RNA befand. Diese Phase (ca. 600 μL) wurde abgenommen und die RNA durch die Zugabe von 500 μL Isopropanol gefällt. Nach einem Waschschriff mit 70 % EtOH und dem Trocknen des Sediments bei 56 °C wurde die RNA in 100 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ durch stetiges Auf- und Abpipettieren aufgenommen.

Die isolierte RNA wurde zur Erststrangsynthese für *Real-time* PCR Versuche benötigt. Hierzu erfolgte eine zusätzliche Reinigung mit einer *RNeasy-Kit* Säule und anschließende DNase-Behandlung.

2.16.2 RNA-Reinigung und DNA-Verdau mit dem *RNeasy*[®]-*Mini-Kit* (Qiagen)

Zur zusätzlichen Reinigung der isolierten RNA wurde das *RNeasy*[®]-*Mini-Kit* in Anlehnung an die Herstellerangaben verwendet. Die in 100 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöste RNA wurde mit 350 μL RLT-Puffer und 250 μL 100 % EtOH gemischt, auf die Säule gegeben und mit 350 μL RW-1 Puffer gewaschen. Es folgte ein DNA Verdau auf der Säule mit dem *RNase-Free DNase Set* nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 25 μL HPLC- H_2O eluiert und entweder direkt im Anschluss zur Erststrangsynthese eingesetzt oder mit Natriumacetat gefällt und bei -70 °C gelagert.

2.16.3 Fällung der RNA

Zur Lagerung und Entsalzung der RNA-Lösungen wurde eine Fällung mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2.5 Vol. Isopropanol durchgeführt. Um die RNA wieder zu lösen wurde der Ansatz für 10 min bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert, einmal mit 70 % EtOH gewaschen, die RNA bei 56 °C getrocknet und wieder in HPLC- H_2O resuspendiert.

2.17 DNA-Analysen

2.17.1 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Die Konzentrationsbestimmung von gelösten DNA- und RNA-Proben erfolgte durch eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für eine optische Dichte von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/mL, für RNA eine Konzentration von 40 µg/mL angenommen. Die Reinheit wurde anhand des Verhältnisses von OD_{260nm} zu OD_{280nm} überprüft. 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).

2.17.2 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können, aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld, für analytische oder präparative Zwecke, ihrer Größe nach getrennt werden. Hierbei ist die Wandergeschwindigkeit der DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Zur Beladung des Gels wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen Ladebuffer versetzt und anschließend bei konstanten 120 V getrennt. Ausgehend von der Größe des Zielfragments wurden Agarosekonzentrationen von 1–3 % (w/v), in 1 x TBE-Puffer, eingesetzt. Durch die Zugabe von 0.1 µg/mL Ethidiumbromid, einem in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoff, konnten die getrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden. Um hierbei Fragmentgrößen abschätzen zu können, wurden DNA-Längenstandards eingesetzt.

2.17.3 DNA- Präparation und Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Reinigung von gewünschten DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpell unter schwachem UV-Licht ausgeschnitten. Die Elution aus der Agarose erfolgte mit dem *NucleoSpin® Extract II Kit* der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

2.17.4 DNA-Sequenzanalysen

Die Kontrolle der Korrektheit der Sequenzen der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch eine DNA-Sequenzierungsreaktion (Sanger *et al.*, 1977).

Als Sequenzier-*Primer* im TOPO Vektor dienten die Oligonukleotide M13F und M13R. Die Analyse der Sequenzen der Fragmente im pJC45-Vektor erfolgte mit Hilfe des *Primers* pJC45 forward und die der Fragmente in pNC wurden mit Hilfe des *Primers* 1239-S-Neo analysiert. Die Sequenzierungsreaktion und Sequenzanalyse wurde von der Firma Eurofins

MWG Operon durchgeführt. Die Überprüfung der Integrität der analysierten DNA-Fragmente erfolgte anschließend mit Hilfe der *Software* MacVector[®]

2.17.5 SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Analysen

2.17.5.1 Probendesign

Für die mit dem *LightTyper* (Roche) durchgeführten SNP-Analysen wurden sequenzspezifische Oligonukleotide designed, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (6fam und BMN5) markiert wurden. 6fam diente hierbei als Donor und BMN5 als Akzeptor. Der Donorfarbstoff wird durch den LightTyper angeregt und aktiviert daraufhin den Akzeptor, welcher ein Fluoreszenzsignal einer anderen Wellenlänge als der Donor emittiert. Diese Energieübertragung, genannt Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET), ist abhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Die markierten Oligonukleotide werden zusammen mit den Oligonukleotiden designed, welche zur Amplifikation der, den SNP enthaltenden, Zielsequenz benötigt werden. Es muss darauf geachtet werden, dass die Oligonukleotide untereinander nicht kreuzhybridisieren, dass sie innerhalb des zu untersuchenden Organismus zielsequenzspezifisch sind und einer der markierten Oligonukleotide muss über dem zu untersuchenden SNP liegen. Letzterer wird als Sensor bezeichnet und muss eine mindestens 3 °C geringere Schmelztemperatur (T_m) aufweisen als der zweite markierte Oligonukleotid, genannt der Anker. Die Fluoreszenzmarkierungen müssen so platziert sein, dass sie, wenn beide Oligonukleotide an die Zielsequenz hybridisiert sind, nebeneinander liegen. Zusätzlich muss am freien 3'Ende eine Phosphorylierung eingebaut werden, um eine Verlängerung während der PCR zu verhindern,

Die SNP-Detektion basiert auf Schmelzkurvenprofil-Analysen. Bei Temperaturen unter dem T_m von Anker und Sensor binden beide an die Zielsequenz, der Donor aktiviert den Akzeptor und der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) findet statt. Durch die Erhöhung der Temperatur lösen sich die Oligonukleotide, jeder bei seiner spezifischen T_m , FRET wird gestoppt und das Fluoreszenzsignal fällt ab. Die Temperatur bei welcher sich der Sensor ablöst hängt von der Sequenz ab an die er hybridisiert ist. Falls ein SNP auftritt, in der Region wo der Sensor bindet, wird der Komplex destabilisiert und der Sensor löst sich bereits bei einer niedrigeren Temperatur als im Falle eines *perfect match*. So erhält man unterschiedliche Schmelzkurven, je nachdem ob ein SNP detektiert wurde oder nicht.

2.17.5.2 PCR-Optimierung

Bevor alle in dieser Arbeit generierten Klone der Zelllinien A und B getestet werden konnten wurde eine PCR-Optimierung vorgenommen um unterschiedliche MgCl₂ Konzentrationen zu testen. Hierbei wurde eine asymmetrische PCR durchgeführt in der 5x häufiger der DNA-Strang amplifiziert wurde an welchen Anker und Sensor binden.

Die Ansätze wurden in eine 384-*well* Platte pipettiert, kurz runterzentrifugiert und im Anschluss mit 10 µL Öl überschichtet bevor sie in den Thermocycler

Folgender 10 µL-Reaktionsansatz wurde verwendet:

BD-Puffer (10x)	1 µL
<i>Solution S</i>	1 µL
dNTP's (10mM <i>each</i>)	200 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1mM / 2mM / 3mM
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µL)	0.2 µL
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µL)	1 µL
Sensor (4 pmol/µL)	0.2 µL
Anker (4 pmol/µL)	0.2 µL
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µL)	0.2 µL
DNA (5ng/µL)	2 µL
HPLC-H ₂ O	ad. 10 µL

Thermocycler-Programm:

Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
45 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	20 s
<i>Annealing</i>	55 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	5 min

Vor der Analyse imit dem LightTyper wurden die Proben noch mal 2 min bei 95 °C denaturiert.

Die in der LightTyper-Analyse erhaltenen Schmelzkurven wurden mittels *LightTyper-Software* (Roche) ausgewertet. Nach dem ermitteln der idealen PCR-Bedingungen wurden alle Klone unter Verwendung der entsprechenden MgCl₂-Konzentration getestet.

2.18 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.18.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur spezifischen Amplifizierung von gewünschten DNA-Fragmenten *in vitro* (Higuchi *et al.*, 1988) genutzt. Als Matrize diente isolierte genomische DNA (siehe Abschnitt 2.15.1.) aus *E. histolytica*, an die zwei gegenläufige Oligonukleotide gebunden haben, von denen aus der gewählte DNA-Bereich enzymatisch amplifiziert wurde. Eine solche Vermehrung verläuft exponentiell, da jeder neu gebildete Strang jeweils wieder als Matrize dienen kann. Die PCR besteht aus drei grundlegenden, zyklisch ablaufenden Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize (*Annealing*) und der anschließenden DNA-Synthese (Elongation).

Folgender 50 µL-Reaktionsansatz wurde verwendet:

<i>Taq</i> -Puffer (5x) (Promega)	10 µL
dNTP's (10mM)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	5 µL
Oligonukleotid 1 (10 µM)	1 µL
Oligonukleotid 2 (10 µM)	1 µL
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µL)	0.9 µL
<i>Pfu</i> -Polymerase (2.5 U/µL)	0.1 µL
DNA	1 µL
HPLC-H ₂ O	ad. 50 µL

Thermocycler-Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
29 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	30 s
<i>Annealing</i>	40–55 °C	30 s
Elongation	68 °C	30 s – 1 min 30 s
Finale Elongation	68 °C	10 min

Die gewählte *Annealing*-Temperatur ist abhängig von Länge, Spezifität und GC-Gehalt der Oligonukleotide und schwankt demnach. Die Zeitspanne der Elongation ergibt sich aus der Länge des zu synthetisierenden Fragments. Man berechnet bei der *Taq*-Polymerase im Schnitt 1 min Elongation pro 1 kb Fragment.

Für die Klonierung in den TOPO-Vektor muss das PCR-Produkt Adenosinüberhänge aufweisen. Dies wurde durch die finale Elongation sichergestellt.

2.18.2 Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktionsanalyse diente der Identifizierung klonierter DNA-Fragmente und der spezifischen Präparation zur Klonierung von DNA-Molekülen. Die Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Für analytische Zwecke wurden in einem 20 µL-Ansatz ca. 2 µg DNA, bei präparativen 50 µL Ansätzen 20–40 µg DNA mit 1–2 U Enzym/µg DNA enzymatisch gespalten. Die Inkubation erfolgte bei *FastDigest* Enzymen von Fermentas für 15–30 min, bei Restriktionsenzymen von NEB für 90 min bei 37 °C.

2.18.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von PCR-Produkten mit Adenosinüberhängen in den Vektor pCR[®]2.1 TOPO erfolgte mit dem TOPO TA-Cloning[®] Kit nach Herstellerangaben.

Spezifisch enzymatisch gespalte DNA-Fragmente sowie Vektoren wurden nach der Präparation und Extraktion aus Agarosegelen (siehe Abschnitt 2.17.3.) mit Hilfe der T4-Ligase von Fermentas ligiert. Das Verhältnis von Vektor-DNA zu DNA-Fragment betrug 1:3 in einem

Gesamtansatz von 15 μL :

Vektor und Fragment (Verhältnis 1:3)	max. 10 μL
Ligationspuffer T4-Ligase (10x)	1.5 μL
T4-Ligase (5 U/ μL)	1 μL
ATP (25mM)	2.5 μL

Falls nötig H_2O ad.15 μL .

Der Ansatz wurde entweder über Nacht bei 14 °C oder über 2 Tage bei 4 °C inkubiert, vor der Transformation der *OneshotTop10*-Zellen (siehe Abschnitt 2.14.2.).

2.19 RNA-Analysen

2.19.1 Erststrangsynthese (cDNA-Synthese)

Die Konzentration der eingesetzten isolierten Gesamt-RNA wurde mittels OD-Messung bestimmt. Die cDNA-Synthese fand unter Verwendung des *SuperScriptIII-First-Strand-Synthesis System-Kit* (Invitrogen) statt. Um aus der Gesamt-RNA selektiv die mRNA in cDNA umzuschreiben, wurde der Oligo(dT)-Primer (Invitrogen) verwendet, der spezifisch mit dem 3'-Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA hybridisiert.

Verwendeter Reaktionsansatz (20 μL):

RNA	1 μg
Synthesepuffer (5x)	4 μL
DTT (0.1 mM)	2 μL
dNTPs (10 mM)	2 μL
Oligo (dT7-I)-Primer	1 μL
SuperScript III	1 μL
<i>RNase out</i>	0.5 μL
MgCl_2 (25 mM)	0.4 μL
H_2O	ad 20 μL

Der Ansatz wurde bei 42 °C für 1 h inkubiert und bei -20 °C gelagert. Die gewonnene cDNA wurde für quantitative *Real-Time-PCR*-Analysen verwendet (siehe Abschnitt 2.19.2.).

2.19.2 Quantitative *Real-Time* PCR

Die Methode der *Real-Time* PCR dient der quantitativen Analyse der Genexpression. In dieser Diplomarbeit wurde mit dem Konzept der relativen Quantifizierung gearbeitet. Hier wird die Stärke der Expression eines Zielgens (*gene of interest* (GOI)) in Relation zu einem Referenzgen (*normalizer gene*), welches keiner Regulation unterliegt (*housekeeping gene*) und somit konstitutiv exprimiert wird, gemessen. Dieses Normalisierungsgen dient als interner Standard, wodurch Variationen in der cDNA-Ausgangsmenge ausgeglichen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde das jeweilige Zielgen mittels β -Actin normalisiert. Ermöglicht wird die Detektion der Zunahme des Amplifikats während der PCR durch die Fluoreszenz eines mit doppelsträngiger DNA interkalierenden Reporterfarbstoffes wie Ethidiumbromid oder SYBR[®] *Green* I. Das in dieser Arbeit verwendete SYBR[®] *Green* I ist ein Cyaninfarbstoff welcher im Komplex mit DNA bei Anregung durch einen Laser ein Signal bei 522 nm emittiert. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge der amplifizierten Produkte. Durch die Messung an jedem Zyklusende erfolgt eine Verfolgung des PCR-Verlaufs in Echtzeit. Die geringe Spezifität des SYBR[®] *Green* I Reporterfarbstoffes, welche zu falsch positiven Signalen durch *Primer*-Dimere oder unspezifische Produkte führen kann, wurde durch das im *Assaysystem* enthaltene, die Spezifität verbessernde ROX-Reagenz kompensiert. Zusätzlich wurde nach Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, durch welche alle unspezifischen Produkte identifiziert und aus der Analyse ausgelassen werden konnten.

Die Quantifizierung der Zielgen-Expression erfolgt über die Bestimmung des Zykluses, bei dem der Schwellenwert überschritten wird (*threshold cycle*). Das ist der Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Er definiert den Zeitpunkt ab dem die Amplifikation exponentiell erfolgt. Je mehr cDNA des zu untersuchenden Zielgens beim Start der Reaktion vorhanden ist, umso weniger Zyklen werden bis zum Erreichen des Zyklus der Schwellenüberschreitung benötigt.

Bei Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode wird zunächst die Differenz (Δ) der C_T -Werte von Zielgen zu Normalisierungsgen ermittelt:

$$\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Normalisierungsgen}}$$

Im Anschluss wird der erhaltene ΔC_T -Wert ins Verhältnis zu einer als Kalibrator dienenden Kontrollprobe gesetzt:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Zielgen}} - \Delta C_{T\text{Kalibrator}}$$

Die relative Expression eines Zielgens im Verhältnis zu einem Kalibrator ergibt sich aus der Formel:

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Für den Reaktionsansatz wurde das *RealMasterMix SYBR Rox Kit* von 5 Prime nach Herstellerangaben verwendet.

20 µL Reaktionsansatz:

<i>Real Master Mix</i> (2,5x)/SYBR Green + ROX (20x)	9 µL
Oligonukleotid 1 (5 pmol/µL)	2 µL
Oligonukleotid 2 (5 pmol/µL)	2 µL
HPLC-H ₂ O	6 µL
cDNA	1 µL

In die Negativkontrolle wurde statt cDNA 1 µL HPLC-H₂O gegeben.

*Cycler*programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	60 s
35 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	15 s
<i>Annealing</i>	58 °C	20 s
Elongation und Detektion	68 °C	20 s

Die Schmelzpunktanalyse wurde im Anschluss durchgeführt. Der Temperaturanstieg von 55 °C auf 95 °C erfolgte in 1 °C-Schritten, wobei der erste 60 s, alle folgenden 8 s dauerte.

2.20 Proteinanalysen

2.20.1 Rekombinante Expression

Für die rekombinante Expression von Teilen bestimmter Gene aus *E. histolytica* wurden die Plasmide pJCrEhCopine, pJCrEhDnaJ, pJCrEhHydA, pJCrEhTred1, pJCrEhHyp, pJCrEhguanine_nucbdprot., pJCrEhGrainin1, pJCrEhKinase, pJCrEhURE3-BP, pJCrEh40SribS10, pJCrEh60SribL3 in kompetente pAPlacI^Q-Zellen transformiert. Die Übernacht-Kultur des Transformationsansatzes wurde am nächsten Tag in 500 mL LB-Medium inklusive 500 µL Ampicillin (100 mg/mL) und 500 µL Kanamycin (50 mg/mL) gegeben und in einem Schüttel-

inkubator unter aeroben Bedingungen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–1 angezogen. Durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde die Genexpression induziert. Die Zellernte erfolgte 4-5 h nach der Induktion durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 4000 x g. Die Zell-Sedimente wurden bis zum Aufschluss bei -20 °C gelagert. Die rekombinanten Proteine wurden zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet (siehe Abschnitt 2.21.).

2.20.2 Reinigung der Histidinpeptid markierten rekombinant exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie

Durch das im pJC45-Vektor mitkodierte His-Peptid ist es möglich über Affinitätschromatographie die rekombinanten Proteine herauszufiltern. Für den Aufschluss der Zellen wurde das Sediment zunächst in Puffer A ohne GuHCl gelöst und 7 x 20 s auf Eis mit Ultraschall behandelt. Es folgte eine Zentrifugation von 30 min bei 4 °C und 10000 x g. Im Überstand I befand sich nach diesem Vorgang die lösliche Proteinfraction. Um auch die unlöslichen Proteine zu erhalten wurde das Sediment erst in Puffer A + 1 M GuHCl gelöst, 10 min im Ultraschallbad inkubiert und 15 min bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert, der Überstand (II) erneut abgenommen und das ganze mit Puffer A + 4 M GuHCl wiederholt (Überstand III).

Die drei Überstände mit den Proteinen mit unterschiedlichem Lösungsverhalten wurden durch eine Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.20.7.) daraufhin überprüft, in welchem das gewünschte rekombinante Protein zu finden ist. Dies war über einen anti-His-Peptid Antikörper möglich, der gegen das Histidin-Peptid gerichtet ist.

Der entsprechende Überstand wurde über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Hierzu wurde der gesamte Überstand mit 4 mL Ni-NTA (Quiagen, Hilden) welches zuvor mit 5 Vol Puffer A + 4 M GuHCl äquilibriert wurde gemischt und für 20 min unter Schwenken bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch auf die Säule gegeben und der Durchlauf mit geringer Flussrate gestartet. Die Säule durfte hierbei in keinem Fall trocken laufen. Es folgten vier Waschschritte mit 25 mL Puffer A + 4 M GuHCl, 50 mL Puffer B, 30mL Puffer C und 50 mL Puffer C + 20 mM Imidazol. Eluiert wurde mit 20 mL Puffer C + 500 mM Imidazol in 1 mL Fraktionen. Die Lagerung der Eluate erfolgte bei -20 °C.

2.20.3 Herstellung von Proteinextrakten aus *E. histolytica*

Der Zellaufschluss zur Herstellung von Amöbenextrakten erfolgte durch die „freeze and thaw“-Methode. Hierbei wurden die Trophozoiten geerntet, sedimentiert und in kaltem NaPBS gewaschen. Im Falle von Extrakten für Westernblot-Analysen und Proteinkonzent-

ration-Bestimmungen wurden die Amöben mit 30 μ M E64 versetzt, um die Proteine vor den eigenen Peptidasen von *E. histolytica* zu schützen. Bei Extrakten die in CP-Assay eingesetzt werden sollten um die CP-Aktivität zu bestimmen wurde der Inhibitor weggelassen. Anschließend wurden die Zellen durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff lysiert. Durch Zentrifugation (1h/ 40000 rpm/ 4 °C) wurden die Zellbruchstücke und unlösliche Fraktion sedimentiert, die lösliche Fraktion befand sich im Überstand. Das verbleibende Zellsediment wurde 2fach mit kaltem NaPBS gewaschen und anschließend in NaPBS+1%TritonX100 resuspendiert. Durch Zentrifugation wurden die verbleibenden Zellfragmente sedimentiert, die NaPBS unlösliche Membranfraktion befand sich im Überstand.

Die Lagerung der mit E64 behandelten Extrakte erfolgte bei -20 °C, die der nicht mit E64 behandelten Extrakte bei -70 °C.

2.20.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der BCA-Test der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.20.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Zur Trennung von Proteingemischen, sowie der damit verbundenen Molekulargewichtsbestimmung, wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Neben SDS-Polyacrylamidgelen wurden für kleine Proteine (< 25 kDa) Tricin-Gele verwendet, um eine bessere Auftrennung im niedermolekularen Bereich zu erhalten. Es wurde grundsätzlich zuerst das Trenngel gegossen, welches im Falle der SDS-Gele bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet wurde um eine ebene Oberfläche zu schaffen. Dies war bei Tricingelen nicht notwendig, hier konnte direkt das Sammelgel auf das Trenngel gegeben werden. Die Zusammensetzung der einzelnen SDS-PAGE-Lösungen ist der folgenden Tabelle (**Tab. 2.13**) zu entnehmen.

Tab. 2.13: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Lösungen

Lösungen	Tricin-Gele		SDS-Gele			
	Trenngel % 16	Sammelgel % 4	Trenngel % 12	10	Sammelgel % 6	4
Glycerin (mL)	1.5	-	-	-	-	-
3 x Gelpuffer (mL)	2.25	1.125	-	-	-	-
Acrylamid/Bisacrylamidlösung Mischung 49:1 (mL)	3.25	-	-	-	-	-

Acrylamid/Bisacrylamidlösung Mischung 32:1 (mL)	-	0.65	-	-	-	-
Acrylamid/Bisacrylamidlösung Mischung 37.5 :1 (mL)	-	-	4.5	3.25	2.25	0.65
Trenngelpuffer pH8.8 (mL)	-	-	2.82	2.82	2.82	-
Sammelgelpuffer pH 6.8 (mL)	-	-	-	-	-	1.25
H ₂ O (mL)	1	6.45	3.9	4.65	7.8	3.05
APS (25 % w/v) (µL)	25.6	24	75	75	75	25
TEMED (µL)	7.5	7.5	15	15	15	5

Die Proben wurden mit Proteinprobenpuffer versetzt und für 3-5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung erfolgte bei 25-30 mA /Gel. Im Anschluss wurden die Gele entweder zur Detektion aller Proteine über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und am nächsten Tag mit Entfärbelösung soweit entfärbt bis deutliche Proteinbanden zu erkennen waren, oder zum Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen zur anschließenden Immunodetektion einzelner Proteine verwendet.

2.20.6 Substrat-SDS-PAGE zum Nachweis von Peptidasen

Zum Nachweis enzymatischer Aktivität SDS-stabiler Peptidasen wird ein geeignetes Substrat wie Gelatine in einem SDS-Polyacrylamidgel kopolymerisiert. Die Gelatine muss vor Zugabe auf 65 °C erwärmt werden und die Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

Tab. 2.14: Zusammensetzung der Substrat-SDS-PAGE-Trenngellösungen

% Trenngel	7.5%	10%	12%
AA-BisAA (30%/0,8%) (mL)	5.64	7.5	9
TrisHCl/SDS pH8,8 (mL)	5.64	5.64	5.64
Gelatinelsg 10% (µL)	225	225	225
H ₂ O (mL)	11	9.1	7.6
APS 25% (µL)	75	75	75
TEMED (µL)	15	15	15

Für das Sammelgel siehe Abschnitt 2.20.5.

Der Gellauf findet bei 4°C im Kühlraum am besten mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer statt. Nach dem Lauf wird das Gel für 1h in 2% Triton X-100 bei RT gewaschen und an-

schließend für 2,5h in Inkubationspuffer bei 37°C inkubiert. Die Färbung mit Coomassie geschieht über Nacht.

Inkubationspuffer: 3,3 ml 3M NaAcetat

1 ml 10 % Triton

2 ml 1M DTT

mit H₂O ad 100 ml

2.20.7 Western-Blot und Immunodetektion

Der Western-Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Für das verwendete Elektroblothing im Tank-Blot Verfahren wurden zwei Fasermatten, vier Whatmanpapiere, eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrozellulosemembran und das Gel für wenige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Zusammenbau der Blotkassette erfolgte von der Kathodenseite zur Anodenseite folgendermaßen: Fasermatte, 2 Whatmanpapiere, Gel, Membran, 2 Whatmanpapiere, Fasermatte. Hierbei wurde darauf geachtet Luftblasen, vor allem zwischen Gel und Membran, zu vermeiden. Die Kassette wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer überführt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 400 mA unter Rühren.

Zur Proteindetektion wurden spezifische Antikörper verwendet. Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurde direkt im Anschluss die Membran für 30 min mit einer Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS/0,05 % Tween 20) inkubiert und so alle freien Bindungsstellen gesättigt. Darauf folgte die Inkubation mit dem spezifischen, primären Antikörper in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung. Es wurde 12 h, schwenkend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran zunächst dreimal für 10 min in TBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und ein weiteres mal für 30 min blockiert bevor die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 2 h bei RT gestartet wurde. Die in dieser Arbeit zur Immunodetektion verwendeten Antikörper einschließlich der Verdünnungen in denen sie eingesetzt wurden sind in **Tab. 2.15** zu finden.

Tab. 2.15: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen zur Immunodetektion.

Antikörper	Verdünnung in Blockierlösung
α -His-Peptid IgG (maus) primärer Ak	1:5000
α -cMyc-Peptid (<i>rabbit</i>) primärer Ak	1:2500
α -rEhDnaJ (maus) primärer Antikörper	1:500

α -rEhGrainin1 (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhguanine_nucbdprot. (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhHydA (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhHyp (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhKinase (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhURE3-BP(maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhDnaJ (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhGrainin1 (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhguanine_nucbdprot. (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhHydA (maus) primärer Antikörper	1:500
α -rEhHyp (maus) primärer Antikörper	1:500
<i>anti-mouse-HRP</i> sekundärer Ak	1:10000

Vor der Entwicklung erfolgten drei weitere Waschschrte. Nach Zugabe der ECL-Arbeitslösung folgte die Entwicklung mittels Röntgenfilm für 2 s bis 1 h.

2.20.8 CP-Assay zur Bestimmung der proteolytischen Cysteinpeptidase-Aktivität

Die proteolytische Aktivität der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* wurde gegenüber dem synthetischen Peptid Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid (Z-Arg-Arg-pNA) untersucht (Leippe et al., 1995). Bis zu 2 μ L eines NaPBS-löslichen Amöbenproteinextrakts wurden mit 198 μ L CP-Puffer, dem 1 mM DTT zugegeben wurde versetzt. Durch Zugabe von 2 μ L 10 mM Z-Arg-Arg-pNA in MeOH wurde die Reaktion gestartet und die, durch das Abspalten des p-Nitroanilins verursachte Absorption bei 405 nm, alle 5 min über 30 min hinweg photometrisch gemessen. 1 Unit (U) enzymatischer Aktivität ist definiert als die Menge Probe, welche die Reduktion von 1 μ mol/min p-Nitroanilins katalysiert. Die Volumenaktivität des Enzyms (mU/mL) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumenaktivität} = (\Delta E \times V_{\text{Messlösung}} \times 1000) / (t \times \epsilon_{\mu\text{mol}} \times d \times V_{\text{Probe}})$$

$$1U = 1 \mu\text{mol Substratumsatz/min}$$

$$\Delta E = \text{zeitabhängige Differenz der Absorptionswerte}$$

$$t = \text{Zeit (min)}$$

$$\epsilon_{\mu\text{mol}} = 8,8 \text{ cm}^2/\mu\text{mol (Extinktionskoeffizient für Substanz-Stoffkonstante)}$$

$$d = \text{Durchmesser der Küvette (cm)}$$

V_{Probe} = Eingesetztes Probenvolumen (mL)

2.21 Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung von spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen ausgewählte rekombinante Proteine von *E. histolytica* wurden jeweils 4 weibliche Balb/c Mäuse pro Protein verwendet. Für die 1. Immunisierung wurde den Tieren 50 µg Protein gemischt mit komplettem Freundschens Adjuvans (Sigma) *intra peritoneal* injiziert. Das komplette Freundschens Adjuvans ist eine Wasser-in-Öl-Emulsion die abgetötetes *Mycobacterium tuberculosis* zur Verstärkung der Immunantwort enthält. Nach jeweils 2 Wochen erfolgte die zweite und dritte Immunisierung. Hierfür wurden wieder jeweils 50 µg Protein, diesmal gemischt mit inkomplettem Freundschens Adjuvans *intra peritoneal* den Mäusen verabreicht. Nach insgesamt sechs Wochen wurde bei den Tieren eine Herzpunktion durchgeführt und ihnen so ihr Blut entnommen. Diese Versuchsteile wurden unter Aufsicht von PD Dr. med. vet. H. Lotter durchgeführt.

Das erhaltene Blut wurde bei 4 °C gelagert bis es vollständig geronnen war um im Anschluss für 5 min bei 4 °C und 400 x g zentrifugiert zu werden. Das Serum wurde in Form des Überstandes vorsichtig abgenommen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2300 x g nach dem eventuell vorhandene Reste des erhaltenen Serums abgenommen wurden. Die so erhaltenen polyklonalen Antikörper wurden zum spezifischen Nachweis und zur Lokalisation in Western-Blot-Analysen, und bei der Immunfluoreszenzfärbung von Trophozoiten verwendet.

2.22 Immunfluoreszenzanalyse

Der Immunfluoreszenz-Assay ermöglicht es, Proteine einer Zelle anzufärben und zu lokalisieren. Hierzu nutzt man fluoreszenzmarkierte Antikörper oder spezifische Farbstoffe.

2.22.1 Immunfluoreszenzfärbung von *E. histolytica*-Trophozoiten

Nach der Ernte der Trophozoiten und einem Waschschrift mit NaPBS wurde das Trophozoiten-Sediment zur Fixierung der Zellen vorsichtig in 1 mL frisch angesetztem 3 % PFA-NaPBS resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Angesetzt wurde die Arbeitslösung aus 40 % PFA (70 °C) und NaPBS (RT).

Nach der Fixierung der Zellen und einer kurzen Zentrifugation (2.5 min/RT/200 x g) wurde der Überstand verworfen und die Probe geteilt. Ein Teil der Zellen wurde mit Saponin behandelt, der andere nicht, um unterschiedliche Teile der Zelle für die Antikörper zugänglich zu machen. Saponin erhöht stark die Permeabilität der Zellmembran, wodurch Antikörper Zu-

gang zum Intrazellularraum erhalten. Die Inkubation erfolgte für 5 min in 500 µL frisch angesetzter NaPBSS-Lösung (0.05 % Saponin in NaPBS) während die andere Hälfte der Zellen in 500 µL NaPBS bei RT inkubiert wurde. Beide Proben wurden anschließend zentrifugiert (2.5 min/RT/200 x g) und der Überstand verworfen.

Zur Blockierung freier Aldehydgruppen erfolgte eine Aufnahme des Zellsediments in 500 µL 50 mM Ammoniumchloridlösung mit erneuter Inkubation von 15 min. Nach einer weiteren Zentrifugation (2.5 min/RT/200 x g), dem Verwerfen des Überstandes und einem Waschschrift erfolgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen. Diese geschah durch die Aufnahme der Amöbensedimente in 500 µL 2 % FCS-Lösung (erneut gelöst in NaPBS) und Inkubation für 10 min im Thermomixer bei RT. Daraufhin folgte eine weitere Zentrifugation (2.5 min/RT/200 x g), der Überstand wurde verworfen und ein Waschschrift durchgeführt, bevor der primäre Antikörper zu den Proben gegeben wurde.

Als primäre Antikörper wurden die selbst generierten Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die mit Proteinmarkierungs-Konstrukten transfizierten Amöben wurden mit *anti-c-Myc (rabbit)* in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Verdünnt wurden die Antikörper mit NaPBS. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT im Thermomixer mit anschließender Zentrifugation (2.5 min/RT/200 x g) und 3 Waschschriften bevor der sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper 1:400 verdünnt und Hoechst in einer Verdünnung von 1:400 hinzugegeben wurden. Es folgte eine letzte Inkubation von 1h bei RT im Thermomixer, Zentrifugation und wiederum 3 Waschschriften. Für die Detektion wurden die Zellsedimente in 200 µL NaPBS aufgenommen und bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt. Als fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden *anti-mouse* ALEXA Fluor[®] 488 (grün).

3 Ergebnisse

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

Beide *E. histolytica* Zelllinien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten von der ATCC als HM-1:IMSS-Isolat (Katalog-Nr. 30459) erhalten. Die apathogene Zelllinie A wurde in der *E. histolytica*-Genomanalyse verwendet (Loftus *et al.*, 2005) und befand sich seit 2001 durchgehend in Kultur unter axenischen Bedingungen. Die pathogene Zelllinie B wurde bereits 1991 direkt von der ATCC bezogen und wurde seitdem unter den gleichen Bedingungen wie Zelllinie A kultiviert. Schon immer unterschieden sich die beiden Zelllinien in ihrer Zellgröße und Wachstumsrate. Beim Einsetzen beider Zelllinien für Versuche zur Induktion von Amöbenleberabszessen (ALAs) bei mongolischen Wüstenrennmäusen *Meriones unguiculatus* stellte sich heraus, dass Zelllinie A nur in der Lage war sehr kleine oder gar keine Läsionen hervorzurufen, während Zelllinie B signifikant große Abszesse verursachte (Biller *et al.*, 2009). Beide Zelllinien standen schon länger unter dem Verdacht, dass es sich bei ihnen um Mischkulturen von Trophozoiten handelt, welche sich in ihrer Pathogenität unterscheiden. Um eine Mischkultur auszuschließen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Klonierung der beiden Zelllinien vorgenommen. Hierzu wurden wie in Abschnitt 2.13.2 beschrieben Einzelzellen ausgesät und pro Zelllinie konnten zwölf Klone generiert werden.

3.1.1 Analyse der Pathogenität der generierten Klone der Zelllinien A und B

Zur Überprüfung, ob es sich bei der apathogenen Zelllinie A und der pathogenen Zelllinie B um Mischkulturen handelt, wurden je 1×10^6 Trophozoiten der 24 Klone A1-A12 und B1-B12 in die Lebern von mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) injiziert, nach sieben Tagen die entstandenen Abszesse ausgemessen und zur Auswertung der Rohdaten in den folgenden Abszess-Score eingeteilt: 0 bedeutet kein Abszess, bei 1 wurde eine Abszessgröße < 1 mm beobachtet, bei 2 eine Abszessgröße von 1-5 mm und bei 3 wies der Abszess eine Größe von > 5 mm auf. Pro Klon wurden vier Versuchstiere verwendet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente wurden freundlicherweise von PD Dr. med. vet. Hannelore Lotter (BNI) durchgeführt. In Abb. 3.1 werden die erhaltenen Werte graphisch dargestellt. Sowohl bei Zelllinie A als auch bei Zelllinie B handelt es sich um eine Mischkultur. Dies geht aus den Variationen der Pathogenität unter den einzelnen Klonen hervor. Besonders bei den Klonen B1-B12 wurde dies deutlich. Mit den Klonen B1, B6 und B8 wurden apathogene Phänotypen in der eigentlich pathogenen Zelllinie B gefunden.

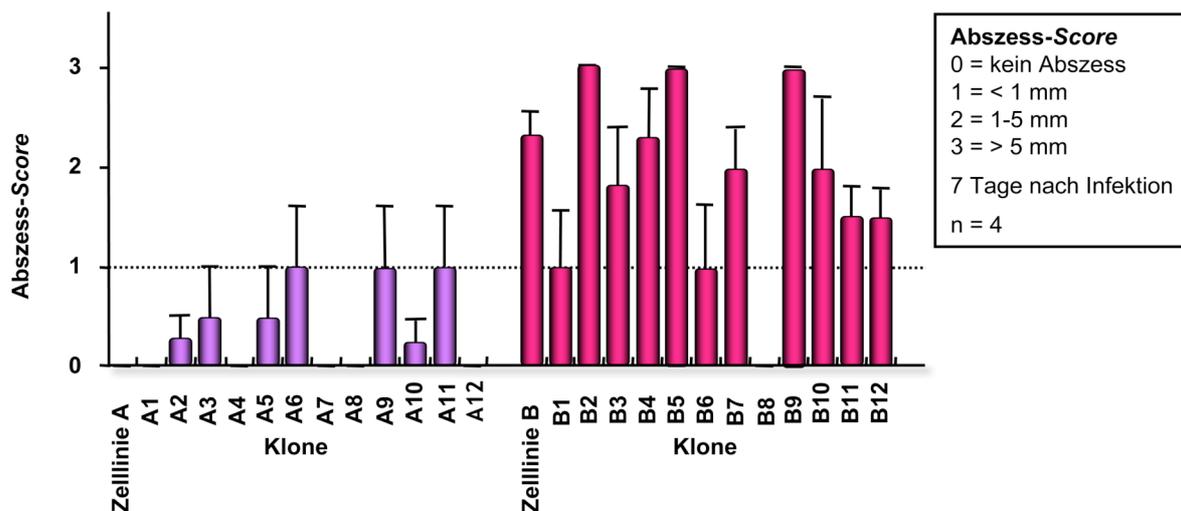


Abb. 3.1: Graphische Darstellung der Amöbenleberabszessbildung in *Meriones unguiculatus* durch Trophozoi-ten der *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinien A und B und der aus ihnen generierten Klone A1-A12 und B1-B12. Zur Auswertung der Rohdaten wurde der folgende Abszess-Score verwendet: 0 = kein Abszess, 1 = Abszess < 1 mm, 2 = Abszess 1-5 mm, 3 = Abszess > 5 mm. Ermittelt wurden die Abszessgrößen 7 Tage nach Injektion in die Leber von *Meriones unguiculatus*.

Um zu testen, ob sich die Klone auf Transkriptomebene verhalten wie die Zelllinien A und B, wurden stichprobenartig 16 Gene ausgesucht, deren Expression sich in vorangegangenen Studien als differentiell zwischen Zelllinie A und Zelllinie B erwiesen hat. Die entsprechenden Oligonukleotide für eine *Real-time* PCR Analyse lagen bereits vor (siehe Tab. 6.4 im Anhang). Von den 16 Genen wurden 8 als differentiell höher in Zelllinie A und 8 differentiell höher in Zelllinie B exprimiert (Biller, 2009). Als Proben wurden die mRNAs in Form von cDNA von Klon A1, Klon B2, Klon B8 und Klon B9 untersucht (beschrieben in Abschnitt 2.19.1). Als Referenzgen diente β -aktin und Klon A1 wurde als Kalibrator verwendet. Die *Real-time* PCR-Analyse wurde wie in Abschnitt 2.19.2 beschrieben durchgeführt. Die Grenzwerte für eine differentielle Genexpression wurden auf $\geq 2,5$ und $\leq 0,5$ festgelegt. Die Experimente wurden mit zwei biologischen Proben durchgeführt. Bei allen 16 untersuchten Genen konnten die erwarteten differentiellen Transkriptmengen nachgewiesen werden. Somit verhält sich der Klon A1 auf Transkriptom-Ebene für die getesteten Gene wie Zelllinie A und die Klone B2, B8 und B9 wie Zelllinie B (siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.1: *Real-time* PCR-Analyse der Klone A1, B2, B8 und B9 mit stichprobenartig ausgewählten Genen, welche bei Zelllinie A und Zelllinie B als differentiell exprimiert gefunden wurden. Die Grenzwerte für eine differentielle Genexpression wurden auf $\geq 2,5$ und $\leq 0,5$ festgelegt. Klon A1 wurde als Kalibrator verwendet (= 1). Die Werte für Zelllinie A und B stammen von Dr Laura Biller (Dissertation, 2009).

Genname	Accession-Nr.	Kalibrator	Real time-PCR-Daten			
		Zelllinie A/ Klon A1	Zelllinie B	Klon B2	Klon B8	Klon B9
IP:PFAM:XYPPX, Annexin	XM 648445	1	0	0	0	0
NHL wiederholendes Protein	XM 644469	1	0,3	0,4	0,4	0,2
IP:PFAM, Tetraspanin	XM 643681	1	0,1	0,2	0,2	0,1
Hypothetisches Protein	XM 647137	1	7,1	6,7	9,8	8,8
Hypothetisches Protein	XM 648869	1	3,8	5	7,5	3,9
AIG1-Familie Protein	XM 648725	1	100	4,9	26,5	8,9
AIG1-Familie Protein	XM 645223	1	4,8	3	3,3	1,3
AIG1-Familie Protein	XM 643009	1	100	18,5	27,5	19
Metallopeptidase 8-2	XM 647540	1	0	0	0	0
Fe-Hydrogenase	XM 647747	1	3,2	4,2	6,8	3,3
Rab-Familie GTPase	XM 646110	1	0	0	0	0
Rab-Familie GTPase	XM 684456	1	0	0	0	0
C2-Domänen-Protein	XM 650207	1	0	0	0	0
Rab-Familie GTPase	XM 651358	1	0	0	0	0
Erythrozyten-Bindungsprotein	XM 645291	1	50	22,8	19,3	15,5
Virales A-Typ-Einschlussprotein	XM 649962	1	1000	72,5	70	56,6

In allen weiteren Versuchen für die sonst Zelllinie A und Zelllinie B verwendet worden wären wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit der apathogene Klon A1 und der pathogene Klon B2 verwendet.

3.1.2 Subklonierung der Klone B8 und B9

Um abzusichern, dass es sich bei den Pathogenitäten der Klone um stabile Phänotypen handelt, wurden von dem apathogenen Klon B8 und dem hochpathogenen Klon B9 je fünf Subklone generiert und ihre Pathogenität ebenfalls im Tiermodell getestet. Es wurden je 1×10^6 Trophozoiten der 10 Klone B8_1-B8_5 und B9_1-B9_5 in die Lebern von mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) injiziert und nach sieben Tagen die entstandenen Abszesse ausgemessen und zur Auswertung der Rohdaten in den folgenden Abszess-Score eingeteilt: 0 bedeutet kein Abszess, bei 1 wurde eine Abszessgröße < 1 mm beobachtet, bei 2 eine Abszessgröße von 1-5 mm und bei 3 wies der Abszess eine Größe von > 5 mm auf. In Abb. 3.2 sind die erhaltenen Werte graphisch dargestellt. Es konnte bewiesen werden, dass es sich in beiden Fällen um stabile Phänotypen handelt.

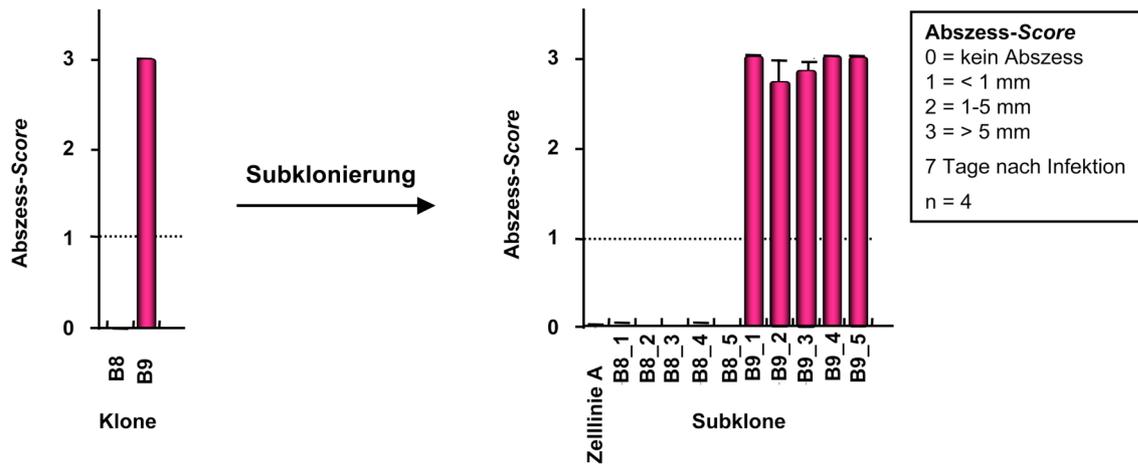


Abb. 3.2: Graphische Darstellung der Amöbenleberabszessbildung in *Meriones unguiculatus* durch Trophozoiten der *E. histolytica* HM-1:IMSS Klone B8 und B9 und der aus ihnen generierten Subklone B8_1-B8_5 und B9_1-B9_5. Zur Auswertung der Rohdaten wurde der folgende Abszess-Score verwendet: 0 = kein Abszess, 1 = Abszess < 1 mm, 2 = Abszess 1-5 mm, 3 = Abszess > 5 mm. Ermittelt wurden die Abszessgrößen 7 Tage nach Injektion in die Leber von *Meriones unguiculatus*.

3.2 Vergleichende *single nucleotide polymorphism* (SNP) -Analysen zwischen *E. histolytica* Klon A1 und Klon B2

Zelllinie A wurde im Jahr 2005 für die *E. histolytica*-Genomanalyse (Loftus *et al.*, 2005) eingesetzt, wodurch das gesamte Genom zugänglich wurde. Durch die Möglichkeit zwei syngene Zelllinien untersuchen zu können, welche sich in ihrer Pathogenität unterscheiden, wurde es möglich vergleichende Einzelbasenpolymorphismen (SNP)-Analysen durchzuführen um festzustellen ob zwischen SNPs und Pathogenität eine Korrelation besteht. Um die auftretenden SNPs bei Klon A1 und Klon B2 zu identifizieren und miteinander zu vergleichen wurde zunächst wie in Abschnitt 2.15.1 beschrieben die DNA der beiden Klone isoliert und via Agarosegelelektrophorese ihre Reinheit und Integrität sichergestellt (hier nicht gezeigt). Die folgende Sequenzierung und bioinformatische Analyse wurde freundlicherweise von Prof. Neil Hall und Dr. Gareth Weedall (University of Liverpool) durchgeführt. Hierfür wurde die DNA der beiden Klone in 50 Bp große Fragmente zerteilt und 50fach sequenziert. Die so erhaltenen 50 Bp langen Sequenzen wurden dann an das Genom von Zelllinie A, welches als Referenz verwendet wurde, angelegt, in die richtige Reihenfolge gebracht und die auftretenden SNPs identifiziert. Es wurden 201 SNPs zwischen Klon A1 und Klon B2 gefunden (siehe Tab. 6.7 im Anhang). Davon 127 in kodierenden Bereichen und 74 in Introns oder – 200 Bp *upstream* vom kodierenden Bereich.

3.2.1 Validierung der identifizierten SNPs und Überprüfung der Korrelation zwischen SNPs und Pathogenität

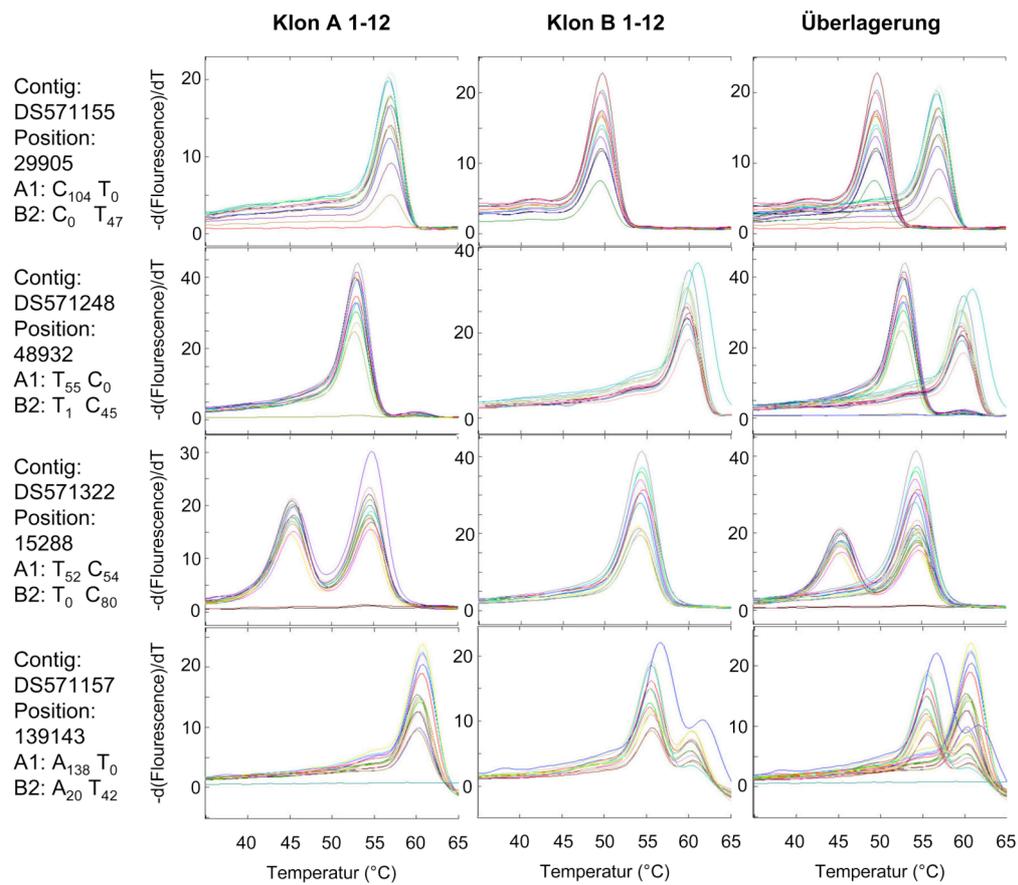
Für die Validierung der erhaltenen SNP-Daten und die anschließende Überprüfung einer Korrelation zwischen SNPs und Pathogenität mit Hilfe der Klone A1-A12 und B1-B12 wurden zunächst 14 SNPs ausgewählt, welche als relevant eingestuft wurden (siehe Tab. 3.2). Mit einbezogen wurden SNPs, welche entweder für beide Klone homozygot vorliegen, das heißt das z.B. Klon A1 ausschließlich ein Guanin an einer Stelle aufweist an der bei Klon B2 ausschließlich ein Adenin gefunden wurde, oder SNPs die für einen der Klone homozygot und den anderen heterozygot gefunden wurden. Außerdem muss er im kodierenden Bereich zu einem Aminosäureaustausch führen. Von den 14 ausgewählten SNPs liegen 10 in kodierenden und 4 in nicht-kodierenden Bereich.

Tab. 3.2: Als relevant eingestufte, bei Klon A1 und B2 gefundene SNPs. Angabe auf welchem Contig und an welcher Position im Genom von *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinie A (verwendet Genomanalyse 2005) sich der SNP befindet. Zusätzlich wird bei jedem SNP angegeben in welcher Häufigkeit er bei Klon A1 und Klon B2 sequenziert wurde. AA = Aminosäure

Contig	Position	Klon A1	Klon B2	AA-Tausch	Accession-Nr.	Genname
Kodierende Bereiche						
DS571155	29905	C ₁₀₄	T ₄₇	AA418C-Y	XM_649480.1	Hypothetisches Protein
DS571157	139143	A ₁₃₈	A ₂₀ T ₄₂	AA19M-L	XM_646600	EF-Hand-Calcium-bindende Domäne enthaltendes Protein
DS571189	71347	C ₇₄ , A ₆₅	C ₇₅	AA377S-I	XM_644808	Hypothetisches Protein
DS571248	48932	T ₅₅	T ₁ C ₄₅	AA209K-E	XM_647593	Putative Signalerkennende Teilchenrezeptoruntereinheit alpha
DS571281	4143	C ₁₁₀ T ₉₃	C ₁₈₉	AA254R-K	XM_649141	Hypothetisches Protein
DS571322	15288	C ₅₄ T ₅₂	C ₈₀	AA940S-P	XM_646946	Putative Proteinkinase
DS571413	9997	A ₈ C ₁₀	A ₁₄	AA61Q-H	XM_647062	HEAT wiederholendes Protein
DS571700	1539	C ₃₃ T ₁	C ₄₇ T ₆₉	AA323 G-R	XM_001914342	BspA-Familie Protein
DS571180	3263	C ₆ A ₁₄	C ₂₀	AA152T-N	XM_644810	Hypothetisches Protein
DS571730	4056	G ₁₄	G ₉ A ₁₀	AA143E-K	XM_001914354	BspA-Familie Protein

Nicht-kodierende Bereiche						
DS571292	23160	A ₅₃	G ₄₈			
DS571496	4410	A ₇ G ₅	A ₁₁			
DS571496	4411	A ₆ G ₅	A ₁₁			
DS571243	37782	A ₇ G ₂₀	A ₂₅ G ₁			

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Primer, Sonden und Anker für alle 14 Sets designed und im Anschluss wie in Abschnitt 2.17.5.2 beschrieben eine PCR-Optimierung durchgeführt. Mit den erhaltenen optimierten Bedingungen wurden die eigentlichen SNP-Analysen aller 24 Klone durchgeführt. Wie in Abb. 3.3 zu sehen konnte bei den SNPs aus den kodierenden Bereichen nur bei 7 von 10 Ausgewählten das zuvor erhaltene Ergebnis bestätigt werden. Hier stimmen die erhaltenen Schmelzkurven mit den Erwartungen überein. Bei drei der Untersuchten SNPs ist dies nicht der Fall. In zwei Fällen, bei Contig DS571413, Position 9997 und Contig DS 571180 Position 3263, wurde erwartet, dass Klon A1 heterozygot ist. Stattdessen ist er homozygot für das gleiche Nukleotid wie Klon B2. Bei Contig DS571730, Position 4056 wurde erwartet, das A1 homozygot für das Nukleotid G ist und Klon B2 homozygot für A und G. Stattdessen sind beide heterozygot.



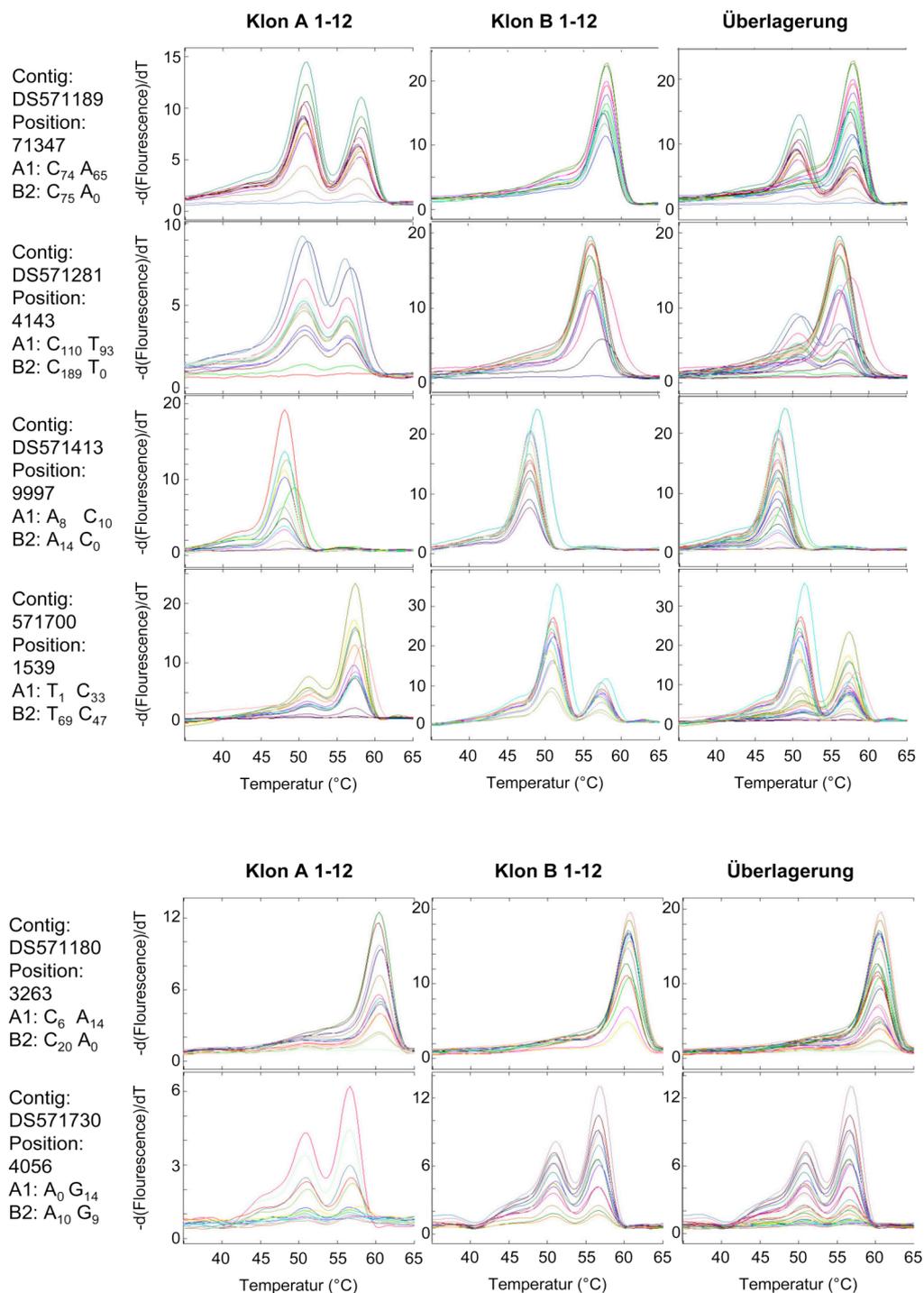


Abb. 3.3: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse zur Verifizierung und zum Nachweis der bei Klon A1 und B2 im kodierenden Bereich gefundenen relevanten SNP's. Als Matrize wurde die DNA von Klon A1-A12 und B1-B12 verwendet. In der Beschriftung links neben den Schmelzkurven findet sich die Information auf welchem Contig und an welcher Position im Genom von *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinie A (verwendet Genomanalyse 2005) sich der SNP befindet. Außerdem befindet sich dort die Angabe welcher SNP gefunden und in welcher Häufigkeit er bei Klon A1 und Klon B2 sequenziert wurde. In der linken Spalte der Schmelzkurven werden die Kurven der DNA von Klon A1-A12 gezeigt, in der mittleren Spalte die von Klon B1-B12 und in der rechten Spalte die Überlagerung der Schmelzkurven aller getesteten Klone.

In Abb. 3.4 sind die Schmelzkurvenanalysen der SNPs aus den nicht-kodierenden Bereichen zu sehen. Nur bei 2 von 4 Ausgewählten konnte das zuvor erhaltene Ergebnis bestätigt werden. Hier stimmen die erhaltenen Schmelzkurven mit den Erwartungen überein. Bei zwei der untersuchten SNPs ist dies nicht der Fall. In beiden Fällen bei Contig DS571496, Position 4410 und Contig DS 571496 Position 4411 wurde erwartet, dass Klon A1 heterozygot ist. Stattdessen ist er homozygot für das gleiche Nukleotid wie Klon B2.

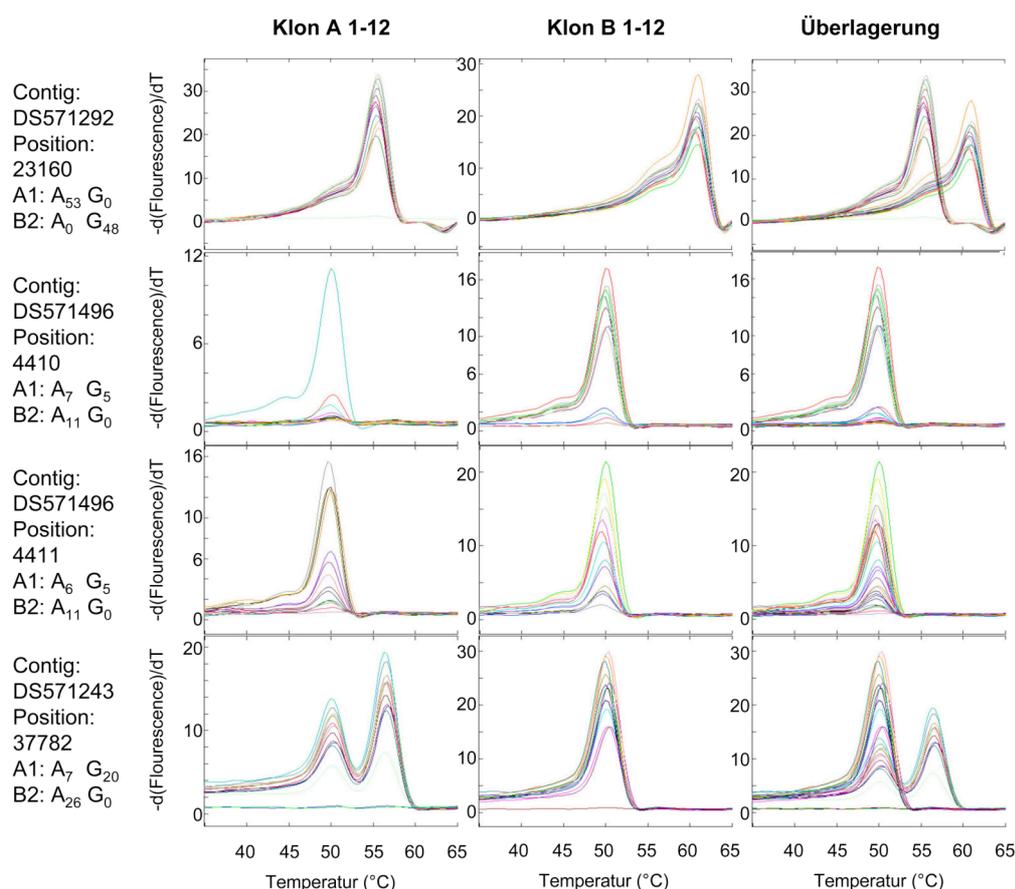


Abb. 3.4: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse zur Verifizierung und zum Nachweis der bei Klon A1 und B2 im nicht-kodierenden Bereich gefundenen signifikanten SNP's. Als Matrize wurde die DNA von Klon A1-A12 und B1-B12 verwendet. In der Beschriftung links von den Schmelzkurven findet sich die Information auf welchem Contig und an welcher Position im Genom von *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinie A (verwendet Genomanalyse 2005) sich der SNP befindet. Außerdem befindet sich dort die Angabe welcher SNP gefunden und in welcher Häufigkeit er bei Klon A1 und Klon B2 sequenziert wurde. In der linken Spalte der Schmelzkurven werden die Schmelzkurven der DNA von Klon A1-A12 gezeigt, in der mittleren Spalte die von Klon B1-B12 und in der rechten Spalte die Überlagerung aller getesteten Klone.

In den Abb. 3.3 und Abb. 3.4 ist deutlich zu sehen, dass sich alle Klone einer Zelllinie immer gleich verhalten. Das heißt, es wurde kein SNP untersucht, bei dem ein Klon der Zelllinie A einen SNP aufweist wie er sonst nur bei Klonen der Zelllinie B gefunden wird und umgekehrt. Somit konnte keine Korrelation zwischen den gefundenen SNPs und den Pathogenitäten der Klone festgestellt werden.

3.3 Analyse der Korrelation zwischen Cysteinpeptidasen und Pathogenität bei *E. histolytica*

Das Cysteinpeptidasen (EhCPs) bei der Pathogenität von *E. histolytica* eine Rolle spielen wurde bereits in mehreren Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen. Bewiesen wurde eine direkte Korrelation zwischen der Menge aktiver Cysteinpeptidasen und der Virulenz eines Isolats (Gadasi and Kessler 1983; Lushbaugh *et al.*, 1985; Keene *et al.*, 1990). Unter Kulturbedingungen sind die Gene der Cysteinpeptidasen *ehcp-a1*, *ehcp-a2*, *ehcp-a5* und *ehcp-a7* in *E. histolytica* am stärksten exprimiert und diese vier CPs sind auch für ca. 90 % der Gesamtpeptidaseaktivität verantwortlich (Bruchhaus *et al.*, 1996; Bruchhaus *et al.*, 2003; Tillack *et al.*, 2007; Irmer *et al.*, 2009). Die Auswahl der untersuchten Cysteinpeptidasen beruhte auf den Ergebnissen dieser Arbeit voraus gegangener oder parallel durchgeführter Studien. Die EhCP-A1, EhCPA2, EhCPA5 und EhCPA7 wurden verwendet, da sie wie oben beschrieben 90 % der Gesamtaktivität unter Kulturbedingungen ausmachen. Für die EhCP-A5 konnte bereits eine Beteiligung an der Pathogenität der Trophozoiten im Tiermodell gezeigt werden (Tillack *et al.*, 2006). Außerdem wurden bei der Analyse der Expression der Cysteinpeptidasegene der Zelllinie B in ALAs bei der Wüstenrennmaus eine erhöhte Expression der Gene *ehcp-a3*, *ehcp-a4*, *ehcp-a10*, *ehcp-b9* und *ehcp-c13* (Diplomarbeit Marien, 2009) gefunden. Für den Klon B2 konnte durch *Real-time* PCR-Analysen gezeigt werden, dass während der ALA-Bildung bei *Mus musculus* die Expression von *ehcp-a3*, *ehcp-a4*, *ehcp-a5*, *ehcp-a6*, *ehcp-a7* und *ehcp-a10* hochreguliert wird (Diplomarbeit Ann-Katrin Bär, 2011). Leider konnten die CPs EhCP-A3, EhCP-A10 und EhCP-B9 in dieser Arbeit nicht mehr mit untersucht werden. Die EhCP-B8 wurde in den Versuch mit eingeschlossen, da sie bei Messungen der Antikörperreaktion von Patienten auf CPs eine starke Reaktivität in Seren von asymptomatischen *E. histolytica* Trägern zeigt (Dissertation Tillack, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob nur die Menge aktiver Cysteinpeptidasen entscheidend für die Virulenz ist oder ob auch eine einzelne CP die Pathogenität verstärken kann. Außerdem wurde überprüft, ob tatsächlich eine direkte Korrelation zwischen CP-Aktivität und Amöbenleberabszess (ALA)-Größe besteht.

3.3.1 Transfektion von *E. histolytica* Klon A1 Trophozoiten mit ausgewählten Cysteinpeptidase-Überexpressionsvektoren

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Menge einer einzelnen Cysteinpeptidase zu einer stärkeren Pathogenität führt, wurden die Überexpressionskonstrukte pNC-CPA6, pNC-CPA7, pNC-CPB8 und pNC-CPC13 im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Konstrukte pNC, pNB-CPA1, pNB-CPA2, pNC-CPA4 und pNB-CPA5 (Tillack *et al.*, 2006; Dissertation Tillack, 2009) lagen bereits vor. Der Überexpressionsvektor besitzt eine Neomycin-Phosphotransferase kodierende Sequenz unter einem Aktin-Promotor, das einklonierte Zielgen steht unter dem eigenen Promotor.

Für die Plasmide pNC-CPA6, pNC-CPA7, pNC-CPB8 und pNC-CPC13 wurde der Expressionsvektor pNC verwendet, der auf dem Plasmid pEhNEO/CAT beruht (Hamann *et al.*, 1995) (siehe Abb. 3.5) Dieses Derivat besitzt ebenfalls eine Neomycin-Phosphotransferase kodierende Sequenz unter einem Aktin-Promotor. Das einklonierte Zielgen steht unter einem Lektinpromotor. Der Vektor pNC diente bei allen Versuchen als Kontrolle. Die Trophozoiten von Klon A1 wurden erfolgreich mit den beschriebenen Vektoren transfiziert und mit 20 µg/mL G418 selektioniert. Ziel dieses Versuches war es zu überprüfen, ob die Überexpression einzelner EhCPs im apathogenen Klon A1 zur Amöbenleberabszessbildung im Mausmodell und somit zu einer Steigerung der Pathogenität führt.

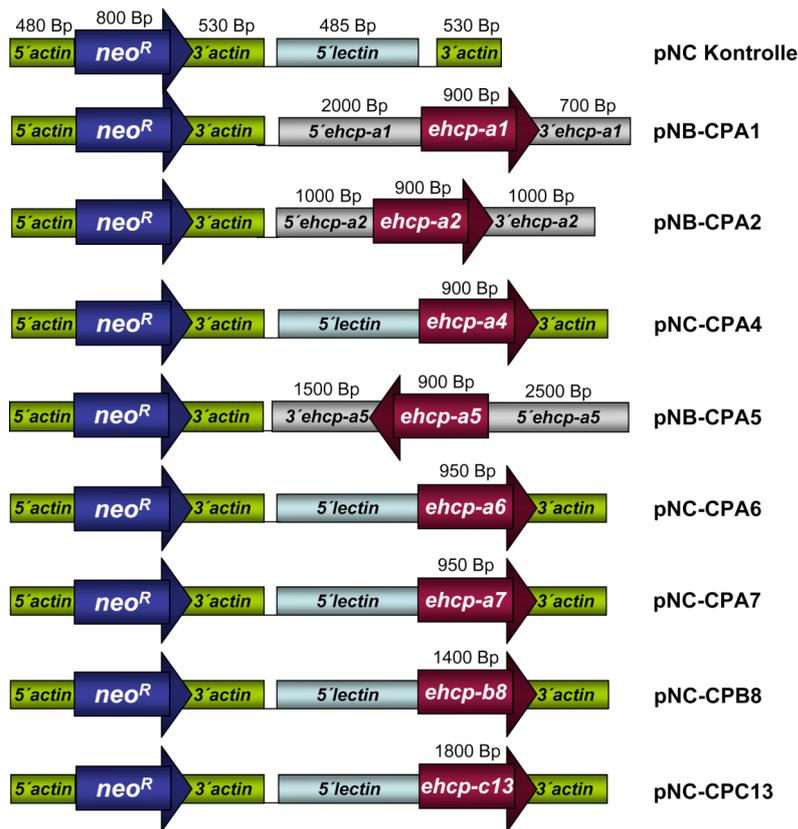


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Überexpressions-Vektoren pNC, pNB-CPA1, pNB-CPA2, pNC-CPA4, pNB-CPA5, pNC-CPA6, pNC-CPA7, pNC-CPB8 und pNC-CPC13 die für stabile episomale Transfektionen von *E. histolytica* HM-1:IMSS Klon A1 eingesetzt wurden. pNC diente als Kontrollvektor. Pfeile verweisen auf die Transkriptionsorientierung.

3.3.2 Überexpression ausgewählter Cysteinpeptidasen in Trophozoiten von Klon A1

Nach der Transfektion der einzelnen Überexpressionsvektoren in Trophozoiten von Klon A1 wurde zunächst wie in Abschnitt 2.13.2 beschrieben eine Klonierung der erhaltenen Transfektanten vorgenommen. Es wurde sichergestellt, dass wirklich nur aus Einzelzellen hochgewachsene Zellkulturen weiterverwendet wurden. Pro Transfektante wurden vier Klone unter Selektionsdruck kultiviert, bis sie einen stabilen *Monolayer* aufwiesen, um dann eine, wie in Abschnitt 2.19.2 beschriebene, *Real-time* PCR-Analyse durchzuführen. Als Referenzgen diente β -aktin und Klon A1 wurde als Kalibrator verwendet. Die Grenzwerte für eine differentielle Genexpression wurden auf ≥ 2 festgelegt. Es wurde für jede Transfektante ein Klon gefunden bei dem eine Überexpression des gewünschten Cysteinpeptidasegens vorlag. So konnte in den A1_pNB-CPA1-Transfektanten eine 2-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-a1* gegenüber Klon A1 und der Kontrolle A1_pNC nachgewiesen werden. Bei den A1_pNB-CPA2-Transfektanten konnte eine 5-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-a2*, bei den A1_pNC-CPA4-Transfektanten eine 385-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-a4*, bei den

A1_pNC-CPA6-Transfektanten eine 120-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-a6*, bei den A1_pNC-CPA7-Transfektanten eine 7-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-a7*, bei den A1_pNC-CPB8-Transfektanten eine 200-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-b8* und bei den A1_pNC-CPC13-Transfektanten ein 9-fach gesteigerte Transkription von *ehcp-c13* gegenüber Klon A1 und der Kontrolle A1_pNC nachgewiesen werden. Einen Sonderfall stellen die A1_pNB-CPA5-Transfektanten dar. Hier wurde nicht nur die Transkription des *ehcp-a5*-Gens um das 2,5-fache gesteigert sondern auch die Transkription der anderen CP-Gene war beeinflusst. Getestet wurden die ebenfalls in diesem Versuch verwendeten CPs. Es konnte bei den A1_pNB-CPA5-Transfektanten eine 3-fach gesteigerte Transkription des *ehcp-a1*-Gens beobachtet werden. Bei *ehcp-a2* war sie 5-fach erhöht, bei *ehcp-a4* 4-fach, bei *ehcp-a7* 3,5-fach und bei *ehcp-b8* 3-fach gegenüber Klon A1 und der Kontrolle A1_pNC. Die Transkriptionsmenge von *ehcp-c13* wurde nicht beeinflusst und die von *ehcp-a6* um das 2-fache erniedrigt gegenüber Klon A1 und der Kontrolle A1_pNC.

3.3.3 Überprüfen der Cysteinpeptidaseaktivität der Klon A1 Überexpressionstransfektanten

Aus den ausgewählten Transfektanten wurden wie in Abschnitt 2.20.3 beschrieben lösliche Proteinextrakte hergestellt. Diese wurden dazu verwendet um wie in Abschnitt 2.20.8 beschrieben die Cysteinpeptidase-Aktivität der einzelnen Transfektanten zu ermitteln (siehe Tab. 3.3) und mit ihnen Substrat-SDS-Gelelektrophoresen durchzuführen (siehe Abb. 3.6). Wie in Tab. 3.3 dargestellt ist bei der Cysteinpeptidase-Aktivität im Vergleich zu Klon A1 nur bei den Trophozoiten der A1_pNB-CPA2 und A1_pNB-CPA5 ein Anstieg zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle A1_pNC hingegen, welche eine sehr niedrige Cysteinpeptidase-Aktivität aufweist, zeigen alle bis auf die A1_pNC-CPB8-Transfektante eine erhöhte Aktivität.

Tab. 3.3: Cysteinpeptidase-Aktivität von Klon A1, der Kontrolle A1_pNC und den Transfektanten A1_pNB-CPA1, A1_pNB-CPA2, A1_pNC-CPA4, A1_pNB-CPA5, A1_pNC-CPA6, A1_pNC-CPA7, A1_pNC-CPB8 und A1_pNC-CPC13.

Transfektante	CP-Aktivität (mU/mg)
Klon A1 (untransfiziert)	15 ± 5
A1_pNC (Kontrolle)	0.5 ± 0.5
A1_pNB-CPA1	Nicht bestimmt
A1_pNB-CPA2	62 ± 5
A1_pNC-CPA4	9 ± 1
A1_pNB-CPA5	50 ± 15

A1_pNC-CPA6	1 ± 0.6
A1_pNC-CPA7	2.5 ± 1.6
A1_pNC-CPB8	$0.5 \pm 0,02$
A1_pNC-CPC13	Nicht bestimmt

Um einen genaueren Einblick zu erlangen, wie die ermittelte Cysteinpeptidase-Aktivität auf die einzelnen Cysteinpeptidasen in den Transfektanten verteilt ist, wurden wie in Abschnitt 2.20.6 beschrieben Substrat-SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt. Aufgetrennt wurden Extrakte der Transfektanten A1_pNC (Kontrolle), A1_pNB-CPA2, A1_pNC-CPA4, A1_pNB-CPA5, A1_pNC-CPA6, A1_pNC-CPA7, und A1_pNC-CPB8. Zusätzlich wurden zum Vergleich Extrakte der untransfizierten *E. histolytica* Klone A1 und B2 aufgetragen. Verwendet wurden 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele, in denen 0,1 % Gelatine (w/v) kopolymerisiert wurden. Je Spur wurden 4 μ g Extrakt aufgetragen. Wie in Abb. 3.6 gut zu erkennen ist spiegelt das kaum bis gar nicht sichtbare Bandenmuster bei den Transfektanten A1_pNC-CPA6 und A1_pNC-CPB8 und bei der Kontrolle A1_pNC die oben ermittelte extrem niedrige Cysteinpeptidase-Aktivität wieder. Bei der A1_pNB-CPA2 Transfektante ist die EhCP-A2 Bande deutlich verstärkt und bei der A1_pNB-CPA5 Transfektante kann für alle Cysteinpeptidasen eine gesteigerte Aktivität nachgewiesen werden. Besonders gut ist die gesteigerte Aktivität der EhCP-A4 bei der A1_pNC-CPA4 Transfektante und der EhCP-A7 bei der A1_pNC-CPA7 Transfektante zu erkennen.

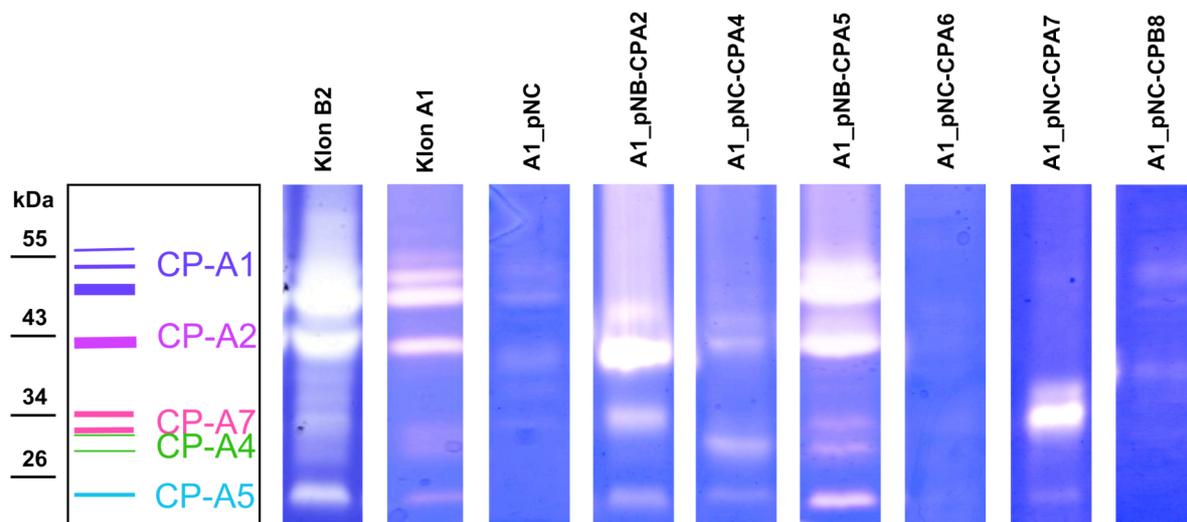


Abb. 3.6: Substratgelelektrophorese der Extrakte von *E. histolytica* Klon A1-Transfektanten A1_pNC (Kontrolle), A1_pNC-CPA2, A1_pNC-CPA4, A1_pNC-CPA5, A1_pNC-CPA6, A1_pNC-CPA7 und A1_pNC-CPB8 und zum Vergleich *E. histolytica* Klon A1 und Klon B2 untransfiziert. Dargestellt sind mit Coomassie gefärbte 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele, in denen 0,1 % Gelatine (w/v) kopolymerisiert wurden. Je Spur wurden 4 μ g Extrakt aufgetragen.

3.3.4 Einfluss von Cysteinpeptidasen auf die Amöbenleberabszess (ALA)-Bildung im Mausmodell

Um die Rolle der einzelnen in Klon A1 überexprimierten Cysteinpeptidasen bei der Pathogenität des Parasiten zu überprüfen, wurden $1,25 \times 10^5$ Amöben in die Mausleber injiziert und die Mäuse nach 7 Tagen wieder geöffnet um die Amöbenleberabszess-Bildung zu untersuchen. Alle im Rahmen dieser Arbeit angefallenen Tierversuche wurden freundlicher Weise von PD Dr. med. vet. Hannelore Lotter (BNI) durchgeführt. Nach dem Ausmessen der gebildeten ALAs wurden die ermittelten Größen in einen Abszess-Score eingeteilt, bei welchem die 0 bedeutet, dass kein Abszess oder nur eine Narbe gefunden wurde, die 1 steht für einen Abszess < 1 mm, die 2 für einen Abszess von 1-5 mm und die 3 für einen Abszess > 5 mm. Die Grenze für einen echten Abszess liegt bei 1. In Abb. 3.7 sieht man die graphische Darstellung der erhaltenen Werte. Hiernach hat ein vermehrtes Vorhandensein der EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A4, EhCP-A6, EhCP-A7 und EhCP-A13 keinen Einfluss auf die Pathogenität der Trophozoiten. Ein signifikantes Ergebnis wurde bei der EhCP-B8 erhalten. Ist nur sie in einer höheren Konzentration vorhanden weisen die Trophozoiten eine signifikant höhere Pathogenität auf im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist auch der Fall, wenn mehrere Cysteinpeptidasen hochreguliert sind, wie man bei den A1_pNB-CPA5 Transfektanten sehen kann. Die Pathogenität beider Transfektanten ist vergleichbar mit der des pathogenen Klons B2.

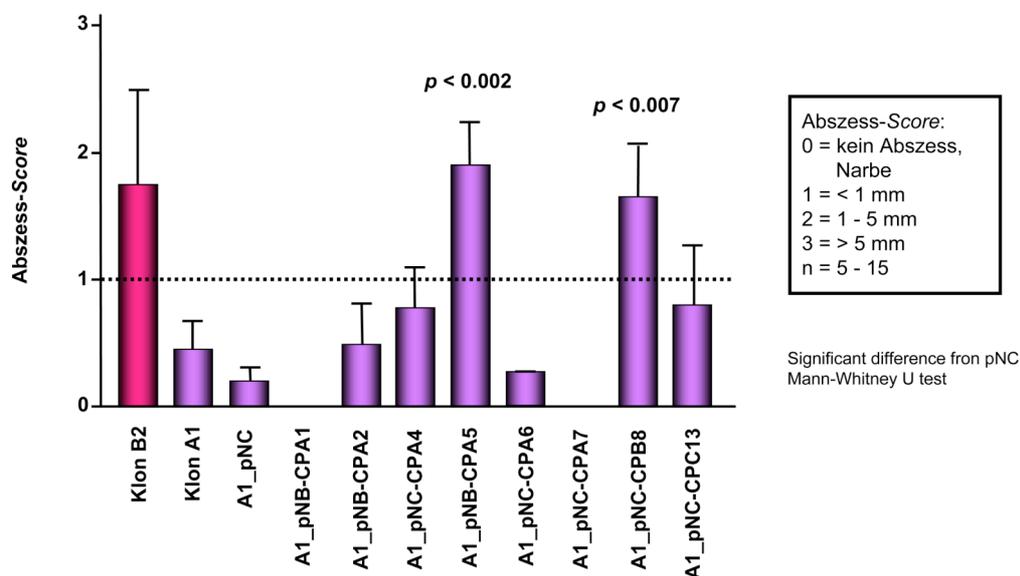


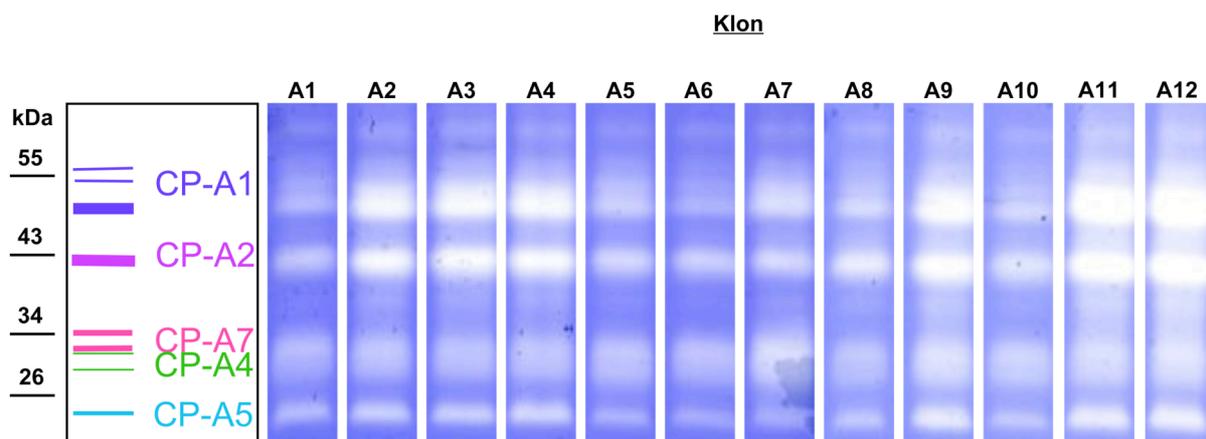
Abb. 3.7: Graphische Darstellung der Amöbenleberabszessbildung in *Mus musculus* durch in Klon A1 transfizierte Überexpressionskonstrukte. Transfiziert und im Mausmodell getestet wurden A1_pNB-CPA1 (6 Mäuse), A1_pNB-CPA2 (10 Mäuse), A1_pNC-CPA4 (10 Mäuse), A1_pNB-CPA5 (10 Mäuse), A1_pNC-CPA6 (10 Mäuse), A1_pNC-CPA7 (11 Mäuse), A1_pNC-CPB8 (10 Mäuse), A1_pNC-CPC13 (5 Mäuse), und die Kontrolle A1_pNC (15 Mäuse). Zum Vergleich wurden zusätzlich die untransfizierten Klone A1 (15 Mäuse) und B2 (5 Mäuse) auf ihre ALA-Bildung in *Mus musculus* untersucht. Zur Auswertung der Rohdaten wurde der folgende

Abszess-Score verwendet: 0 = kein Abszess, Narbe, 1 = Abszess < 1 mm, 2 = Abszess 1-5 mm, 3 = Abszess > 5 mm. Die Transfektanten pNC-CPB8 ($p < 0,007$) und pNC-CPA5A ($p < 0,002$) in Klon A1 weisen einen signifikanten Unterschied in ihrer Amöbenleberabszessgröße zur Kontrolle A1_pNC auf.

3.3.5 Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität der A- und B-Klone

Nachdem in Abschnitt 3.1.1 die Pathogenität der Klone A1-A12 und B1-B12 im Tierversuch ermittelt wurde, schien es interessant ihre Cysteinpeptidase-Aktivität zu ermitteln um festzustellen, ob hier tatsächlich eine Korrelation zwischen Aktivität und Pathogenität besteht.

Um die Bandenmuster und Intensitäten der einzelnen Klone beider Zelllinien miteinander zu vergleichen wurden wie in Abschnitt 2.20.6 beschrieben Substrat-SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt. Verwendet wurden 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele, in denen 0,1 % Gelatine (w/v) kopolymerisiert wurden. Je Spur wurden 4 μg Extrakt aufgetragen. Wie in Abb. 3.8 zu sehen ist, sind die Bandenmuster aller Klone beider Zelllinien fast identisch. Lediglich die Intensitäten unterscheiden sich sowohl unter den Klonen einer Zelllinie als auch zwischen den Zelllinien. Zunächst lässt sich sagen, dass die Intensitäten der Banden bei fast allen B-Klonen stärker sind als bei den A-Klonen. Ausnahmen hiervon sind die Klone A11 und A12, welche Bandenintensitäten wie B-Klone mittlerer Intensität aufweisen und die Klone B4, B5 und B8, bei denen ihre Banden eher wie bei den A-Klonen mittlerer Intensität ausgebildet sind. Besonders schwach ausgeprägte Banden zeigen sich bei den A-Klonen Klon A1 und Klon A6 und besonders stark ausgeprägte Banden zeigt der Klon B9 bei den B-Klonen. Die einzigen Banden, die im Vergleich zu den anderen Banden eine Variation in ihrer Intensität zeigen, sind die der EhCP-A7 und EhCP-A4.



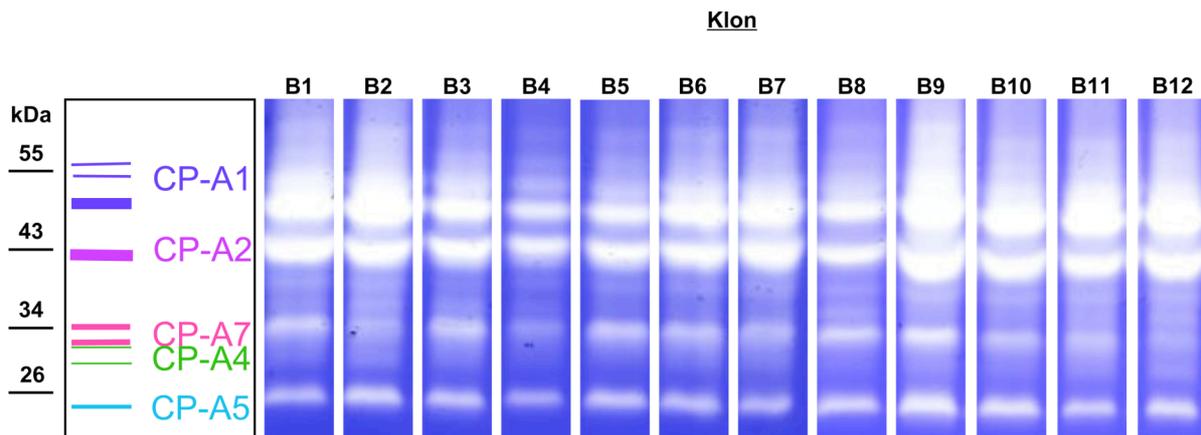


Abb. 3.8: Substratgelelektrophorese der Extrakte von *E. histolytica* Klon A1-A12 (oben) und Klon B1-B12 (unten). Dargestellt sind mit Coomassie gefärbte 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele, in denen 0,1 % Gelatine (w/v) kopolymerisiert wurden. Je Spur wurden 4 μ g Extrakt aufgetragen.

Zusätzlich wurden, wie in Abschnitt 2.20.8 beschrieben, die Cysteinpeptidase-Aktivitäten der einzelnen Klone bestimmt (siehe Abb. 3.9). Hierfür wurden pro Klon mindestens Werte für vier biologische Proben ermittelt. Es ist zu beobachten, dass alle A-Klone eine spezifische Cysteinpeptidase-Aktivität von unter 50 mU/mg aufweisen, während die Aktivität aller B-Klone, bis auf B4, B5 und B8, darüber liegt.

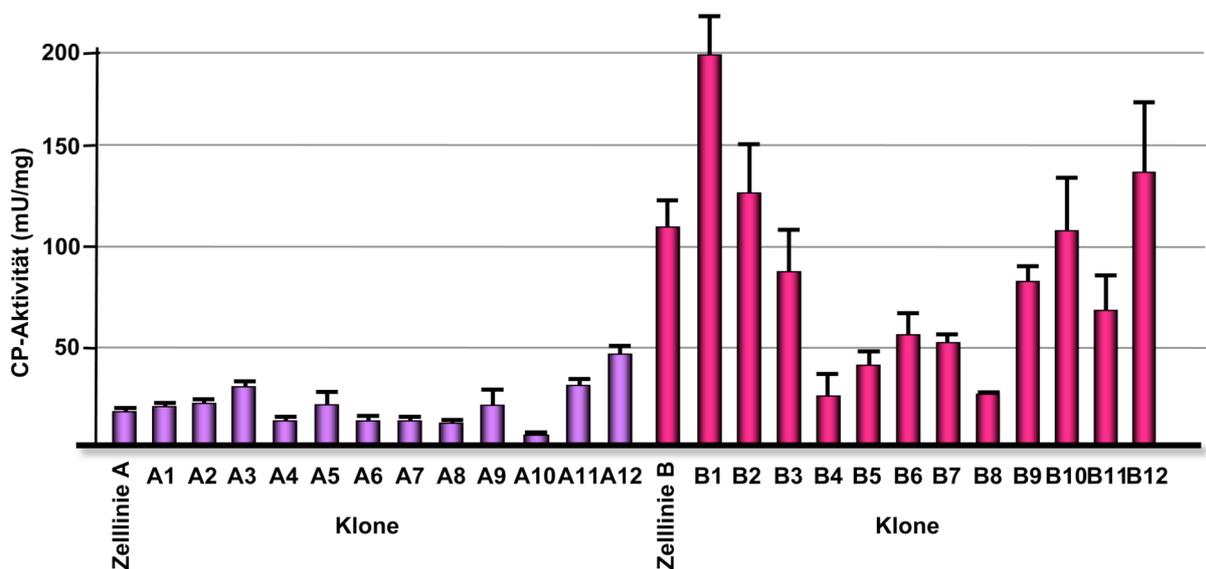


Abb. 3.9: Graphische Darstellung der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität der Zelllinie A und der aus ihr generierten Klone A1-A12 und der Zelllinie B und den aus ihr generierten Klonen B1-B12. Die Daten wurden aus Werten von mindestens vier biologischen Proben pro Zelllinie/Klon ermittelt. Die Einheit der Cysteinpeptidase-Aktivität wird in mU/mg angegeben.

Um eine Korrelation zwischen CP-Aktivität (Abb. 3.9) und Pathogenität (Abb. 3.1) herzustellen wurden beide Ergebnisse miteinander verglichen (Abb. 3.10).

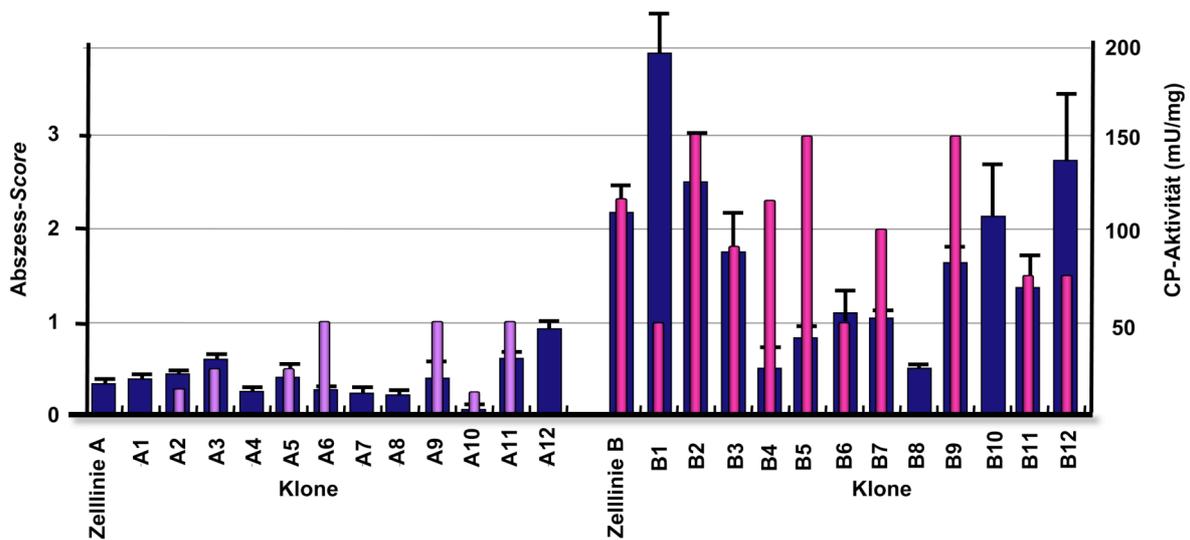


Abb. 3.10: Graphische Darstellung des Vergleichs der Amöbenleberabszessbildung in *Meriones unguiculatus* durch Trophoziten der *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinien A (lila) und B (pink) und der aus ihnen generierten Klone A1-A12 (lila) und B1-B12 (pink) und der den einzelnen Zelllinien und Klonen zugehörigen spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität (blaue Balken im Hintergrund). Zur Auswertung der Rohdaten der Amöbenleberabszessbildung wurde der folgende Abszess-Score verwendet: 0 = kein Abszess, 1 = Abszess < 1 mm, 2 = Abszess 1-5 mm, 3 = Abszess > 5 mm. Ermittelt wurden die Abszessgrößen 7 Tage nach Injektion in die Leber von *Meriones unguiculatus*. Die Cysteinpeptidasedaten wurden aus Werten von mindestens vier biologischen Proben pro Zelllinie/Klon ermittelt. Die Einheit der Cysteinpeptidase-Aktivität wird in mU/mg angegeben.

Hier wird deutlich, dass eine direkte Korrelation nicht möglich ist, da Klon A6 eine relativ geringe CP-Aktivität, dafür aber einen hohen Abszess-Score aufweist. Bei Klon A12 ist es genau anders herum. Die Amöben weisen eine relativ hohe CP-Aktivität auf, sind aber a-pathogen (Abszess-Score = 0). Bei Zelllinie B sind die Beispiele, die einer Korrelation widersprechen Klon B1, welcher eine sehr hohe Cysteinpeptidase-Aktivität besitzt aber kaum Abszessbildung verursacht, und Klon B4 bei dem es genau anders herum ist. Somit kann die Aussage, dass die Pathogenität mit einer hohen Cysteinpeptidase-Aktivität korreliert, nicht bestätigt werden.

3.4 Auswertung und Validierung des Membranoberflächenproteoms von *E. histolytica*

Um die Membranoberflächenproteome von Zelllinie A und Zelllinie B zu identifizieren und miteinander zu vergleichen wurden in vorangegangenen Studien (Laura Biller, Dissertation 2009 und unveröffentlicht) diese Proteine angereichert und für eine *Nano-Liquid Chromatographie* (Nano-LC) mit anschließender MS/MS-massenspektrometrischer Analyse vorbereitet. Hierbei wurden die Oberflächenproteine von vitalen Zellen mit Biotin markiert, lysiert und über das Biotin an eine Avidin-Säule gebunden. Die nach der Elution erhaltenen Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, die Spur einer Probe in gleichmäßige 1 mm breite Stücke, parallel zum Verlauf der molekularen Masse geschnitten, und anschließend tryptisch verdaut. Die so erhaltenen Proben wurden in der Nano-LC eingesetzt und später massenspektrometrisch analysiert. Die massenspektrometrisch analysierten Peptide wurden mit Hilfe der NCBI-Datenbank identifiziert und eine Liste aller Proteine angelegt. Untersucht wurden drei biologische Proben je Zelllinie. Da man bei der Verwendung dieser Techniken keine Aussage über die Quantität eines identifizierten Moleküls bei der jeweiligen Zelllinie treffen kann, wurde ein Molekül als differentiell definiert, wenn es bei mindestens zwei biologischen Proben bei einer der Zelllinien gefunden wurde und nie bei der anderen Zelllinie. Es wurden 765 Proteine identifiziert, von denen 140 differentiell bei Zelllinie A und 9 differentiell bei Zelllinie B vorkamen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 765 Proteine kategorisiert (Stressantwort, Cytoskelett, etc.), ihre Sequenzen ermittelt und durch bioinformatische Datenbanken (SignalP, SUPLPredictor, SecretomeP, TMHMM und Predotar) weiter charakterisiert (siehe Abb. 3.11, Abb. 3.12 und Abb. 3.13 und Tab. 6.8 im Anhang). Von den 765 Proteinen verfügen 55 über Transmembrandomänen und teilweise zusätzlich über Signalanker oder Signalpeptide, wodurch sie wahrscheinlich an einer Zellmembran lokalisiert sind. Insgesamt 18 Proteine weisen Signalanker auf. Bei 70 der Proteine treten Signalpeptide auf, welche für den Export verantwortlich sind und die Proteine so zur Zellmembran oder in die Organellen gelangen könnten. 241 Proteine werden als nicht klassisch sezerniert eingestuft, was bedeutet, dass sie ER/Golgi unabhängig aus der Zelle exportiert werden. Für 14 der Proteine wird eine Myristoylierung vorhergesagt, was auch auf eine Interaktion mit der Zellmembran schließen lässt. Es wurden 28 Proteine als in der Plasmamembran lokalisiert vorausgesagt. 4 Proteine weisen auf eine Lokalisation in der Zellkernmembran hin, 7 auf eine Lokalisation in der ER-Membran, 2 auf eine Lokalisation in der Vesikelmembran, 5 auf eine Lokalisation in der Endosommembran und 2 auf eine Lokalisation in der Membran

des Golgi Apparates, welcher bei *E. histolytica* noch nicht dargestellt ist. 32 Proteine wurden als Mitochondrienproteine eingeordnet, was bei *E. histolytica* nur im Mitosom möglich ist, da sie keine Mitochondrien besitzen. 39 Proteine wurden mit dem Cytoplasma assoziiert.

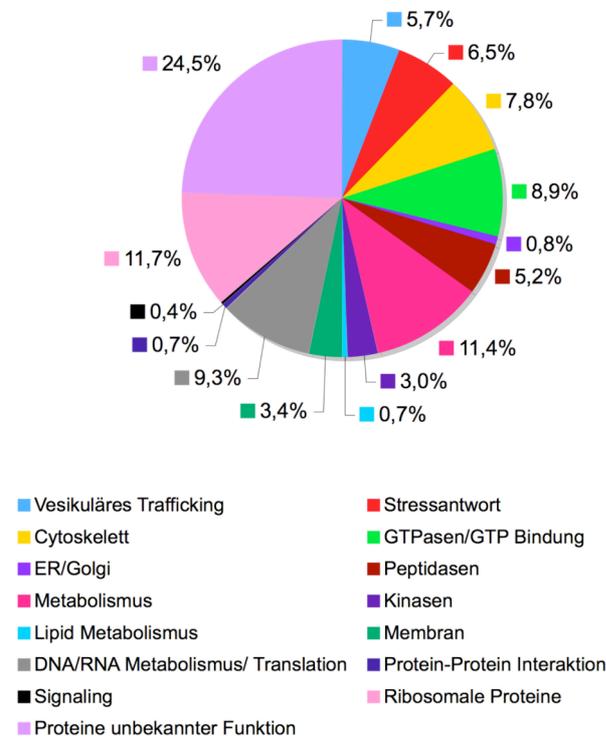


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der prozentualen Häufigkeitsverteilung der 765 identifizierten putativen Membranoberflächen-Proteine auf die Kategorien: Vesikuläres Trafficking (5,7 %), Stressantwort (6,5 %), Cytoskelett (7,8%), GTPasen/GTP Bindung (8,9 %), ER/Golgi (0,8 %), Peptidasen (5,2 %), Metabolismus (11,4 %), Kinasen (3 %), Lipid Metabolismus (0,7 %), Membran (3,4 %), DNA/RNA Metabolismus/Translation (9,3 %), Protein-Protein Interaktion (0,7 %), *Signaling* (0,4 %), Ribosomale Proteine (11,7 %) und Proteine unbekannter Funktion (24,5 %). Die Farbuordnung ist der Legende unter dem Kreisdiagramm zu entnehmen. ER = Endoplasmatisches Retikulum

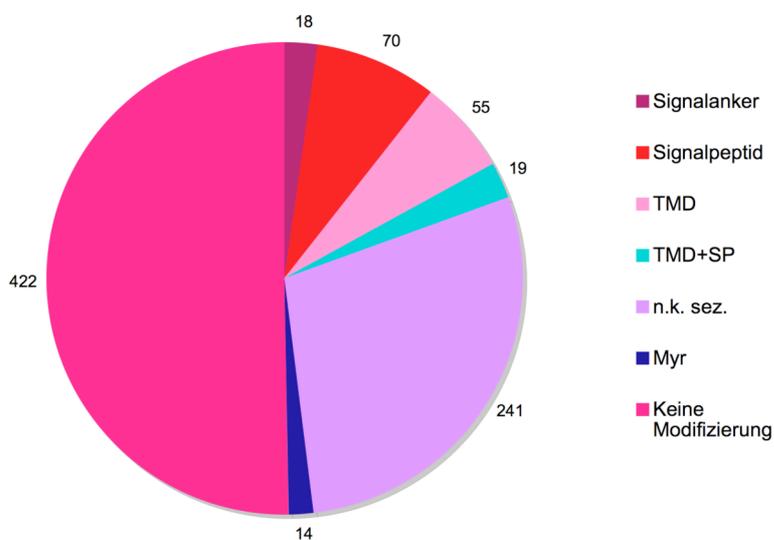


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Voraussagen für Signalanker (18), Signalpeptide (70), TMD (55), TMD+SP (19), n.k. sez. (241) und Myr (14) bei den 765 gefundenen putativen Membranoberflächen-Proteinen. Für 422 Proteine wurde keine dieser Modifizierungen vorausgesagt. Die Farbzurordnung ist der Legende neben dem Kreisdiagramm zu entnehmen. TMD = Transmembrandomäne, SP = Signalpeptid, n.k. sez. = nicht klassisch sezerniert, Myr = Myristoylierung.

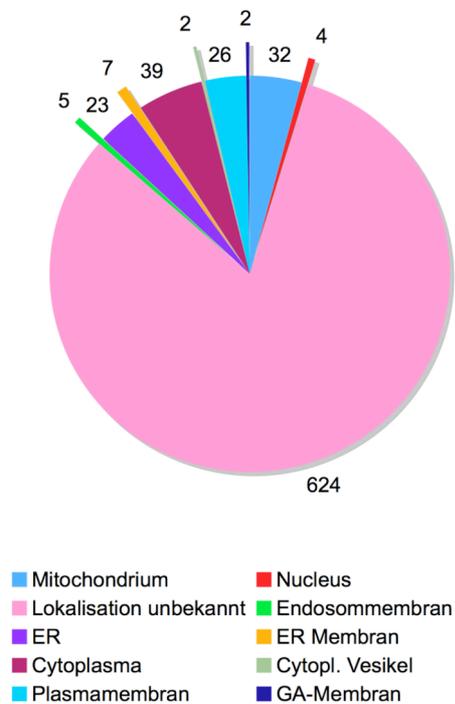


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Lokalisationsvoraussagen für die 765 gefundenen Membranoberflächen-Proteine. Nucleus (4), Mitochondrium (32), GA-Membran (2), Plasmamembran (26), Cytopl. Vesikel (2), Cytoplasma (39), ER Membran (7), ER (23), Endosommembran (5). Für 624 wurde keine Lokalisation vorausgesagt. Die Farbzurordnung ist der Legende unter dem Kreisdiagramm zu entnehmen. GA = Golgi-Apparat, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Cytopl. = Cytoplasmatisches.

3.4.1 Validierung der Membranproteom-Daten auf Transkriptom-Ebene via *real-time* PCR

Mit Hilfe von *Real-time* PCR-Experimenten sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Proteine, die in der Zellmembranoberflächen-Analyse zwischen Zelllinie A und Zelllinie B als differentiell identifiziert wurden, sich auch auf der Transkriptom-Ebene als differentiell erweisen. Oligonukleotide für 14 Gene putativ differentieller Proteine in Zelllinie A und aller 9 Gene der putativ differentiellen Proteine in Zelllinie B lagen bereits vor. Als Proben wurde die mRNAs in Form von cDNA von Klon A1 und Klon B2 untersucht (beschrieben in Abschnitt 2.19). Als Referenzgen diente β -aktin und Klon A1 wurde als Kalibrator verwendet. Die *Real-time* PCR-Analyse wurde wie in Abschnitt 2.19.2 beschrieben durchgeführt. Die Grenzwerte für eine differentielle Genexpression wurden auf $\geq 2,5$ und $\leq 0,5$

0,5 festgelegt. Die Experimente wurden mit 2 biologischen Proben durchgeführt. Bei keinem der 23 untersuchten Gene konnten eine differentielle Transkription nachgewiesen werden, somit konnten die auf Proteom-Ebene erhaltenen Ergebnisse auf Transkriptom-Ebene für diese Gene nicht bestätigt werden.

3.4.2 Herstellung von Überexpressionskonstrukten mit cMyc als Markierungssystem

Um nachzuweisen, dass es sich bei den identifizierten Proteinen tatsächlich um Membranoberflächen- oder zumindest mit der Membran assoziierte Proteine handelt, sollte deren Lokalisation bestimmt werden. Hierfür wurden diverse Überexpressionskonstrukte mit cMyc als Markierungssystem hergestellt. Die zu klonierenden Zielgene wurden aus bei der Analyse des Membranoberflächen-Proteoms (siehe Tab. 6.8) gefundenen Proteinen abgeleitet. Eine Übersicht der erfolgreich untersuchten Proteine/Gene findet sich in Tab. 3.4

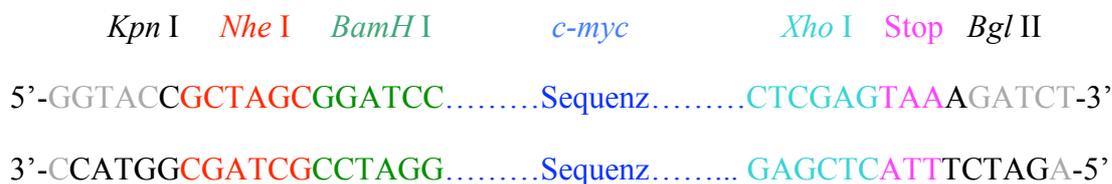
Tab. 3.4: Zusammenfassung der für die Lokalisation über das cMyc-Markierungssystem verwendeten putativen Membranoberflächen-Proteine.

Accession-Nr.	Name	kDa Protein	Konstrukt Name
Vesikel Trafficking, Vesikel Formation			
XM_651158	<i>Clathrin adaptor complex small chain</i>	18	pNCEhClathrin-ac-cMyc
XM_650063	<i>COP9 signalosome complex subunit 1</i>	45	pNCEhCOP9-sigcom-cMyc
Stressantwort			
XM_651634	Thioredoxin1	12	pNCEhTred1-cMyc
GTPasen, GTP Bindung			
XM_649396	Rho Familie GTPase	28	pNCEhRho-GTPase-cMyc
Peptidasen			
XM_650258	<i>Proteasom alpha Subunit</i>	26	pNCEh proteasome-alphasub-cMyc
Metabolismus			
XM_643978	<i>alcoholdehydrogenase</i>	42	pNCEhAlcdehyd-cMyc
XM_645763	<i>malatdehydrogenase</i>	39	pNCmaldehyd-cMyc
XM_645280	Grainin1	24	pNCEhGrainin1-cMyc
Membran			
XM_649277	<i>V-type ATPase</i>	15	pNCEhV-type_ATPase-cMyc

Der im Folgenden verwendete Überexpressionsvektor basiert auf pNC (siehe Abb. 3.14) (Hamann *et al.*, 1995). Für *c-myc* wurde aufgrund seiner geringen Größe von 51 Bp Oligonukleotide entworfen, welche über die gesamte Länge der entsprechenden Gensequenz inklu-

sive diverser Restriktionsschnittstellen gingen. Nach der Hybridisierung wurde das erhaltene Fragment direkt in den mit *KpnI* und *BamHI* verdauten pNC-Vektor kloniert.

So hat man sich die resultierenden Fragmente vorzustellen:



Die *BglII*-Restriktionsschnittstelle an einem Ende der hybridisierten Oligonukleotide fügt sich in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pNC und inaktiviert diese dauerhaft. Die Inaktivierung ermöglicht, dass die Zielgene ebenfalls über *KpnI* und *BamHI* vor das *cmyc* Gen kloniert werden können (Diplomarbeit Matthiesen, 2009).

Der Vorteil solcher Peptide wie c-Myc, die zur Markierung mit dem Zielprotein fusioniert werden, ist die Spezifität und die universelle Einsetzbarkeit. c-Myc basiert auf der Interaktion eines Epitops des c-Myc-Peptids mit dem Immunglobulin 9E10 und besitzt die Sequenz EQKLISEEDL. Das Peptid ist ein Epitop des humanen *c-myc*-Genprodukts.

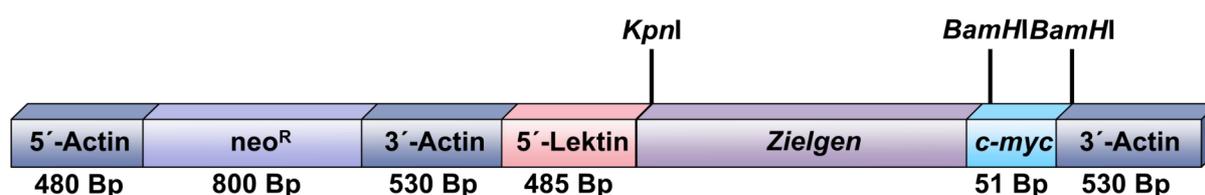


Abb. 3.14: Schematische Darstellung eines Teilbereichs des pNC-Vektors mit integriertem Protein-Markierungssystem- und Zielgenabschnitt. Der pNC-Vektor wurde für die Überexpression einzelner Gene inklusive dahinter platziertem Protein-Markierungssystem verwendet. Die Gensequenz für das *c-myc*-Markierungssystem und die Zielgensequenzen vor *c-myc* wurden über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* eingefügt. neo^{R} = neomycin-phosphotransferasegen.

Von den ausgewählten Proteinen wurden zunächst die Gensequenzen ermittelt, Oligonukleotide entworfen und die Zielsequenzen wie in Abschnitt 2.18.1 beschrieben via PCR amplifi-

ziert. Diese wurden über die Schnittstellen *KpnI* und *BamHI* in den pNCcMyc-Vektor kloniert. Dies gelang bei 12 der 32 ausgewählten Sequenzen. Die Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2 wurden erfolgreich mit den Konstrukten pNCEhGrainin1-cMyc, pNCEhTred1-cMyc, pNCEhAlcdehyd-cMyc, pNCEhClathrin-ac-cMyc, pNCEhCOP9-sigcom-cMyc, pNCEhRho-GTPase-cMyc, pNCEhproteasome-alphasub-cMyc, pNCEhmaldehyd-cMyc, pNCEhV-type_ATPase-cMyc, pNCEhDnaJ-cMyc, pNCSR54-cMyc, pNC40SribS19-cMyc und zur späteren Kontrolle zusätzlich mit dem leeren pNC-Vektor wie in Abschnitt 2.13.4 beschrieben transfiziert. Der Selektionsdruck mit G418 wurde bis auf 25 µg/mL erhöht, bevor Amöbenextrakte (siehe Abschnitt 2.20.3.) für Western-Blot-Analysen (siehe Abschnitt 2.20.7) hergestellt und Immunfluoreszenz-Analysen (siehe Abschnitt 2.22) durchgeführt wurden.

3.4.3 Detektion der cMyc-Fusionsproteine mittels Westernblot-Analysen

Um zu überprüfen, ob die generierten Transfektanten die zu untersuchenden Proteine fusioniert an eine c-Myc-Domäne synthetisieren und wo diese Proteine lokalisiert sind, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Aus den Transfektanten wurden hierfür Extrakte präpariert, welche entweder die löslichen Proteine (LP) oder die NaPBS-unlöslichen Proteine (UP) und somit die Membranfraktion enthielten (hergestellt wie in Abschnitt 2.20.3. beschrieben). Die Amöbenextrakte wurden aus den mit c-Myc-Überexpressionskonstrukten transfizierten Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2 hergestellt. Die Proben wurden auf 12 %ige SDS-Gele aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Als primärer Antikörper wurde α -cMyc (Verdünnung 1:2500) verwendet. Als sekundärer Antikörper diente *anti-mouse*-HRP-Antikörper.

Bei Klon A1 wurden bei 7 aus 12 getesteten Transfektanten positive Signale in der Westernblot-Analyse erhalten (siehe Abb. 3.15). Die spezifische Bande der zu erwartenden Größe ist mit einem Pfeil gekennzeichnet und eine häufig in der Triton-X-100-Fraktion (UP) auftretende unspezifische Bande mit einem Stern. Bei der A1_pNCEhGrainin1-cMyc-Transfektante wurde wie erwartet ein Signal bei 24 kDa beobachtet, wobei die Triton-X-100-Fraktion (UP) nur ein sehr schwaches Signal im Gegensatz zur NaPBS-Fraktion (LP) aufweist. Die A1_pNCEhTred1-cMyc-Transfektante weist eine spezifische Bande wie erwartet bei 12 kDa auf. Ob diese Bande nur in der NaPBS-Fraktion oder auch in der Triton-X-100-Fraktion vorhanden ist, lässt sich nicht sagen, da diese durch die unspezifische Bande verdeckt wird. Die A1_pNCEhAlcdehyd-cMyc-Transfektante zeigt ausschließlich in der Triton-

X-100-Fraktion ein spezifisches Signal bei der erwarteten Größe von 42 kDa. Die A1_pNCEhClathrin-ac-cMyc-Transfektante zeigt in der Triton-X-100-Fraktion ein klares Signal auf der erwarteten Höhe von 18 kDa und noch zusätzlich in beiden Proteinfractionen Banden bei ca. 180 kDa, was auf die Beteiligung des Proteins in einem Komplex oder Polymer schließen lässt. Bei den Transfektanten pNCEhCOP9-sigcom-cMyc (45 kDa), A1_pNCEhRho-GTPase-cMyc (28 kDa) und A1_pNCEhproteasome-alphasub-cMyc (26 kDa) sind Signale bei den erwarteten Größen in beiden Proteinfractionen zu beobachten. In den Westernblot-Analysen der restlichen Transfektanten A1_pNCEhmaldehyd-cMyc, A1_pNCEhV-type_ATPase-cMyc, A1_pNCEhDnaJ-cMyc, A1_pNCSR54-cMyc und A1_pNC40SribS19-cMyc wurden keine cMyc-Fusionsproteine detektiert (hier nicht abgebildet).

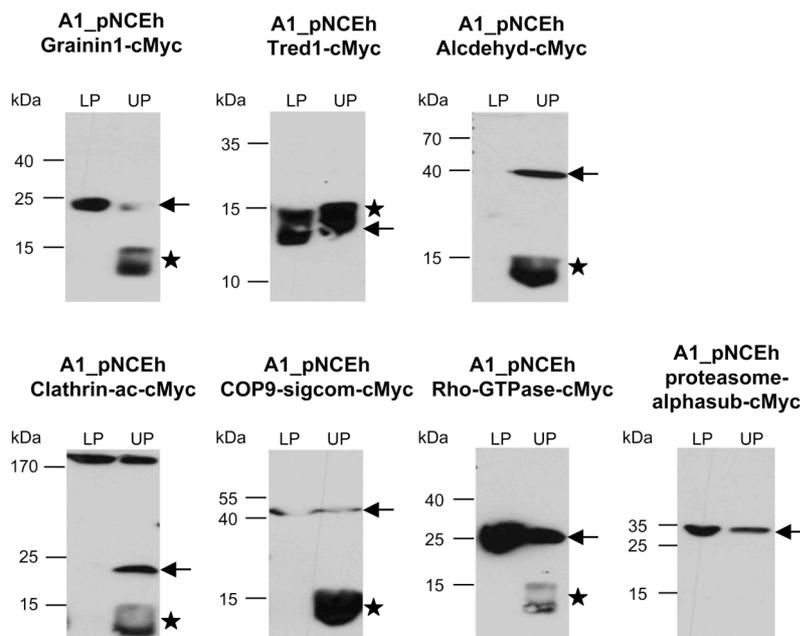


Abb. 3.15: Western-Blot-Analyse der Amöbenextrakte aus A1_pNCCcMyc-Transfektanten A1_pNCEhGrainin1-cMyc, A1_pNCEhTred1-cMyc, A1_pNCEhAldehyd-cMyc, A1_pNCEhClathrin-ac-cMyc, A1_pNCEhCOP9-sigcom-cMyc, A1_pNCEhRho-GTPase-cMyc und A1_pNCEhproteasome-alphasub-cMyc in Klon A1. Es wurden je 10 μ L der NaPBS-löslichen (LP) bzw. Triton X 100-löslichen (UP) Fraktionen auf 12%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen, elektrophoretisch getrennt, per Nassblot-Technik auf Nitrocellulosemembranen transferiert und anschließend mit monoklonalem α -cMyc als primärem Antikörper (Verdünnung 1:2500) und α -mouse-HRP-Ak als sekundärem Antikörper (Verdünnung 1:10000) inkubiert. Die erhaltenen Banden liegen größtenteils im Bereich der Erwartungen. Errechnete Molekulargewichte: EhGrainin1-cMyc ca. 24 kDa, EhTred1-cMyc ca. 12 kDa, EhAldehyd-cMyc ca. 42 kDa, EhClathrin-ac-cMyc ca. 18 kDa, EhCOP9-sigcom-cMyc ca. 45 kDa, EhRho-GTPase-cMyc ca. 28 kDa und Ehproteasome-alphasub-cMyc ca. 26 kDa.



Kennzeichnet die erwartete Bande



kennzeichnet eine unspezifische Bande die bei Klon A1 auftritt

Bei Klon B2 wurden bei 6 aus 12 getesteten Transfektanten positive Signale in der Westernblot-Analyse erhalten (siehe Abb. 3.16). Im Fall der B2_pNCEhGrainin1-cMyc-Transfektante wurde wie erwartet ein Signal bei 24 kDa beobachtet, wobei die NaPBS-Fraktion (LP) nur ein sehr schwaches Signal im Gegensatz zur Triton-X-100-Fraktion (UP) aufweist. Dies ist genau anders herum als die Signale bei der A1_pNCEhGrainin1-cMyc-Transfektante von Klon A1 (Abb. 3.15). Die B2_pNCEhTred1-cMyc-Transfektante weist eine spezifische Bande wie erwartet bei 12 kDa auf, welche sich auf die NaPBS-Fraktion (LP) beschränkt. Die B2_pNCEhAldehyd-cMyc-Transfektante zeigt in beiden Proteinfractionen ein spezifisches Signal bei der erwarteten Größe von 42 kDa. In der NaPBS-Fraktion, in welcher man bei der A1_pNCEhAldehyd-cMyc-Transfektante von Klon A1 gar kein Signal beobachten konnte, sind zusätzlich noch zwei Banden bei 25 kDa und 22 kDa vorhanden, bei denen es sich um Abbauprodukte handeln könnte. Bei der Klon B2 Transfektante B2_pNCEhCOP9-sigcom-cMyc ist in beiden Proteinfractionen eine Bande bei der erwarteten Größe von 45 kDa zu sehen, was mit dem Ergebnis der A1_pNCEhCOP9-sigcom-cMyc Transfektante von Klon A1 übereinstimmt (siehe Abb. 3.15). Im Fall der B2_pNCEhmaldehyd-cMyc Transfektante sind Signale bei der erwarteten Größe von 39 kDa in beiden Proteinfractionen zu beobachten. Bei der B2_pNCEhV-type_ATPase-cMyc Transfektante wurde ausschließlich in der Triton-X-100-Fraktion (UP) ein Signal bei ca. 30 kDa beobachtet, erwartet wurde es bei 15 kDa. Hierbei kann es sich um ein Dimer oder einen Proteinkomplex handeln. In den Westernblot-Analysen der restlichen Transfektanten B2_pNCEhClathrin-ac-cMyc, B2_pNCEhRho-GTPase-cMyc, B2_pNCEhproteasome-alpha-sub-cMyc, B2_pNCEhDnaJ-cMyc, B2_pNCSR54-cMyc und B2_pNC40SribS19-cMyc in Klon B2 wurden keine spezifischen Signale detektiert (hier nicht abgebildet).

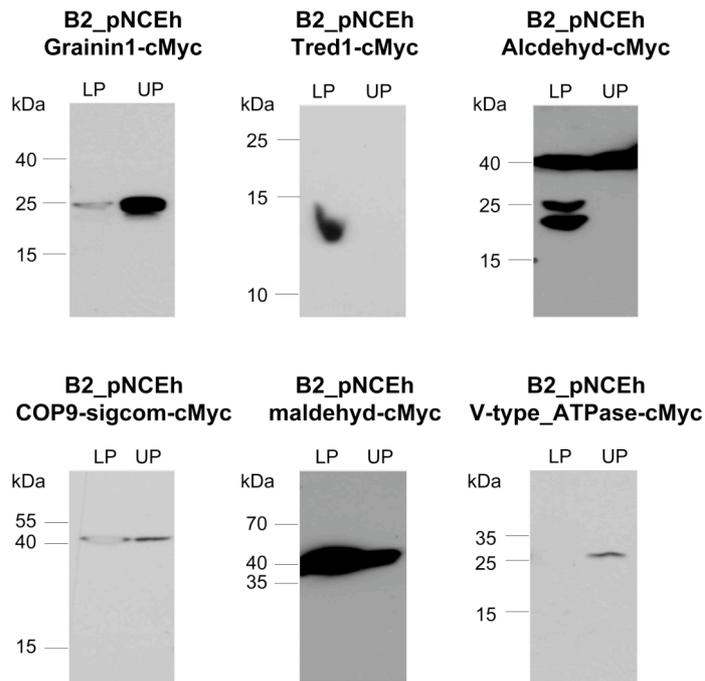


Abb. 3.16: Western-Blot-Analyse der Amöbenextrakte aus B2_pNCEh-Transfektanten B2_pNCEhGrainin1-cMyc, B2_pNCEhTred1-cMyc, B2_pNCEhAlcdehyd-cMyc, B2_pNCEhCOP9-sigcom-cMyc, B2_pNCEhmaldehyd-cMyc, B2_pNCEhV-type_ATPase-cMyc in Klon B2. Es wurden je 10 μ L der NaPBS-löslichen (LP) bzw. Triton X 100-löslichen (UP) Amöbenextraktfraktionen auf 12%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen, elektrophoretisch getrennt, per Nassblot-Technik auf Nitrocellulosemembranen transferiert und anschließend mit monoklonalem α -cMyc als primärem Antikörper (Verdünnung 1:2500) und α -mouse-HRP-Ak als sekundärem Antikörper (Verdünnung 1:10000) inkubiert. Die erhaltenen Banden liegen größtenteils im Bereich der Erwartungen. Errechnete Molekulargewichte: EhGrainin1-cMyc ca. 24 kDa, EhTred1-cMyc ca. 12 kDa, EhAlcdehyd-cMyc ca. 42 kDa, EhCOP9-sigcom-cMyc ca. 45 kDa, Ehmaldehyd-cMyc ca. 39 kDa und EhV-type_ATPase-cMyc ca. 15 kDa (Dimer)

3.4.4 Lokalisierung ausgewählter potentieller Membranoberflächenproteine mittel c-Myc-Markierung in der IFA

Die Transfektanten, bei denen die entsprechenden cMyc-Fusionsproteine im Westernblot nachgewiesen wurden, wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen charakterisiert, um die genaue Lokalisation der einzelnen putativen Membranoberflächen-Proteine in *E. histolytica* Trophozoiten zu ermitteln. Die Fixierung, Permeabilisierung mit Saponin und Antikörperinkubation fanden wie in Abschnitt 2.22. beschrieben statt. Als primärer Antikörper diente α -c-Myc und als sekundärer Antikörper ein α -mouse-Antikörper assoziiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA Fluor[®] 488. Die Zellen wurden in einer 10000fachen Vergrößerung untersucht. Für die Dekonvolutions-Mikroskopie wurden ausgewählte Zellen mit einer 100x Ölimmersionslinse angeschaut und mit Hilfe eines Leica DM RB-Mikroskops in 0.3 μ m Schritten optische Schnitte durch die Zelle gelegt. Die dekonvolvierten Schnitte wurden aus-

gewertet und mit dem *Openlab*-Programm 4.0.2 ausgewertet und bearbeitet. Diese Bilder ermöglichen eine genauere Lokalisierung der Fusionsproteine in der Zelle.

In Abb. 3.17 ist die Lokalisierung des EhGrainin1-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhGrainin1-cMyc transfizierten Klon A1 und Klon B2 Trophozoiten zu sehen. Im Fall der mit Saponin permeabilisierten Zellen wurden sowohl bei Klon A1 als auch bei Klon B2 Signale erhalten. Bei beiden ist eine cytosolische Färbung zu erkennen. Außerdem sieht man eine klare ringförmige Färbung um einzelne vesikuläre Strukturen und bei den Klon B2 Transfektanten noch zusätzlich um den Zellkern. Im Fall der nicht permeabilisierten Zellen treten nur bei den Klon A1 Transfektanten Signale auf. Diese sind konzentriert an mehreren Stellen der Zellmembran. Die detektierten Stellen zeigen unterschiedliche Größen und Fluoreszenzintensitäten. Das bei Klon A1 Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten wurden, war nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15) zu erwarten, auch wenn das erhaltene Signal in der NaPBS-Fraktion (LP) nur sehr schwach ausgeprägt war. Somit sind die erkannten Grainin-cMyc-Fusionsproteine bei den Klon A1 Transfektanten sowohl membran-assoziiert als auch cytoplasmatisch zu finden. Im Fall der Klon B2 Transfektanten konnte eine Fluoreszenz nur bei permeabilisierten Zellen beobachtet werden. Dies widerspricht auf den ersten Blick der Westernblot-Analyse (Abb. 3.16) in welcher in der Membranfraktion (UP) ein starkes Signal zu sehen ist. Da aber nicht bekannt ist, wie und in welcher Membran das potentielle Membranoberflächenprotein EhGrainin1 bei Klon B2 verankert ist, ist es möglich, dass der cMyc-Teil des Proteins im Inneren der Zelle lokalisiert ist oder EhGrainin1 an einer Organellmembran assoziiert vorliegt.

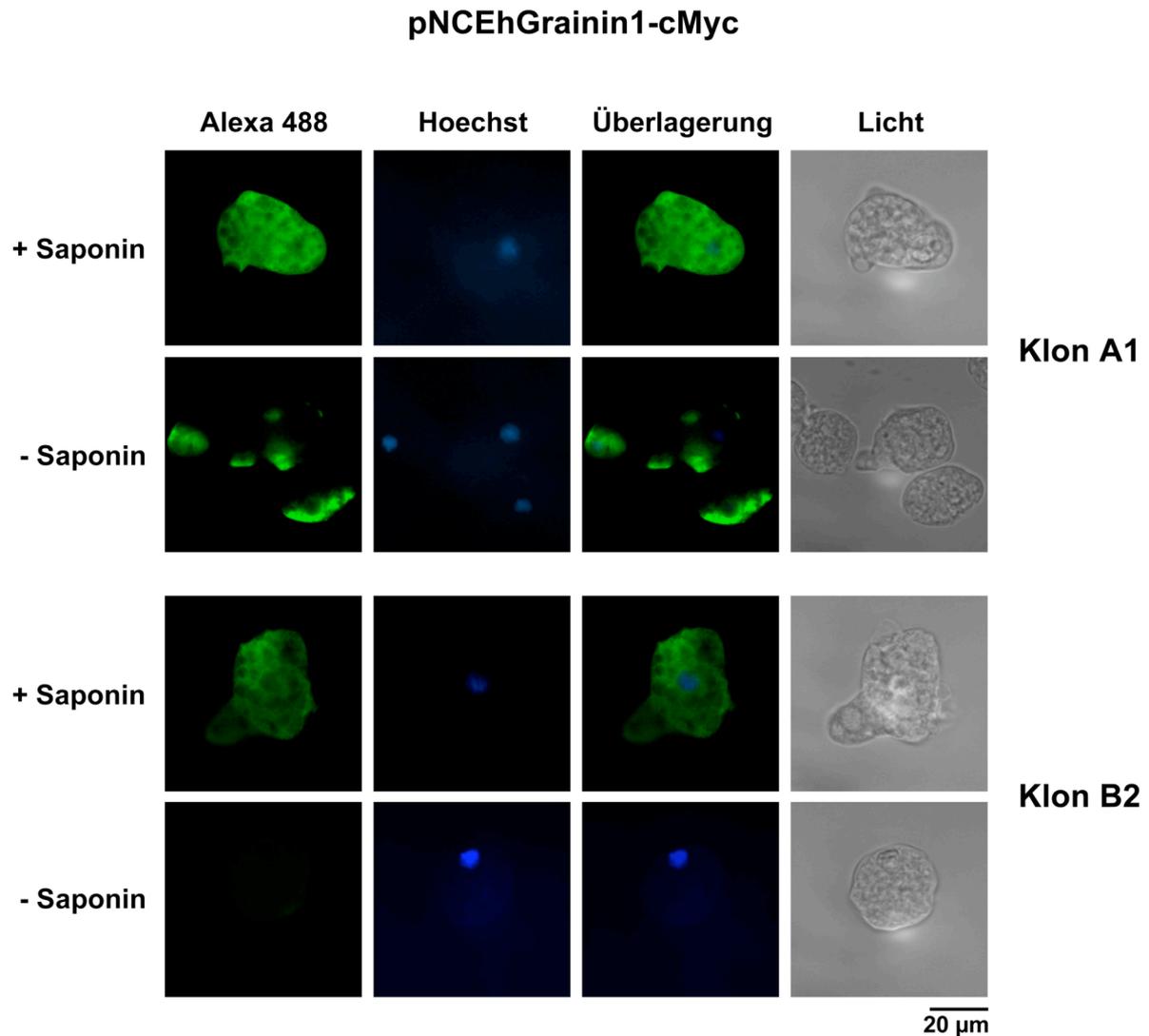


Abb. 3.17: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhGrainin1-cMyc-Transfektanten (Klon A1 + Klon B2). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt. Bei den nicht-permeabilisierten (-Saponin) pNCEhGrainin1-cMyc-Transfektanten von Klon B2 konnte kein Signal detektiert werden.

In Abb. 3.18 ist die Lokalisierung des Thioredoxin1-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhTred1-cMyc transfizierten Klon A1 und Klon B2 Trophozoiten zu sehen. Bei den permeabilisierten Zellen (+Saponin) ist sowohl bei Klon A1 als auch bei Klon B2 Transfektanten eine cytosolische Färbung zu erkennen. Außerdem sieht man eine klare ringförmige Färbung um einzelne vesikuläre Strukturen und den Zellkern. Bei den nicht permeabilisierten Zellen der Klon A1 Transfektanten treten wenige Signale stark konzentriert zu einzelnen Fle-

cken verteilt über die Zellmembran auf. Bei den Klon B2 Transfektanten ist es sogar nur ein Punkt an der Zellmembran, der eine starke Fluoreszenz aufweist. Bei beiden Klonen wurden Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten. Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15 und Abb. 3.16) war nur bei den permeabilisierten Zellen ein Signal zu erwarten, da nur in der NaPBS-Fraktion der Extrakte eine spezifische Bande detektiert werden konnte. Nach der Immunfluoreszenzanalyse sind die erkannten Thioredoxin1-cMyc-Fusionsproteine bei den Klon A1 und B2 Transfektanten sowohl membran-assoziiert, als auch cytoplasmatisch zu finden.

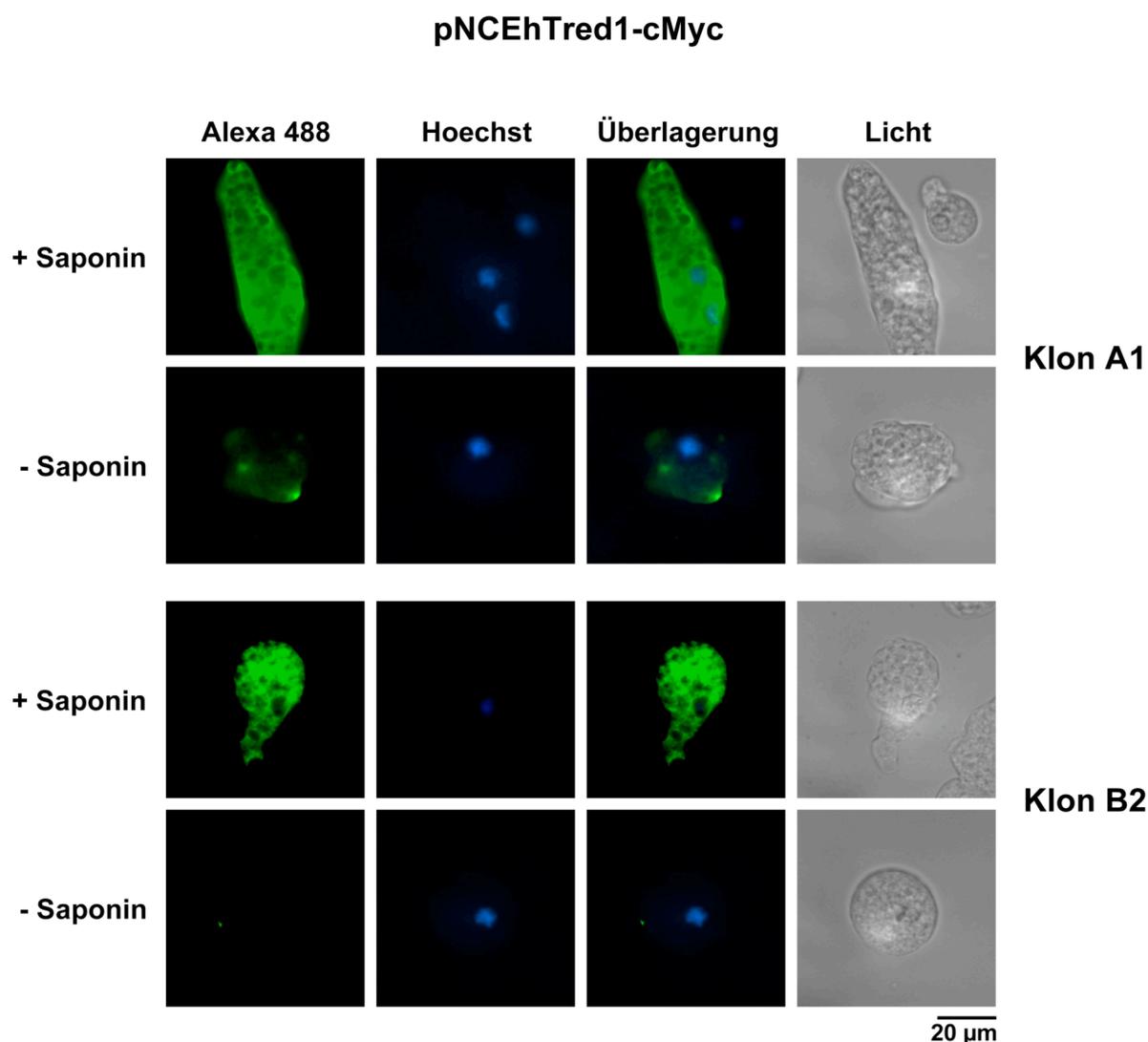


Abb. 3.18: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhTred1-cMyc-Transfektanten (Klon A1 + Klon B2). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufge-

nommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.19 ist die Lokalisierung des *alcoholdehydrogenase*-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhAlcdehyd-cMyc transfizierten Klon A1 und Klon B2 Trophozoiten zu sehen. Bei den permeabilisierten Zellen konnten die erkannten Alkohol-Dehydrogenase-cMyc-Fusionsproteine bei beiden Klonen ganz klar um die Zellkerne lokalisiert werden. Bei Klon A1 sieht es außerdem so aus, als säßen sie zusätzlich direkt unter der Zellmembran und als würde der Rest der Zelle von diesen starken Signalen überstrahlt. Im Fall von Klon B2 hingegen liegt zusätzlich zur Färbung der Kernmembran eine klare cytosolische Färbung um die Vesikel und Vakuolen herum vor. Die nicht permeabilisierten Zellen (-Saponin) weisen eine eher ungewöhnliche Färbung auf. Hier sind einzelne Teile der Zellen angefärbt, welche aber nicht nur auf eine Membranfärbung hinweisen, sondern auch klar ein Signal an der Kernmembran zeigen. Dies tritt bei beiden Klonen A1 und B2 bei intakten Zellen auf. Bei Klon A1 und B2 wurden Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten. Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15 und Abb. 3.16) war dies für die Klon B2 Transfektanten zu erwarten. Die Extrakte der Klon A1 Transfektanten hingegen wiesen nur ein Signal in der Membranfraktion (Triton-X-100 UP) auf. Da aber nicht bekannt ist, mit welcher Membran das putative Membranoberflächenprotein *alcoholdehydrogenase* bei Klon A1 assoziiert ist, ist es möglich, dass es an einer Organellmembran liegt.

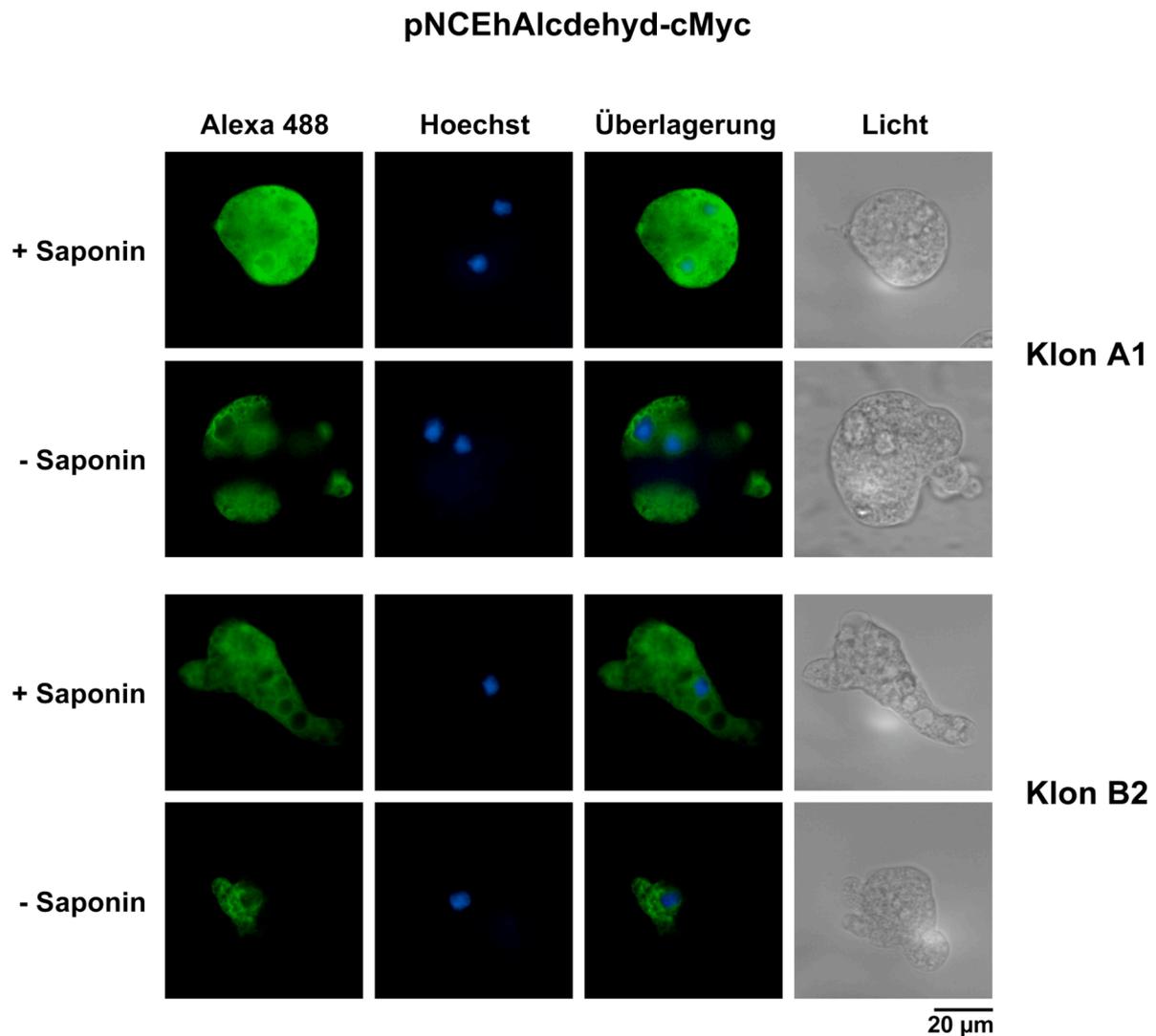


Abb. 3.19: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhAldehyd-cMyc-Transfektanten (Klon A1 + Klon B2). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 μm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.20 ist die Lokalisierung des *COP9-signalosome-complex-subunit1*-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhCOP9-Sigcom-cMyc transfizierten Klon A1 und Klon B2 Trophozoiten zu sehen. Die permeabilisierten Zellen (+Saponin) zeigen eine Lokalisation direkt unter der Zellmembran, welche über die gesamte Zelle strahlt und eine klare ringförmige Färbung um den Zellkern. Bei den nicht permeabilisierten Zellen treten Signale konzentriert an einzelnen Bereichen der Zellmembran auf. Bei beiden Klonen wurden Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen er-

halten. Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15 und Abb. 3.16) war dies zu erwarten. Somit sind die detektierten *COP9-signalosome-complex-subunit1*-cMyc-Fusionsproteine bei den Transfektanten sowohl mit der Membran assoziiert, als auch cytosolisch zu finden.

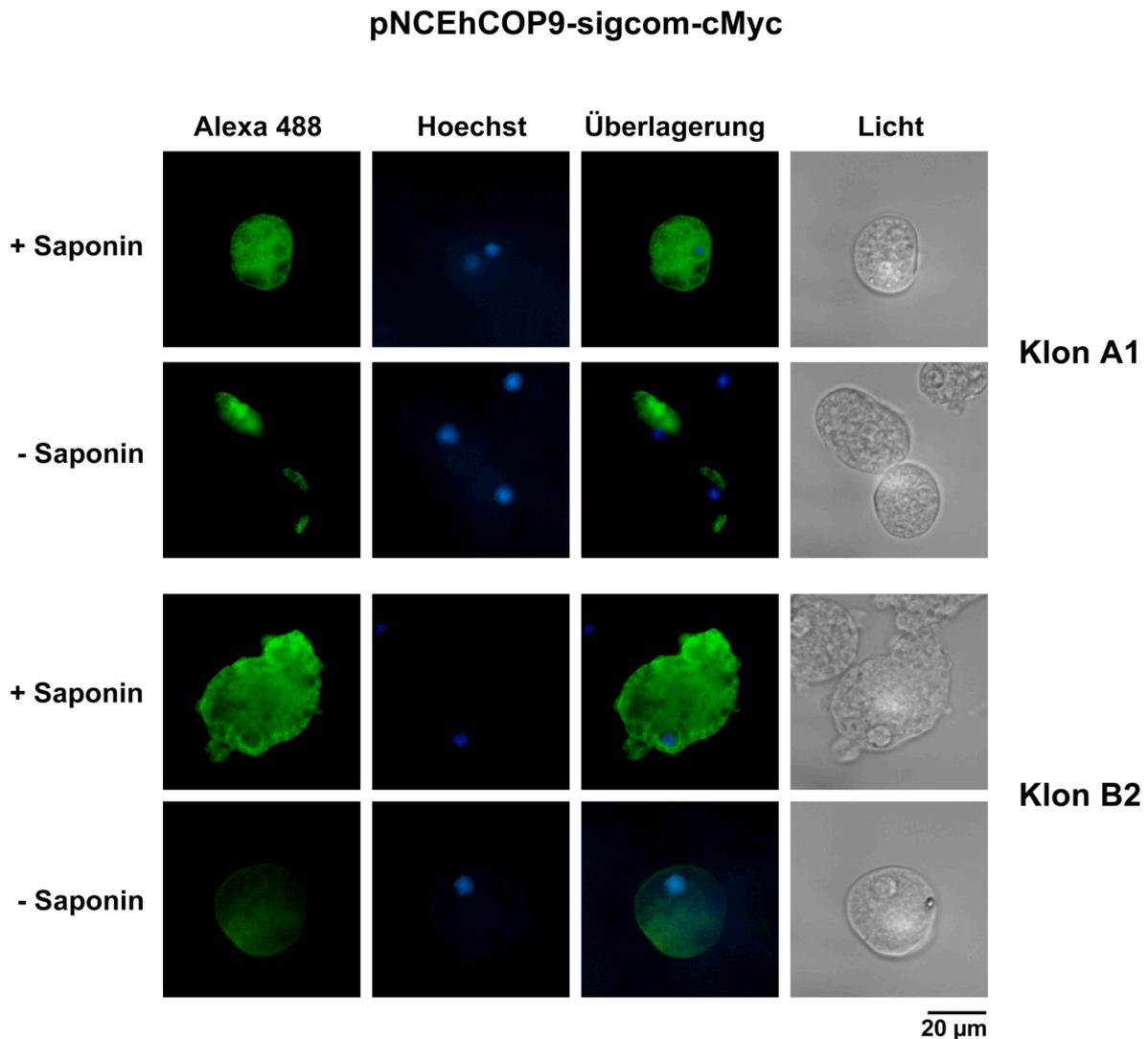


Abb. 3.20: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhCOP9-sigcom-cMyc-Transfektanten (Klon A1 + Klon B2). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Der monoklonale α -cmyc (1:200) diente als primärer Antikörper, als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.21 ist die Lokalisierung des *Clathrin-adaptor-complex*-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhClathrin-ac-cMyc transfizierten Klon A1 Trophozoiten zu sehen. Für die Klon B2 Transfektante konnte in diesem Fall bereits bei den Westernblot-Analysen kein Fusionsprote-

in detektiert werden, somit wurde keine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die permeabilisierten Zellen (+Saponin) von Klon A1 zeigen eine Lokalisation im Cytoplasma und um vesikuläre Strukturen herum. Bei den nicht permeabilisierten Zellen treten Signale konzentriert an einzelnen Bereichen der Zellmembran auf. Es wurden somit Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten. Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15) war dies zu erwarten, denn obwohl die erwartete 18 kDa Bande nur in der Membranfraktion (UP) detektiert wurde, ist in beiden Fraktionen eine spezifische 180 kDa Bande zu beobachten, welche auf einen Komplex schließen lässt. Somit sind die detektierten Clathrin-adaptor-complex-cMyc-Fusionproteine bei den Transfektanten sowohl mit der Membran assoziiert, als auch cytoplasmatisch zu finden.

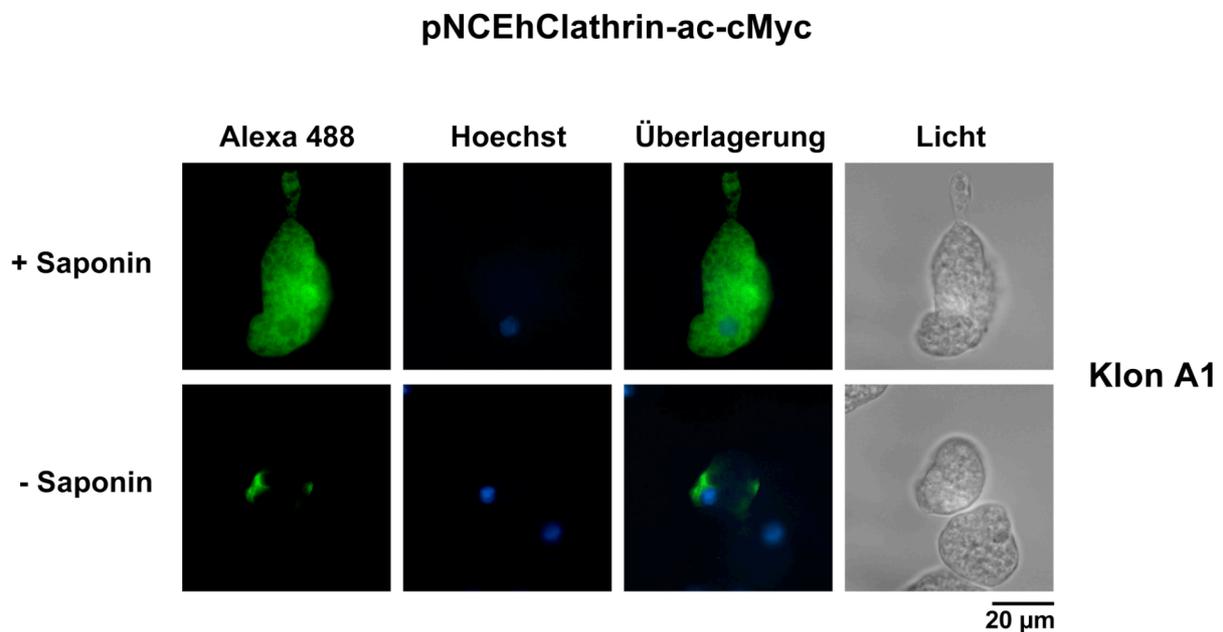


Abb. 3.21: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhClathrin-ac-cMyc-Transfektante (Klon A1). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -myc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.22 ist die Lokalisierung des *Rho-family-GTPase-cMyc*-Fusionproteins bei mit pNCEhRho-GTPase-cMyc transfizierten Klon A1 Trophozoiten zu sehen. Für die Klon B2 Transfektante konnte in diesem Fall bereits bei den Westernblot-Analysen kein Fusionsprotein detektiert werden, somit wurde keine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die permea-

bilisierten Zellen (+Saponin) zeigen eine cytoplasmatische Lokalisation der Fusionsproteine. Bei den nicht permeabilisierten Zellen (-Saponin) treten Signale konzentriert an mehreren Bereichen der Zellmembran auf. Es wurden Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten. Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15) war dies zu erwarten. Die detektierten *Rho-family-GTPase-cMyc*-Fusionproteine sind bei Klon A1 sowohl mit der Membran assoziiert, als auch cytoplasmatisch zu finden.

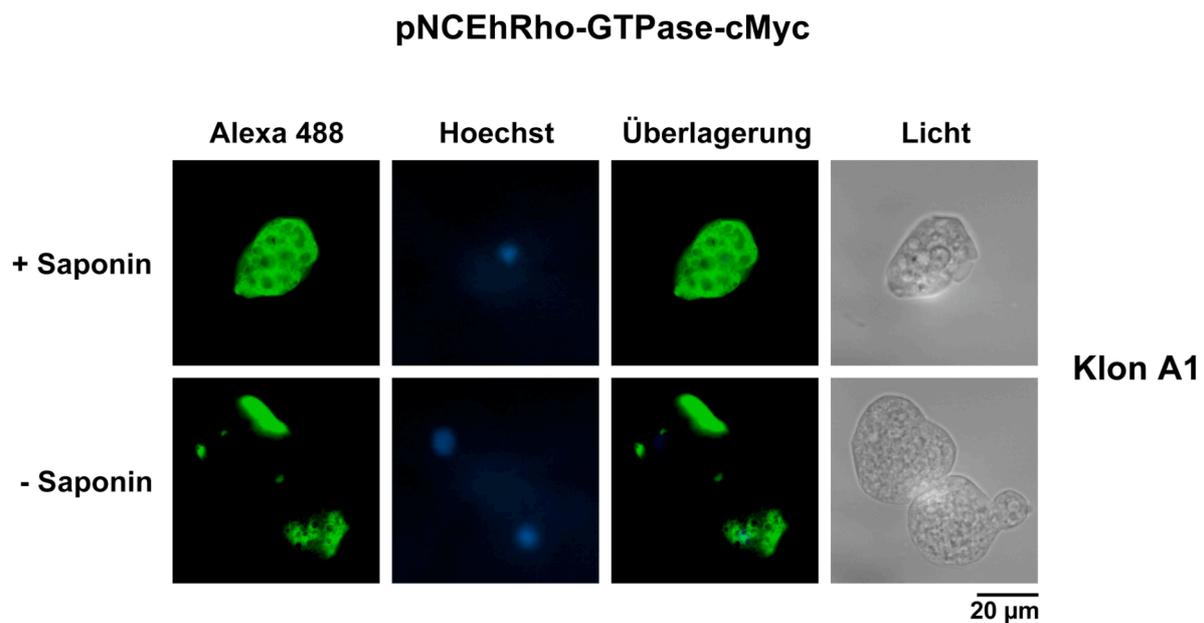


Abb. 3.22: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhRho-GTPase-cMyc-Transfektante (Klon A1). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor® 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.23 ist die Lokalisation des *Proteasome-alpha-subunit-cMyc*-Fusionsproteins bei mit pNCEhproteasome-phasub-cMyc transfizierten Klon A1 Trophozoiten zu sehen. Für die Klon B2 Transfektante konnte in diesem Fall bereits bei den Westernblot-Analysen kein Fusionsprotein detektiert werden und somit wurde keine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die permeabilisierten Zellen (+Saponin) zeigen eine Lokalisation der Fusionsproteine um den Zellkern herum und in körnchenartigen Strukturen über die ganze Zelle verteilt. Bei den nicht permeabilisierten Zellen (-Saponin) erstreckt sich die Färbung fast um die ganze

Zelle herum, wobei einzelne Teile stärkere Signale aufweisen als der Rest. Es wurden somit Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten. Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.15) war dies zu erwarten. Die detektierten *Proteasome-alpha-subunit*-cMyc-Fusionproteine sind bei Klon A1 sowohl mit der Membran assoziiert, als auch cytoplasmatisch zu finden.

pNCEhproteasome-alphasub-cMyc

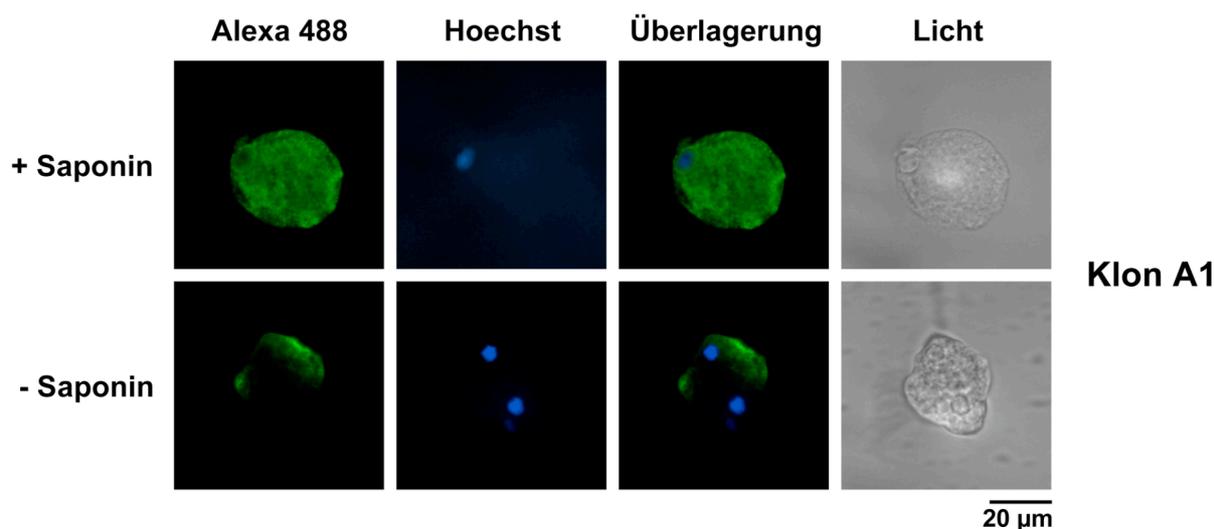


Abb. 3.23: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhproteasome-alphasub-cMyc-Transfektante (Klon A1). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.24 ist die Lokalisierung des *malatedehydrogenase*-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhmaldehyd-cMyc transfizierten Klon B2 Trophozoiten zu sehen. Für die Klon A1 Transfektante konnte in diesem Fall bereits bei den Westernblot-Analysen kein Fusionsprotein detektiert werden und somit wurde keine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die permeabilisierten Zellen (+Saponin) zeigen eine Lokalisation der Fusionsproteine direkt unter der Zellmembran und um den Zellkern herum. Bei den nicht permeabilisierten Zellen (-Saponin) zeigen sich zwei starke Fluoreszenzcluster, die den Rest der Zelle überstrahlen und eine dünne Linie, welche die restliche Zelle umschließt. Somit wurden Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten.

Nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.16) war dies zu erwarten. Die detektierten *malatehydrogenase*-cMyc-Fusionproteine sind bei Klon B2 somit sowohl mit der Zellmembran assoziiert, als auch cytoplasmatisch zu finden.

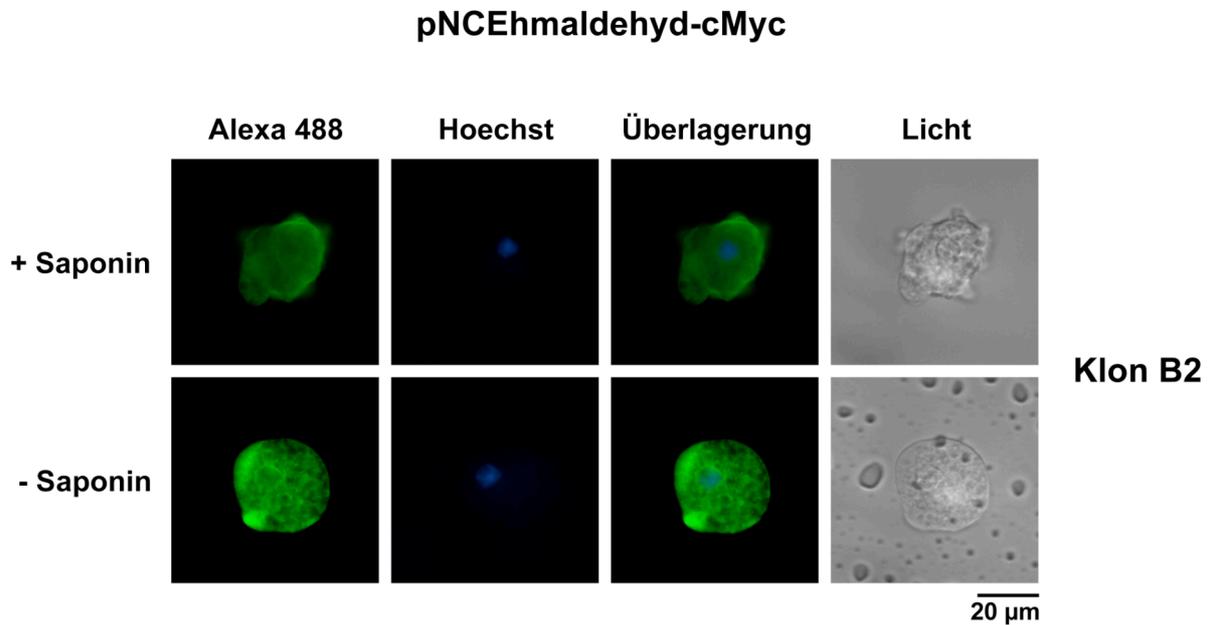


Abb. 3.24: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhmaldehyd-cMyc-Transfektante (Klon B2). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor® 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.25 ist die Lokalisierung des *V-type-ATPase*-cMyc-Fusionproteins bei mit pNCEhV-type-ATPase-cMyc transfizierten Klon B2 Trophozoiten zu sehen. Für die Klon A1 Transfektante konnte in diesem Fall bereits bei den Westernblot-Analysen kein Fusionsprotein detektiert werden, somit wurde keine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Die permeabilisierten Zellen (+Saponin) zeigen eine Lokalisation der Fusionsproteine um vesikuläre Strukturen herum, welche über die ganze Zelle verteilt sind. Bei den nicht permeabilisierten Zellen (-Saponin) zeigt sich ein starkes Signal auf einen geringen Bereich der Zellmembran beschränkt. Es wurden somit Signale sowohl bei nicht permeabilisierten (-Saponin) als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten. Dies widerspricht der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.16), in welcher ausschließlich ein Signal in der Membranfraktion detektiert wurde. Grund hierfür kann die Beteiligung des *V-type-ATPase*-cMyc-Fusionsproteins an Or-

ganellmembranen innerhalb der Zelle sein. Die detektierten *V-type-ATPase-cMyc*-Fusionproteine sind bei Klon B2 in der Immunfluoreszenz-Analyse somit sowohl mit der Zellmembran assoziiert, als auch cytosolisch zu finden.

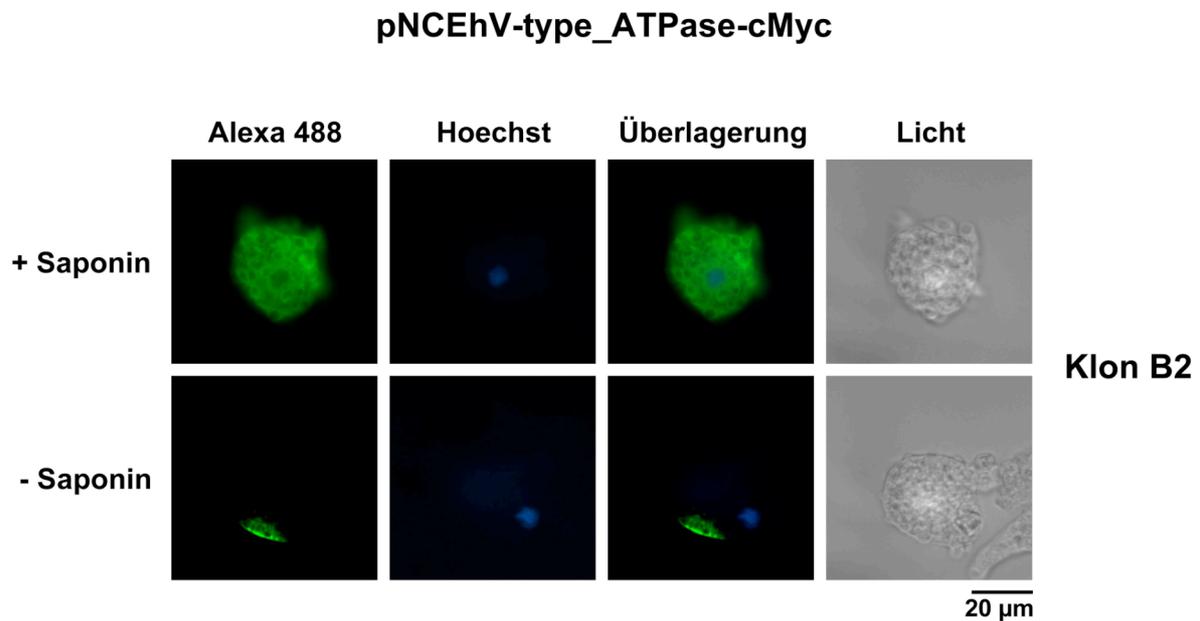


Abb. 3.25: Immunfluoreszenz-Analyse der pNCEhV-type_ATPase-cMyc-Transfektante (Klon B2). Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 µm dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Als Beispiel wurde je eine repräsentative Zelle abgebildet. In der ersten Spalte ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -cmyc monoclonal (1:200), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

3.4.5 Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen ausgewählte Membranproteine

Zur weiteren Verifizierung des Membranproteoms sollten im Rahmen dieser Arbeit bei Klon A1 und Klon B2 ausgewählte, bei der Analyse des Membranoberflächen-Proteoms (Laura Biller unveröffentlicht) gefundene Proteine via Westernblot- und Immunfluoreszenzanalysen lokalisiert werden. Die Lokalisation konnte in diesem Teil der Arbeit durch eigens hergestellte polyklonale Antikörper gegen ausgewählte rekombinante putative Membranoberflächen-Proteine dargestellt werden. Für eine Übersicht der ausgewählten Proteine siehe Tab. 3.5

Tab. 3.5: Zusammenfassung der für die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern ausgesuchten potentiellen Membranoberflächenproteine. Überblick über bearbeitete Proteine, von der Klonierung in pJC45, über die rekombinante Expression (rek. Protein), Immunisierung und Test der Antikörper (Ak) durch Westernblot-Analyse (WB) bis zur Lokalisation via Immunfluoreszenzanalyse (IFA).

Accession-Nr.	Name	kDa rek. Protein	kDa Protein	In pJC45	rek. Protein	Ak WB	Ak IFA
Stressantwort							
XM_644108	Copine	30 rEhCopine	30	✓	✓	-	-
XM_648397	<i>DnaJ family protein</i>	17 rEhDnaJ	41	✓	✓	✓	✓
AF262400	<i>putative iron hydrogenase HydA</i>	18 rEhHydA	51	✓	✓	✓	-
XM_651634	Thioredoxin 1	12 rEhTred1	12	✓	✓	-	-
Cytoskelett							
XM_647328	hypothetisches protein	15 rEhHyp	15	✓	✓	✓	-
GTPasen, GTP Bindung							
XM_651958	<i>guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1</i>	17 rEhguanine_nucbdprot.	35	✓	✓	✓	✓
Metabolismus							
XM_645280	Grainin 1	24 rEhGrainin1	24	✓	✓	✓	✓
Kinasen							
XM_647942	Kinase	28 rEhKinase	28	✓	✓	✓	✓
DNA/RNA Metabolismus, Translation							
AF291721	<i>URE3-BP sequence specific DNA binding protein</i>	26 rEhURE3-BP	26	✓	✓	✓	✓

Ribosomale Proteine							
XM_648051	<i>40S ribosomal protein S10</i>	15 rEh40SribS10	15	✓	✓	-	-
XM_646950	<i>60S ribosomal protein L3</i>	15 rEh60SribL3	46	✓	✓	-	-

Mit den Gensequenzen der ausgewählten Proteine wurden zunächst BLAST-Analysen durchgeführt um die Teile der Sequenz zu ermitteln, bei denen die wenigsten Übereinstimmungen mit anderen *E. histolytica* Gensequenzen bestehen, um spätere Kreuzreaktionen der erhaltenen polyklonalen Antikörper so gering wie möglich zu halten. Diese wurden in den pJC45-Vektor kloniert. Dies gelang für vierzehn ausgewählte Sequenzen. Die fertigen Plasmide wurden erfolgreich während der Transformation in die pAPlacI^Q-Zellen geschleust. Es folgte der Zellaufschluss wie in Abschnitt 2.20.3 beschrieben und eine Westernblot-Analyse wie in Abschnitt 2.20.7. Der verwendete Antikörper α -His richtet sich gegen den N-terminalen His-Tag, welcher bei der Synthese der rekombinanten Proteine an das Zielprotein angefügt wird. Elf rekombinante Proteine (siehe Tab. 3.5) konnten erfolgreich in den erhaltenen Proteinextrakten nachgewiesen (hier nicht gezeigt) und über eine Nickelsäule wie in Abschnitt 2.20.2 beschrieben gereinigt werden. Die Elution von rEhGrainin1, rEhHydA, rEhHyp, rEhguanine_nucbdprot., rEh40SribS10, rEh60SribL3 und rEhDnaJ erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Die rekombinanten Proteine rEhTred1, rEhKinase, rEhURE3-BP und rEhCopine konnten im natürlich gefalteten Zustand eluiert werden. Die gereinigten Proteine zeigen in der SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen die erwarteten Molekulargewichte, zu denen man noch 3 kDa für das fusionierte His-Tag rechnen muss (siehe Abb. 3.26). Für rEhGrainin1 ergibt das ein erwartetes Molekulargewicht von 27 kDa, für rEhTred1 15kDa, für rEhHydA 21 kDa, für rEhHyp 18 kDa, für rEhguanine_nucbdprot. 20 kDa, für rEhKinase 31 kDa, für rEhURE3-BP 29 kDa, für rEh40SribS10 18 kDa, für rEh60SribL3 18 kDa, für rEhDnaJ 20 kDa und für rEhCopine 33 kDa.

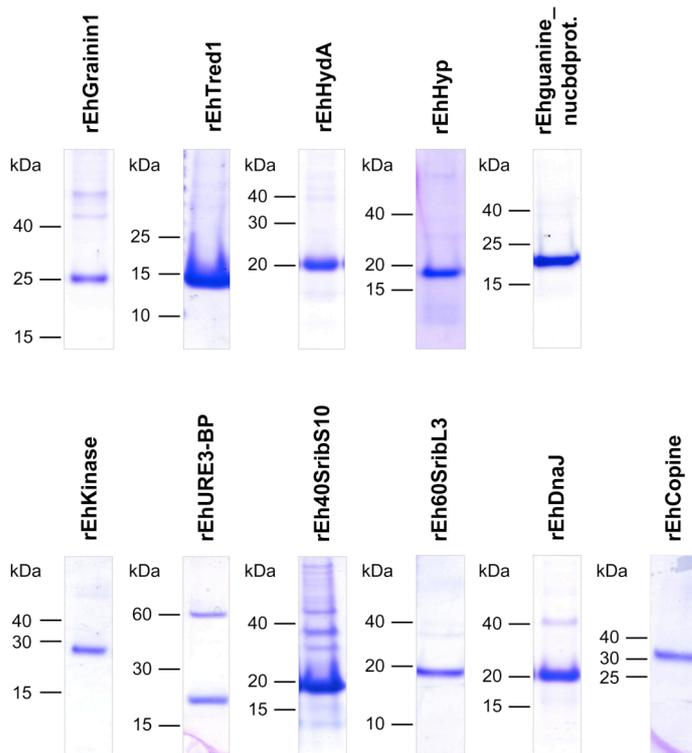


Abb. 3.26: Fraktionen der rekombinanten Proteine rEhGrainin1, rEhTred1, rEhHydA, rEhHyp, rEhguanine_nucbdprot., rEhKinase, rEhURE3-BP, rEh40SribS10, rEh60SribL3, rEhDnaJ und rEhCopine nach der Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Dargestellt sind Ausschnitte von mit Coomassie gefärbten 16 %igen Tricingelen. Aufgetragen wurden je 10 μ L pro Fraktion. Die Elution von rEhGrainin1, rEhHydA, rEhHyp, rEhguanine_nucbdprot., rEh40SribS10, rEh60SribL3 und rEhDnaJ erfolgte mit Puffer C + 500 mM Imidazol. Die Elution von rEhTred1, rEhKinase, rEhURE3-BP und rEhCopine erfolgte mit Elutionspuffer II + 200mM Imidazol.

Mit den erhaltenen rekombinanten Proteinen wurden anschließend wie in Abschnitt 2.21. beschrieben weibliche BALB/c-Mäuse immunisiert. Aus dem Blut der Mäuse wurden die Antiseren gewonnen, welche anschließend in Westernblot-Analysen auf ihre Spezifität geprüft wurden. Hierzu wurden die NaPBS-lösliche Proteinfraction (LP) und die Triton-X-100-lösliche Proteinfraction (UP) von Amöbenextrakten (hergestellt wie in Abschnitt 2.20.3) eingesetzt. Gegen sieben Proteine konnten erfolgreich spezifische Antiseren generiert werden (siehe Abb. 3.27). Der polyklonale Antikörper α -rEhGrainin1 (Serum 1) zeigt wie erwartet ein spezifisches Signal bei 24 kDa in beiden Proteinfractionen und α -rEhHydA (Serum 1) wie erwartet bei 51 kDa in beiden Proteinfractionen. Der polyklonale Antikörper α -rEhHyp (Serum 3) zeigt ebenfalls wie erwartet ein spezifisches Signal in beiden Proteinfractionen bei 15 kDa. Hier ist das Gel ein wenig schief gelaufen. Der polyklonale Antikörper α -rEhguanine_nucbdprot. (Serum 2) zeigt wie erwartet ein Signal bei 35 kDa in beiden Proteinfractionen, wobei es in der NaPBS-Fraktion (LP) nur sehr schwach ausgeprägt ist. Bei α -rEhKinase (Serum 2) ist in beiden Proteinfractionen ein spezifisches Signal bei ca. 140 kDa zu sehen, bei

dem es sich um ein Pentamer handeln muss, da das erwartete Signal bei 28 kDa liegen sollte. Das Signal des polyklonalen Antikörpers α rEhURE3-BP (Serum 3) liegt wie erwartet bei 26 kDa und erscheint in beiden Proteinfractionen während es bei α -rEhDnaJ (Serum 2) nur in der Triton-X-100-Fraktion zu finden ist aber ebenfalls auf der erwarteten Höhe bei 41 kDa liegt.

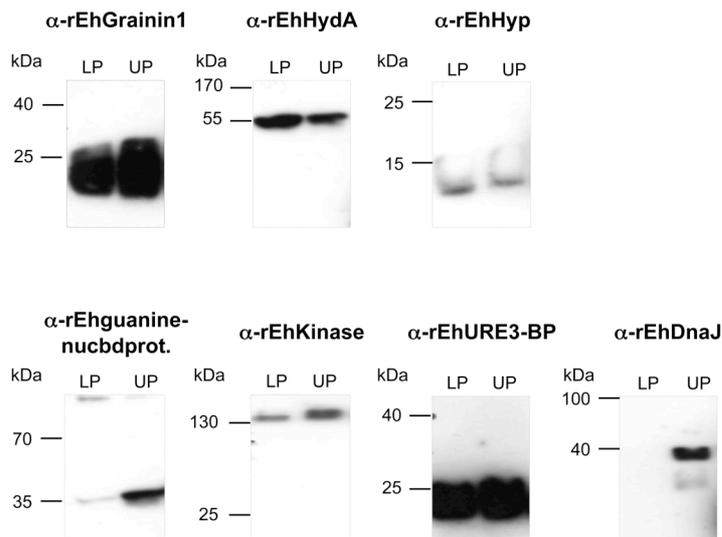


Abb. 3.27: Western-Blot-Analyse zur Ermittlung der Spezifität der generierten Antikörper α -rEhGrainin1 (Serum 1), α -rEhHydA (Serum 1), α -rEhHyp (Serum 3), α rEhguanine-nucbdprot. (Serum 2), α -rEhKinase (Serum 2), α rEhURE3-BP (Serum 3) und α -rEhDnaJ (Serum 2). Es wurden je 50 μ g der NaPBS-löslichen (LP) bzw. Triton X 100-löslichen (UP) Fraktionen auf Tricingle aufgetragen, elektrophoretisch getrennt, per Nassblot-Technik auf Nitrocellulosemembranen transferiert und anschließend mit dem entsprechenden polyklonalen Antiserum als primärem Antikörper (Verdünnung 1:500) und dem *anti-mouse*-HRP-Ak als sekundärem Antikörper (Verdünnung 1:10000) inkubiert.

3.4.6 Lokalisationsstudien potentieller Membranoberflächenproteine in *E. histolytica*-Trophozoiten mittels Immunfluoreszenz

Um die putativen Membranoberflächenproteine bei *E. histolytica* mit Hilfe der hergestellten polyklonalen Antikörper zu lokalisieren wurden Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2 in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Der sekundäre Antikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 488 assoziiert. Die Fixierung, Permeabilisierung mit Saponin und Antikörperinkubation der Trophozoiten wurde wie in Abschnitt 2.22 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden in einer 10000fachen Vergrößerung untersucht. Für die Dekonvolutions-Mikroskopie wurden ausgewählte Zellen mit einer 100x Ölimmersionslinse angeschaut und mit einem Leica DM RB-Mikroskop in 0,3 μ m Schritten optische Schnitte durch die Zelle ausgeführt. Die deconvolvierten Schnitte wurden mit dem *Openlab*-Programm 4.0.2

ausgewertet und bearbeitet. Diese Bilder ermöglichen eine genauere Lokalisierung der potentiellen Membranoberflächenproteine in der Zelle. Bei fünf der sieben eingesetzten Antisera wurden Signale erhalten.

In Abb. 3.28 ist die Lokalisierung von EhGrainin bei *E. histolytica*-Trophozoiten mit dem polyklonalen Antikörper α -rEhGrainin1 (Serum 1) zu sehen. Da sich Grainin 1 und Grainin 2 in ihrer Sequenz kaum unterscheiden ist es zu erwarten, dass der polyklonale Antikörper gegen beide gerichtet ist. Bei den permeabilisierten Zellen (+Saponin) ist sowohl bei Klon A1 als auch bei Klon B2 eine cytosolische Färbung zu erkennen. Außerdem sieht man eine klare ringförmige Färbung um den Kern und um einzelne vesikuläre Strukturen. Bei den nicht permeabilisierten Zellen sind deutliche Unterschiede zwischen Klon A1 und Klon B2 zu erkennen. Während die Färbung bei Klon A1 konzentriert an wenigen Bereichen der Zellmembran zu beobachten ist, sieht man bei Klon B2 eine Lokalisation an einem Rand der Zelle, welche eine vesikelartige Struktur einzuschließen scheint und über den Rest der Zelle strahlt. Somit wurden Signale sowohl bei nicht permeabilisierten als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten, was nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.27) zu erwarten war. Die erkannten Grainin-Proteine sind sowohl membran-assoziiert, als auch cytosolisch zu finden.

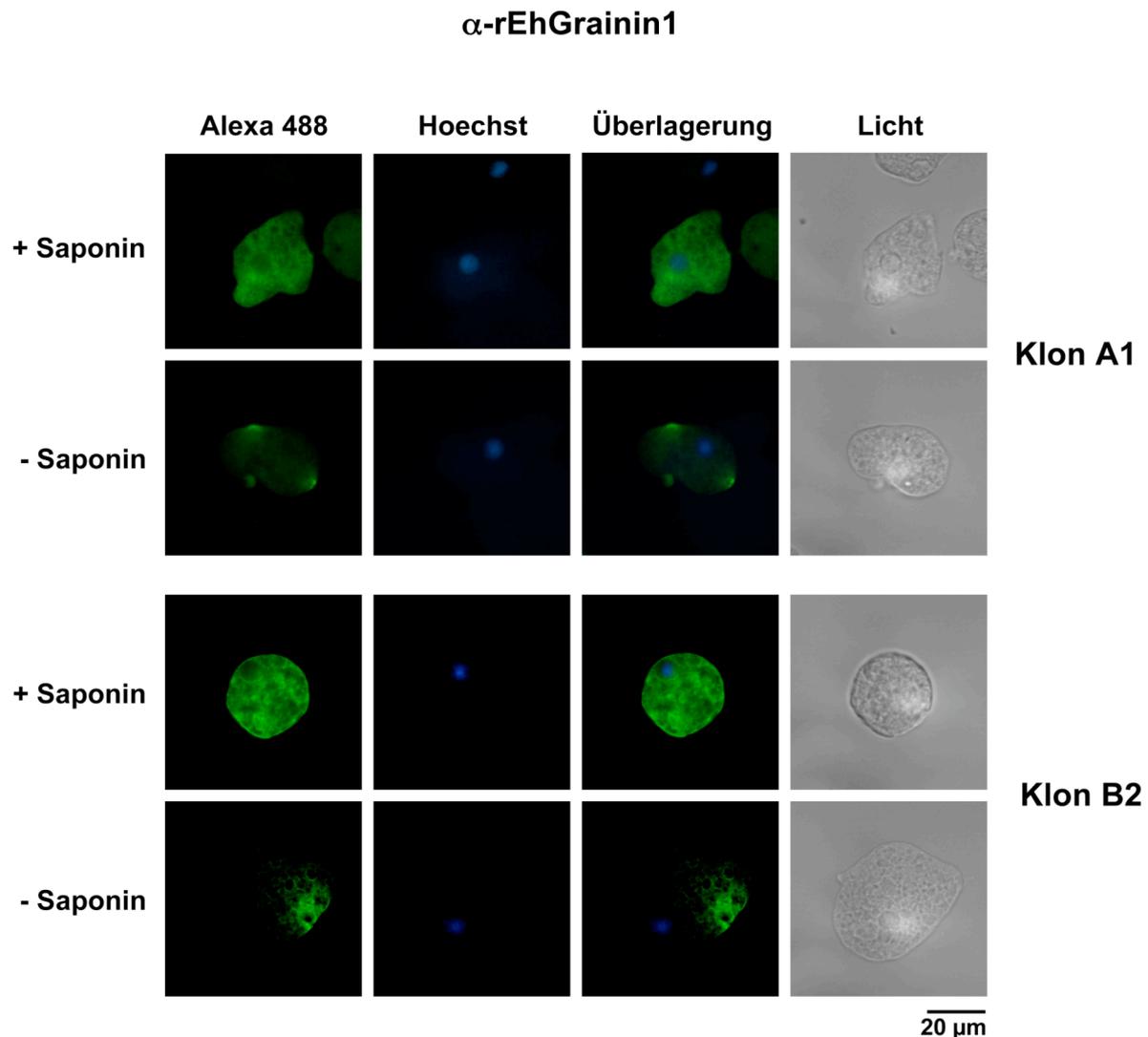


Abb. 3.28: Lokalisierung der durch α -rEhGrainin1 erkannten Proteine bei *E. histolytica*-Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2. Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 μ m dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Für jeden Klon wurde als Beispiel eine repräsentative Zelle abgebildet. In der jeweils ersten Spalte bei Klon A1 und Klon B2 ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -rEhGrainin1 (1:100), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.29 ist die Lokalisierung von *Eh*guanine nucleotide-binding proteine subunit beta 2-like- Proteinen (Ehguanine-nucbdprot) bei *E. histolytica*-Trophozoiten mit dem polyklonalen Antikörper α -rEhguanine-nucbdprot (Serum 2) zu sehen. Da sich Ehguanine-nucbdprot-Proteine in ihrer Sequenz stark ähneln, ist es zu erwarten, dass der polyklonale Antikörper gegen mehrere gerichtet ist. Bei den permeabilisierten Zellen (+Saponin) von Klon B2 ist eine distinkte ringförmige Färbung um zahlreiche große Organellen in der Zelle zu erkennen. Bei

den nicht permeabilisierten Zellen sind bei Klon A1 und Klon B2 leuchtende Punkte zu erkennen, welche bei beiden Klonen ungefähr die gleiche Größe und Verteilung aufweisen, bei Klon A1 aber deutlicher zu erkennen sind. Somit wurden Signale bei Klon B2 sowohl bei nicht permeabilisierten als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen erhalten, bei Klon A1 ausschließlich bei nicht permeabilisierten Zellen, was nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.27) nicht überrascht, da dort in der löslichen Proteinfraction kaum ein Signal zu erkennen war. Somit sind die erkannten *guanine nucleotide-binding proteins subunit beta 2-like*-Proteine bei Klon B2 sowohl mit der Membran assoziiert als auch cytosolisch zu finden, während sie bei Klon A1 nur Membran-assoziiert vorliegen.

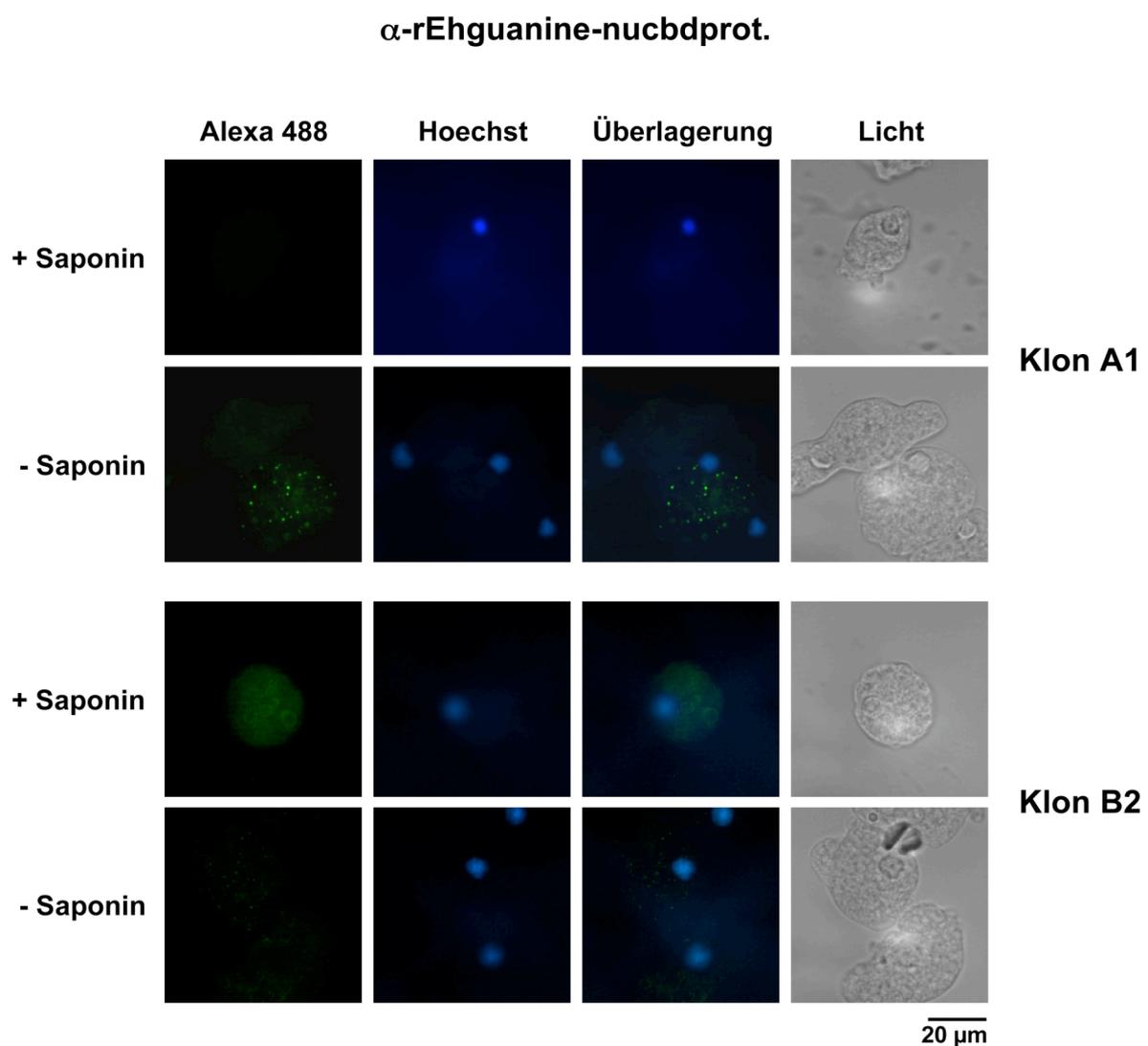


Abb. 3.29: Lokalisierung der durch α -rEhguanine-nucbdprot. detektierten Proteine bei *E. histolytica*-Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2. Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 μ m dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Für jeden Klon wurde als Beispiel eine repräsentative Zelle abgebildet. In der jeweils ersten Spalte bei

Klon A1 und Klon B2 ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -rEhguanine-nucbdprot. (1:100), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt. Bei Klon A1 konnte bei den permeabilisierten (+Saponin) Zellen kein Signal nachgewiesen werden.

In Abb. 3.30 ist die Lokalisierung der ausgewählten EhKinase bei *E. histolytica*-Trophozoiten mit dem polyklonalen Antikörper α -rEhKinase (Serum 2) zu sehen. Bei Klon A1 konnte kein Signal detektiert werden. Bei den permeabilisierten Zellen (+Saponin) von Klon B2 sind zahlreiche ‚distinkte, kreisförmige, durchgehend gefärbte, vesikuläre Strukturen zu erkennen, die sich in der Zelle befinden. Bei den nicht permeabilisierten Zellen von Klon B2 sind ringförmige, nicht durchgehend gefärbte Strukturen zu beobachten, welche einen größeren Durchmesser als die kreisförmigen Strukturen bei den permeabilisierten Zellen aufweisen und mit der Außenmembran fusioniert scheinen. Bei Klon B2 ist ein klares Signal bei beiden Methoden zu erkennen, was nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.27) zu erwarten war. Somit ist die erkannte Kinase bei Klon B2 sowohl mit der Membran assoziiert, als auch cytosolisch lokalisiert.

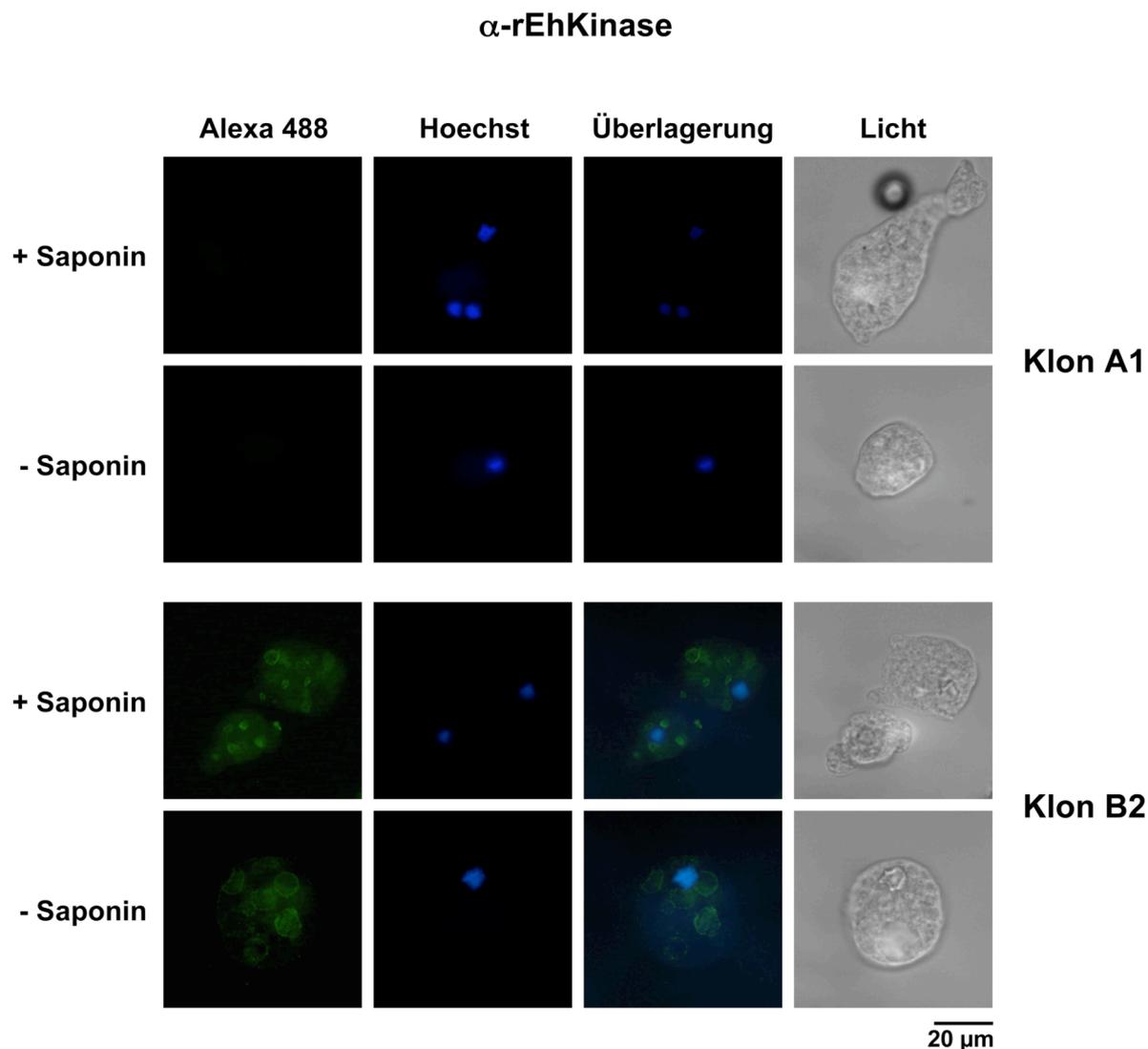


Abb. 3.30: Lokalisierung der durch α -rEhKinase erkannten Proteine bei *E. histolytica*-Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2. Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 μ m dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Für jeden Klon wurde als Beispiel eine repräsentative Zelle abgebildet. In der jeweils ersten Spalte bei Klon A1 und Klon B2 ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -rEhKinase (1:100), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt. Bei Klon A1 konnte weder bei den permeabilisierten (+Saponin) noch bei den nicht permeabilisierten Zellen (-Saponin) ein Signal nachgewiesen werden.

In Abb. 3.31 ist die Lokalisierung von *EhURE3-BP sequence specific DNA binding protein* (EhURE3-BP) bei *E. histolytica*-Trophozoiten mit dem polyklonalen Antikörper α -rEhURE3-BP (Serum 3) zu sehen. Da das EhURE3-BP-Protein in seiner Sequenz stark mehreren *EF-hand calcium binding domain containing*-Proteinen ähnelt sind Kreuzreaktionen möglich. Bei den permeabilisierten Zellen (+Saponin) beider Klone ist eine klare ringförmige Färbung um

den Kern zu erkennen. Außerdem sieht man die Umrandung anderer vesikulärer Strukturen und der Zelle selbst. Zusätzlich ist eine cytosolische Färbung vorhanden. Bei den nicht permeabilisierten Zellen ist bei beiden die Färbung konzentriert auf wenige fleckartige Bereiche der Zellmembran. Somit wurden bei Klon A1 und Klon B2 sowohl bei nicht permeabilisierten als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen ein Signal erhalten, was nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.27) zu erwarten war. Die erkannten Proteine sind sowohl membran-assoziiert, als auch cytosolisch zu finden.

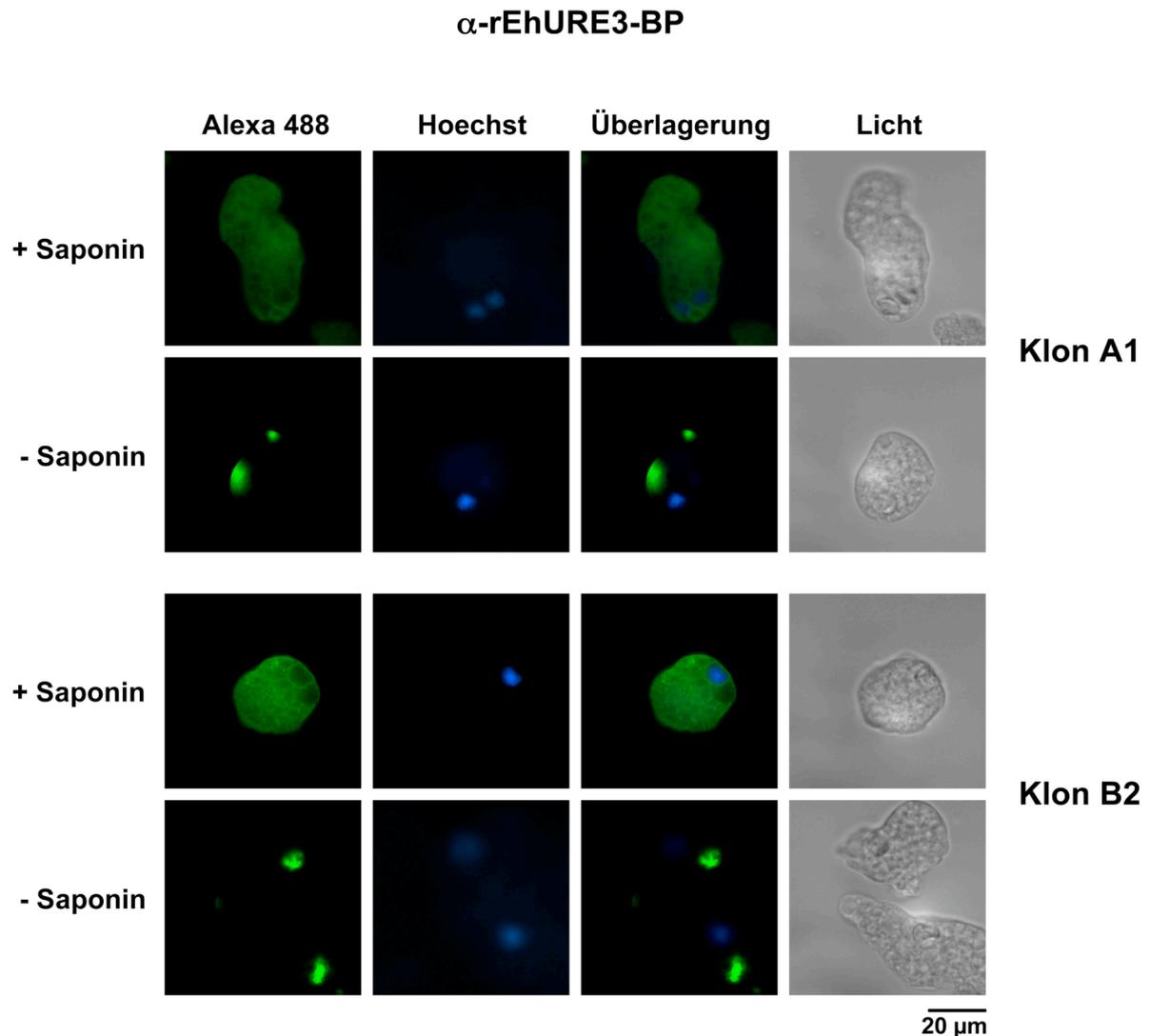


Abb. 3.31: Lokalisation der durch α -rEhURE3-BP erkannten Proteine bei *E. histolytica*-Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2. Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 μ m dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Für jeden Klon wurde als Beispiel eine repräsentative Zelle abgebildet. In der jeweils ersten Spalte bei Klon A1 und Klon B2 ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -rEhURE3-BP (1:100), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

In Abb. 3.32 ist die Lokalisierung des *DnaJ family*-Proteins bei *E. histolytica*-Trophozoiten mit dem polyklonalen Antikörper α -rEhDnaJ (Serum 2) zu sehen. Bei den permeabilisierten Zellen (+Saponin) beider Klone ist je eine distinkte, kreisförmige, durchgehend gefärbte, vesikuläre Struktur zu erkennen, welche bei Klon B2 einen doppelt so großen Durchmesser aufweist wie die bei Klon A1. Bei den nicht permeabilisierten Zellen unterscheiden sich die Signale von den beiden Klonen. Bei Klon A1 sind zahlreiche kleine kreisförmige, durchgehend gefärbte Strukturen an der Membranoberfläche zu beobachten während bei Klon B2 eine ringförmige, nicht durchgehend gefärbte Struktur zu erkennen ist, welche einen ähnlichen Durchmesser wie die kreisförmigen Struktur bei den permeabilisierten Zellen von Klon B2 aufweist und mit der Außenmembran fusioniert scheint. Bei beiden Klonen wurde sowohl bei nicht permeabilisierten als auch bei mit Saponin permeabilisierten Zellen ein Signal detektiert. Dies war nach der Westernblot-Analyse (siehe Abb. 3.27) nicht zu erwarten, denn dort konnte nur in der Membranfraktion ein Signal detektiert werden. Somit ist das erkannte *DnaJ family*-Protein bei beiden Klonen sowohl membran-assoziiert, als auch in Vesikeln zu finden.

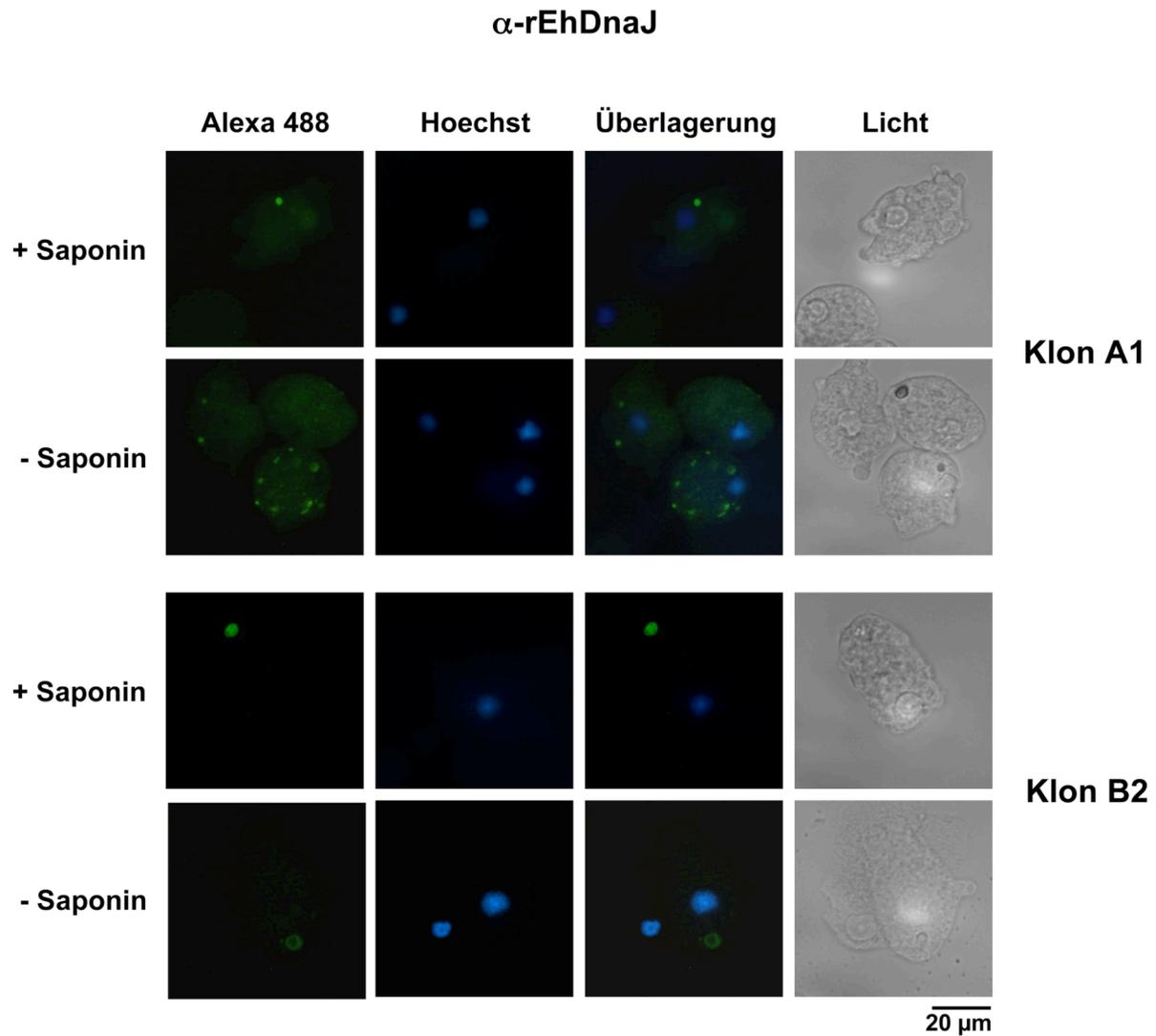


Abb. 3.32: Lokalisierung der durch α -rEhDnaJ erkannten Proteine bei *E. histolytica*-Trophozoiten von Klon A1 und Klon B2. Dargestellt sind die deconvolvierten Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten, teils permeabilisierten (+Saponin) Trophozoiten. Durch die Analyse mit der *Deconvolution*-Technik ist es möglich die Zelle optisch in mehrere 0,3 μ m dicke Schnitte aufzuteilen und somit eine klarere Lokalisation zu erhalten. Für jeden Klon wurde als Beispiel eine repräsentative Zelle abgebildet. In der jeweils ersten Spalte bei Klon A1 und Klon B2 ist der FITC-Kanal gezeigt, die zweite Spalte gibt den DAPI-Kanal wieder, Spalte drei zeigt die Überlagerung beider Kanäle und Spalte vier das Durchlichtbild der aufgenommenen Zelle. Als primärer Antikörper diente α -rEhDnaJ (1:100), als sekundärer α -mouse ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

4 Diskussion

4.1 Vergleichende Analysen der Zelllinien A und B

Die Infektion mit *E. histolytica*, dem Erreger der Amöbiasis, kann unterschiedliche Verlaufsformen annehmen. Die Auslöser dieser Unterschiede sind weitestgehend unbekannt. Es gibt zwar Moleküle wie die Cysteinpeptidasen, Lektine und Amoebapores, welche unter starkem Verdacht stehen im Rahmen der Pathogenität mitzuwirken, jedoch wurden sie sowohl bei pathogenen als auch apathogenen Isolaten nachgewiesen (Davis et al., 2007). Somit scheidet ihre Alleinverantwortlichkeit aus. Allerdings bietet sich für die Klärung welche Proteine, Gene oder andere Faktoren den entscheidenden Unterschied ausmachen, weiterhin der Vergleich von Zelllinien an, welche konstant starke Unterschiede in ihrer Pathogenität aufweisen. Verschiedene Studien haben sich bereits mit dieser Fragestellung beschäftigt (Davis et al., 2007; Ehrenkaufner et al., 2007; Davis et al., 2006; MacFarlane und Singh, 2006). Hier wurden hauptsächlich das Isolat HM-1:IMSS und das Isolat Rahman gegenüber gestellt. HM-1:IMSS stammt aus einem Amöbenkolitis-Patienten. Durch mehrfache Leberpassagen gelang es den Experimentatoren phänotypisch aggressive Zellen zu generieren, welche in der Lage waren Amöbenleberabszesse (ALAs) im Tiermodell zu erzeugen. Rahman hingegen kommt von einem Patienten mit asymptomatischem Verlauf der Amöbiasis, ist apathogen und nicht dazu fähig ALAs oder Amöbenkolitis im Tiermodell zu induzieren. Der Vergleich dieser beiden Isolate zur Identifizierung von Pathogenitätsauslösern weist mehrere Defizite auf. Die beiden Isolate haben einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund. Zusätzlich treten bei Rahman Defekte auf, hierzu gehören unter anderem eine Dysfunktion in der Phagozytose und eine stark verminderte zytopathische Aktivität (Davis et al., 2006). Die Vermutung liegt nahe dass diese Effekte für die verminderte Virulenz von Rahman verantwortlich sind und ein Vergleich mit diesem Isolat somit keine Rückschlüsse auf Pathogenitätsfaktoren ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher alle Studien mit der apathogenen Zelllinie A und der pathogenen Zelllinie B durchgeführt welche beide von dem Isolat HM-1:IMSS abstammen. Für diese wurde durch die Überprüfung von *tRNA-linked short tandem repeat* (STR)-Sequenzen ihrer DNA von sechs verschiedenen chromosomalen *Loci* ihr identischer genetischer Hintergrund belegt (Biller et al., 2009). Sie grenzen sich so von anderen Isolaten ab, welche bei ähnlichen Vergleichen dieser genomischen Marker Variationen aufweisen (Ali et al., 2005; Biller et al., 2009).

4.2 Klonierung der Zelllinien A und B

Um das Vorliegen einer Mischkultur auszuschließen, wurden im Rahmen dieser Arbeit je zwölf Klone pro Zelllinie generiert. Hierbei war es besonders wichtig durch genaue Kontrollen sicherzustellen, dass wirklich Einzelzellen eingesät wurden, aus denen dann die zu untersuchenden Populationen entstanden. Anschließend wurden alle Klone unter gleichen, axenischen Kulturbedingungen von einem Experimentator gehalten um zu verhindern, dass unterschiedliche äußere Bedingungen einen Einfluss auf das Verhalten der Trophozoiten im Tiermodell haben. Ein wichtiger Indikator für die Pathogenität von Amöben ist die Fähigkeit Leberabszesse zu bilden. In Infektionsexperimenten zur Induktion von ALAs mit *Meriones unguiculatus* konnte Zelllinie A nur kleine Läsionen hervorrufen, während Zelllinie B große Abszesse verursachte, die bis zu 30 % der gesamten Leber betrafen. (Biller *et al.*, 2009). Dieses Ergebnis wurde ohne vorherige Leberpassage erhalten, welche normalerweise bei anderen Isolaten regelmäßig benötigt wird um einen stabilen, pathogenen Phänotyp zu generieren und aufrecht zu halten. Der pathogene Phänotyp von Zelllinie B ist inzwischen bereits seit acht Jahren ohne jede Tierpassage stabil. Die generierten Klone der beiden Zelllinien weisen eine starke Variabilität in den von ihnen verursachten Abszessgrößen auf. Während die Klone der apathogenen Zelllinie A sich trotz der Varianz untereinander alle im apathogenen Bereich bewegen, sind bei der pathogenen Zelllinie B auch drei apathogene Klone (B1, B6 und B8) zu beobachten. Mit Hilfe von Subklonierungen konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Phänotypen stabil sind. Alle weiterführenden Studien in dieser Arbeit wurden mit dem apathogenen Klon A1 und dem pathogenen Klon B2 oder aber mit allen Klonen durchgeführt.

4.3 Vergleichende SNP-Analysen bei *E. histolytica*

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal vergleichende genomweite SNP-Analysen zwischen den beiden syngenen Klonen A1 und B2 durchgeführt, welche eine Korrelation zwischen auftretenden SNPs und der Pathogenität überprüfen sollten. Seit dem 2005 das gesamte Genom von *E. histolytica* zugänglich wurde (Loftus *et al.*, 2005) lag das Hauptaugenmerk auf Transkriptom-Studien in denen die Genexpression unterschiedlicher Isolate oder Zelllinien via *Microarray*-Analysen untersucht wurde (Gilchrist und Petri, 2008; Davis *et al.*, 2007; Biller *et al.*, 2010). SNPs wurden, wenn überhaupt, bisher nur im Zusammenhang mit Evolutionsstudien untersucht, um die Diversitäten zwischen unterschiedlichen Isolaten darzustellen (Shah *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2005; Gosh *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass die Diversität zwischen unterschiedlichen *E. histolytica* Isolaten sehr gering ist (Shah *et al.*, 2005). Somit ist es nicht verwunderlich, dass zwischen den beiden Klonen A1 und B2

eine relativ geringe Anzahl an SNPs gefunden wurde und dass die Anzahl an SNPs, bei denen zumindest einer der Klone homozygot für ein Nukleotid ist, und dort nach der Translation eine neue Aminosäure entsteht noch sehr viel geringer ausfällt. Bei der Validierung der erhaltenen SNPs fällt auf, dass die vier SNPs, welche nicht bestätigt werden konnten nur in sehr geringer Zahl sequenziert wurden. Während die anderen Nukleotide ca. 35 – 140 Mal detektiert wurden, sind diese seltener als 15 Mal sequenziert worden. Da in der Sequenzierung immer ein Klon als heterozygot für einen SNP gefunden wurde, für den der andere homozygot vorlag und bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen immer nur ein Nukleotid detektiert wurde, somit sowohl die A als auch die B-Klone homozygot für das gleiche Nukleotid vorgefunden wurden, ist ein statistischer Grund für die abweichenden Ergebnisse unwahrscheinlich. Es wäre zwar wahrscheinlich, dass bei 15 Sequenzierungen nur ein Nukleotid identifiziert wird, obwohl zwei vorliegen, aber dann hätte man die Klone bei der Sequenzierung als homozygot für den SNP finden müssen und nicht bei der anschließenden Validierung. Für eine endgültige Klärung könnte eine erneute Sequenzierung der SNP-Regionen der vier abweichenden SNPs sorgen.

Das keine Korrelation zwischen den untersuchten SNPs und der Pathogenität der untersuchten Klone gefunden wurde lässt darauf schließen, dass andere Regulationsmechanismen auf Genom- oder Transkriptomebene ausschlaggebend sind, oder doch die posttranslationale Prozessierung von Proteinen den entscheidenden Unterschied ausmachen.

4.4 Analyse der Korrelation zwischen CPs und Pathogenität

Cysteinpeptidasen gelten inzwischen seit Jahrzehnten als wichtiger Virulenzfaktor bei der Amöbiasis. Bis heute wurde in diversen *in vivo* und *in vitro* Studien nach einer Beantwortung folgender Frage gesucht: Sind die Cysteinpeptidasen wirklich so ausschlaggebend für die Pathogenität von *E. histolytica*? (Gadasi and Kessler, 1983; Lushbaugh *et al.*, 1985; Keene *et al.*, 1990; Luaces and Barrett, 1988; Reed *et al.*, 1989; Schulte and Scholze, 1989; Bruchhaus *et al.*, 1996; Bruchhaus *et al.*, 2003; Tillack *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2007). In den meisten Studien wurde sich hierbei auf die EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 konzentriert. Diese wurden bereits näher charakterisiert, und es wurde davon ausgegangen, dass sie > 90 % der CP-Gesamtaktivität von *E. histolytica* ausmachen. (Nowak 2005; Hellberg *et al.*, 2001; Tillack *et al.*, 2006) In einer weiterführenden Studie wurde die Aktivität einer vierten CP charakterisiert, der CP-A7, welche zusätzlich einen großen Teil der > 90 % der Gesamtaktivität ausmacht (Irmer *et al.*, 2009). Erst seitdem bekannt ist, dass *E. histolytica* über 50 Cystein-

peptidasegene verfügt, von denen 37 zur C1 Papain-Superfamilie gehören (Loftus *et al.*, 2005; Tillack *et al.*, 2007), liegt das Augenmerk auf der Gesamtheit der CPs. Durch die Überexpression einzelner ausgewählter CPs in Trophozoiten des apathogenen Klon A1 sollte in der vorliegenden Arbeit deren Einfluss auf die ALA-Bildung im Mausmodell (*Mus musculus*) untersucht werden. Ausgewählt wurden die vier Cysteinpeptidasen *ehcp-a1*, *ehcp-a2*, *ehcp-a5* und *ehcp-a7* welche von Amöben in Kultur am stärksten exprimiert werden (Bruchhaus *et al.*, 2003; Tillack *et al.*, 2007; Irmer *et al.*, 2009). In vorausgegangenen und parallel verlaufenden Studien konnte eine erhöhte Expression verschiedener CPs im ALA detektiert werden. So wurde in Trophozoiten aus den Lebern von *Meriones unguiculatus* mit Hilfe von *Real-Time*-PCR-Analysen eine gesteigerte Expression der *ehcp-a4* und *ehcp-c13* beobachtet und in Trophozoiten aus ALAs bei *Mus musculus* eine erhöhte Expression von *ehcp-a4*, *ehcp-a5*, *ehcp-a6* und *ehcp-a7* (Diplomarbeit Marien, 2008; Diplomarbeit Bär, 2011). Da die *ehcp-a3*, *ehcp-a10* und *ehcp-b9* erst zum Ende dieser Arbeit hin als stärker exprimiert identifiziert wurden, konnten diese im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr berücksichtigt werden. Unter Kulturbedingungen sind die Gene der *ehcp-a4* und *ehcp-c13* nur schwach exprimiert und das Gen der *ehcp-a6* moderat (Tillack *et al.*, 2007; Irmer *et al.*, 2009). Noch mit in die hier vorliegenden Studien aufgenommen wurde die EhCP-B8. Es wurde gezeigt, dass asymptomatische *E. histolytica* Träger einen spezifischen Antikörpertiter gegen die EhCP-B8 aufweisen. Dieses ist erstaunlich, da zumindest unter Kulturbedingungen die *ehcp-b8* eine der am schwächsten exprimierten Peptidasegene von *E. histolytica* ist. Somit könnte es sein, dass der EhCP-B8 eine Rolle bei der Invasion zukommt (Dissertation Tillack, 2008)

4.4.1 Überexpression von ausgewählten Cysteinpeptidasegenen in Klon A1

Zur Analyse einzelner Proteine kann in *E. histolytica* die molekularbiologische Technik der Überexpression des entsprechenden Gens angewendet werden. Hierdurch ist es möglich die Auswirkungen der erhöhten Menge einer spezifischen Cysteinpeptidase beim apathogenen Klon A1 auf die Leberabszessbildung zu überprüfen. Um festzustellen, ob in den entsprechenden Transfektanten eine erhöhte Transkript- und Proteinmenge vorliegt, wurden *Real-time* PCR-Analysen, CP-*Assays* und Substratgelelektrophoresen durchgeführt. Für jedes Cysteinpeptidasegen konnte eine differentiell erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle A1_pNC nachgewiesen werden. Außerdem konnte für alle Transfektanten, bis auf A1_pNC-CPA6 und A1_pNC-CPB8, eine stärkere CP-Gesamtaktivität im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. In der Substratgelelektrophorese (Abb. 3.6) zeigen die Mitglieder der EhCP-A Familie, welche durchweg ähnliche Molekularmassen besitzen, alle ein un-

terschiedliches Laufverhalten (Hellberg *et al.*, 2000; Tillack *et al.*, 2006; 2007; Irmer *et al.*, 2009). Wie auch schon bei Tillack *et al.* 2006 gezeigt, führt die Transfektion mit dem Vektor für die Expression der *ehcp-a2* zu einem verstärkten Signal bei Aktivitätsbande bei 42 kDa. Die Überexpression der *ehcp-a5* führt aus bisher noch nicht geklärten Umständen zur Steigerung der Aktivität aller erkennbaren Peptidasen. Anders als bei den dort durchgeführten Northern Blot-Analysen in denen keine erhöhte mRNA-Menge des *ehcp-a2* und *-a1* Gens in den Zelllinie B_pNC-CPA5 Transfektanten festgestellt wurde, konnte in dieser Arbeit mittels *Real-time* PCR eine differentiell erhöhte Transkriptmenge des *ehcp-a1* und *-a2* Gens festgestellt werden. Zusätzlich wurden auch erhöhte Expressionen von *ehcp-a4*, *ehcp-a7* und *ehcp-b8* gefunden. Außerdem fällt auf, dass die Kontrolle A1_pNC im Vergleich zu den untransfizierten Klonen A1 und B2 eine stark erniedrigte CP-Aktivität aufweist. Die genauen Gründe hierfür sind unbekannt. Eine mögliche Erklärung wäre ein Einfluss der Transfektion oder des Selektionsagens G418 auf die Prozessierung der Cysteinpeptidasen von der Proform zum aktiven maturen Enzym. Zumindest findet keine Hemmung auf Transkriptionsebene statt, da die Expression der *cp*-Gene bei der Kontrolle A1_pNC mit der des untransfizierten Klons A1 übereinstimmt. Ein weiteres Indiz sind die verstärkten Aktivitäten der EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A4 und EhCP-A7 bei den A1_CP-A5 Transfektanten. Die EhCP-A5 steht schon länger unter dem Verdacht andere CPs zu prozessieren und somit von der inaktiven in die aktive Form zu überführen (Tillack *et al.*, 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass wenn die EhCP-A5 in größeren Mengen vorliegt, sie andere etwaige Hemmfaktoren außer Kraft setzen oder ausgleichen kann und somit alle CPs prozessiert und aktiv werden können.

Bei A1_pNC-CPA4 wurde eine Bande bei ca. 29 kDa sichtbar, welche der Aktivität der EhCP-A4 zugeordnet wurde. Bei A1_pNC-CPA6 und A1_pNC-CPB8 sind keine Banden sichtbar was nach der Messung der CP-Gesamtaktivität zu erwarten war. Da sie auf Zymogrammen noch nie beschrieben wurden ist nicht bekannt auf welcher Höhe sie zu erwarten wären. Eine mögliche Erklärung ist eine trotz Überexpression immer noch zu geringe und daher nicht detektierbare Proteinmenge oder eine Hemmung der Translation. Letzteres ist aber eher unwahrscheinlich, da die Voraussetzungen für alle Transfektanten gleich sind und eine Hemmung der Translation bei den anderen nicht zu beobachten ist.

4.4.2 Einfluss einzelner Cysteinpeptidasen auf die ALA-Bildung bei *Mus musculus*

Um den Einfluss der erhöhten Menge einzelner Cysteinpeptidasen auf die Pathogenität des nicht virulenten Klons A1 von *E. histolytica* zu überprüfen, wurden die CP-Transfektanten im Mausmodell getestet (siehe Abb. 3.7).

Für die EhCP-A1 und -A2 konnten die Ergebnisse vorheriger Studien im Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*)-Modell bestätigt werden, welche besagen, dass sie keine Rolle bei der ALA-Bildung spielen (Hellberg *et al.*, 2001; Tillack *et al.*, 2006). Der ALA ist jedoch nur das Symptom der extra-intestinalen Erkrankung welche von *E. histolytica* ausgelöst werden kann. Die bei der intestinalen Erkrankung ausgelöste Amöbenkolitis kann in einem anderen Tiermodell untersucht werden, bei welchem Mäusen Trophozoiten in den Blinddarm (Caecum) injiziert werden (Haupt *et al.*, 2002) Es konnte gezeigt werden, dass *ehcp-a1* bei Trophozoiten isoliert aus dem Blinddarm 2fach stärker exprimiert wird als bei axenisch kultivierten Amöben (Gilchrist *et al.*, 2006). Somit lässt sich nicht ausschließen, dass die EhCP-A1 und eventuell auch die EhCP-A2 eine Rolle bei der intestinalen Amöbiasis spielen.

Auch die Expression der Gene *ehcp-a4* und *ehcp-a6* wird im Kolitis-Tiermodell hochreguliert (Gilchrist *et al.*, 2006). Für beide konnte in dieser Arbeit keine Korrelation mit der ALA-Bildung festgestellt werden. Die EhCP-A4 ist in cytoplasmatischen Vesikeln und der Kernregion lokalisiert und wird sezerniert. Durch ihre Inhibition wird die Parasitenlast und Entzündungsreaktion im Kolitismodell signifikant reduziert. Es wird angenommen, dass sie das Überleben im Wirt bei der Kolonisation und Invasion sichert (He *et al.*, 2010). Somit ist es möglich, dass sie auch in der Leber für das Überleben der Trophozoiten mitverantwortlich ist, was aber keine gleichzeitige Induktion der ALA-Bildung bedeuten muss. Zusätzlich ist sie, wie auch die EhCP-A1, in der Lage IgA, IgG und pro-IL-18 zu degradieren, was der Evasion vom Immunsystem zuträglich ist und Entzündungsreaktionen verstärken kann (He *et al.*, 2010; Melendez-Lopes *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 1989).

Ein signifikantes Ergebnis wurde bei A1_pNC-CPB8 erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der *ehcp-b8* den apathogenen Klon A1 dazu befähigt Amöbenleberabszesse zu bilden und er somit einen pathogenen Phänotyp aufweist. Zur Absicherung der Daten sollten in weiterführenden Studien getestet werden ob durch die Transfektion eventuell noch andere Pathogenitätsfaktoren wie die Amoebapores stärker exprimiert werden. Die EhCP-B8 verfügt über einen GPI-Anker, was eine Lokalisation an der Oberfläche wahrscheinlich macht. Die Tatsache, dass asymptomatische Patienten mit Amöbenbefall Antikör-

per gegen diese CP aufweisen unterstützt diese Annahme. Dies könnte zur Folge haben das bei Menschen welche Antikörper gegen die EhCP-B8 aufweisen, die zur Invasion befähigten Amöben abgefangen werden und sich dadurch keine Symptomatik wie eine Amöbenkolitis oder ein ALA entwickeln kann. Außerdem deutet es darauf hin, dass die EhCP-B8 von den Amöben bei der Besiedlung oder Invasion des Darms benötigt wird. Um hier genauere Erkenntnisse zu erlangen sind weitere Versuche und eine genaue Charakterisierung der EhCP-B8 erforderlich. Um die Beteiligung der EhCP-B8 bei der Besiedlung oder Invasion des Darms näher zu beleuchten würde sich das oben erwähnte Amöbenkolitismodell anbieten.

Werden, wie im Fall A1_pNB-CPA5, mehrere Cysteinpeptidasen in größeren Mengen synthetisiert, erhält man ebenfalls ein einen pathogenen Phänotyp für den Klon A1. Dies bestätigt Ergebnisse vorangegangener Studien (Tillack *et al.*, 2006) und erhärtet weiterhin den Verdacht, dass die EhCP-A5 einen entscheidenden Faktor bei der Pathogenität von *E. histolytica* darstellt und an der Aktivierung anderer CPs beteiligt ist. Auch die Tatsache, dass durch die Überexpression der EhCP-A5 in AmoebaporeA-defizienten Trophozoiten, welche kleinere Abszesse erzeugen als Wildtypamöben (Zhang *et al.*, 2004) ALAs normaler Größe induziert werden konnten (Dissertation Tillack, 2008) und durch eine *antisense*-Inhibierung von *ehcp-a5* die ALA-Bildung unterbunden wurde untermauert diese Vermutung (Ankri *et al.*, 1999a). Da in dieser Arbeit aber auch andere Peptidasegene verstärkt exprimiert wurden, lässt sich keine abschließende Aussage darüber treffen ob die EhCP-A5 allein verantwortlich ist da sie die anderen CPs aktiviert oder ob es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Cysteinpeptidasen handelt.

Worüber allerdings eine Aussage getroffen kann ist die Korrelation der reinen Gesamtmenge an aktiven Cysteinpeptidasen mit der Abszessgröße. Wie in Abb. 3.10 gezeigt, kann kein Zusammenhang zwischen der spezifischen CP-Aktivität der Klone und den von ihnen verursachten Abszessen gefunden werden. Besonders deutlich wird dies beim apathogenen Klon B1 welcher die höchste CP-Aktivität aller Klone aufweist und beim hoch pathogenen Klon B5, welcher starke Abszesse induziert bei dem aber nur eine niedrige CP-Aktivität zu beobachten ist. Zusammen genommen mit dem Ergebnis zur Pathogenitätssteigerung allein durch die gesteigerte Expression der *ehcp-b8*, aber auch wohl durch ein Zusammenspiel der EhCP-A5 mit anderen CPs, lässt sich die Aussage treffen dass wahrscheinlich nicht die Gesamtmenge der CPs für die ALA-Bildung entscheidend ist, sondern ein sehr viel komplexeres System aus einzelnen CPs den Unterschied macht. Besonders Interessant wäre es die Transkriptome der

Klone und evtl. noch der A1_pNC-CPB8-Transfektante während der Leberabszessbildung zu untersuchen. Hierfür wurde in den letzten Monaten in der Laborgruppe von PD Dr. Hannelore Lotter eine Methode etabliert, mit der es möglich ist Trophozoiten direkt aus der Leber der Mäuse zu isolieren. Mit Hilfe dieser Technik ist es angedacht, das Transkriptom von Amöben die direkt aus der Leber isoliert wurden zu ermitteln.

4.5 Auswertung und Validierung des Membranoberflächenproteoms von *E. histolytica*

Die Identifikation von Oberflächenproteinen auf der Plasmamembran und auch mit der Plasmamembran assoziierten Proteinen ist von großer Bedeutung für das Verständnis von Wirt-Parasit-Interaktionen. Oberflächenproteine von *E. histolytica* wie das Gal/GalNAcLektin oder die EhCP-A5 werden mit der Adhärenz ans Mucin des Wirts und der Zerstörung von Wirtsgewebe und -zellen in Verbindung gebracht. In vorausgegangenen Studien (Dissertation Biller, 2009) wurde zum ersten Mal das Membranoberflächenproteom von *E. histolytica* beschrieben. Zur Identifizierung der Membranoberflächenproteine wurde die Technik der Oberflächenbiotinylierung eingesetzt. Dieses beinhaltet die Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin, die anschließende Lyse der Zellen und die Bindung der markierten Proteine an eine Avidin-haltige Säule. Bei der Biotinylierung ist es wichtig, dass die Zellen keine Phagozytose mehr betreiben, durch die das Biotin in die Zelle gelangen und an intrazelluläre Proteine in Vesikeln binden könnte. Vor der Elution der Oberflächenproteine werden Waschschrte angewandt um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Dies ist ein sehr entscheidender Teil des Experiments. Wendet man zu starke oder aggressive Waschrte an läuft man Gefahr gebundene Oberflächenproteine von der Säule zu lösen, sind sie allerdings zu schwach behält man auch Proteine in der Probe welche an Membranproteine assoziiert vorliegen. Insgesamt wurden 765 Proteine identifiziert von denen 55 klassische Transmembrandomänen und 88 ein Signalpeptid oder Signalanker aufweisen. Circa ein Drittel der gefundenen Proteine wurden durch bioinformatische Datenbanken als nicht klassisch sezerniert eingestuft. Dies bedeutet eine ER/Golgi unabhängige Sekretion. Lösliche sekretorische Proteine enthalten typischerweise N-terminale Signalpeptide welche sie zum ER führen woraufhin sie durch vesikulären Transport über den Golgi zur Zelloberfläche gelangen. Entlassen werden sekretorische Proteine durch die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran. Interleukin-1 β und Galektin 1 waren die ersten Proteine bei denen nachgewiesen wurde das sie aus Zellen sezerniert wurden welches kein funktionelles ER/Golgi-System aufweisen (Cooper *et al.*, 1990; Rubartelli *et al.*, 1990). Es wurde gezeigt das nicht-konventionelle Proteinsekretion Energie- und Tempera-

turabhängig und durch diverse Faktoren stimulier- und hemmbar ist (Cleves, 1990; Hughes, 1999). Ein Beispiel ER/Golgi-unabhängige Sezernierung sind extrazelluläre Thioredoxine (Sahaf und Rosen, 2000; Rubartelli und Sitia, 1991; Rubartelli *et al.*, 1995). Bei der Identifizierung der Membranoberflächenproteine wurden sieben Thioredoxine gefunden, von denen sechs Signalpeptide aufweisen somit über den klassischen Weg sezerniert werden, und eins für welches der nicht klassische Weg vorausgesagt wurde. Es wurden außerdem Proteine gefunden von welchen bekannt ist, dass sie an der Membran lokalisiert sind. Dazu gehören die Clathrine, welche als integrale Membranproteine von *E. histolytica* beschrieben sind, welche an der Pinozytose der Zelle beteiligt sind (de Chassey, 2001). Detektiert wurde ebenfalls die EhCP-A5 für die eine Lokalisation an der Zelloberfläche nachgewiesen wurde (Jakobs *et al.*, 1995). Und auch die nachgewiesenen Copine gelten als membranbindende Proteine und werden bei *Dictyostelium* in der Plasmamembran und intrazellulären Vakuolen lokalisiert (Damer *et al.*, 2005). Zusätzlich wurden relativ viele ribosomale bzw. mit der ER-Membran assoziierte Proteine gefunden. Ribosomen weisen gewöhnlich eine cytoplasmatische Lokalisation auf. Allerdings konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die ER-Membran während der Phagozytose mit der Zellmembran fusionieren und einen Teil der Phagosomenmembran liefern kann. Nach der Phagozytose findet ein *recycling* und somit Wiederverwerten von Teilen der Phagosomenmembran in der Plasmamembran statt. Somit ist es möglich, dass ribosomale Proteine, während dieses Vorgangs mit der ER-Membran verbunden bleiben, und dadurch nachgewiesen werden (Okada *et al.*, 2005; Desjardins, 2003; Gagnon *et al.*, 2002). Es wurden aber auch Proteine gefunden denen keine Membranassoziation zugeordnet werden kann. Dazu gehören die EhCP-A1 und -A2 und eine *alcoholdehydrogenase*. Außerdem wurde in der Kategorie Metabolismus für 36 der 88 dort eingeordneten Proteine eine cytoplasmatische Lokalisation vorausgesagt. Die Funktion der meisten gefundenen Proteine ist unbekannt, und zusätzlich kann nicht immer ohne weiteres von der Funktion und dem Aufbau eines Proteins auf seine Lokalisation geschlossen werden. Es kann zusätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Membranoberfläche auch Organellen biotinyliert wurden, oder durch nicht ausreichendes waschen mit Membranproteinen assoziierte Proteine mit analysiert wurden. Zu überprüfen wäre auch, ob das Biotin über die Plasmamembran in die Zelle gelangen kann und so cytoplasmatische Proteine markiert werden könnten.

Um die Biotinylierung intrazellulärer Organellen auszuschließen und die erhaltenen Daten zu validieren wurden Proteine ausgewählt bei denen keine Oberflächenlokalisierung erwartet wurde. Zum Nachweis der Proteine wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Auf der

einen Seite die Überexpression von Genen, welche für cMyc-Fusionsproteine kodieren, die mit Hilfe eines α -cMyc-Antikörpers detektiert und lokalisiert werden sollten. Auf der anderen Seite die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen rekombinante Proteine mit welchen im Anschluss die Detektion und Lokalisation in Klon A1 und Klon B2 passieren sollte.

4.5.1 Lokalisation ausgewählter putativer Membranoberflächenproteine als cMyc-Fusionsproteine

Nach der Transfektion der Überexpressionskonstrukte in die Klone A1 und B2 konnten in der Westernblot-Analyse Signale für insgesamt sieben Fusionsproteine detektiert werden. In den Westernblot-Analysen der Klon A1 Transfektanten trat in den meisten Membranfraktionen eine unspezifische Bande auf der Höhe von 15 kDa auf. Bei Klon B2 konnte diese nicht beobachtet werden. Eine Kreuzreaktion des monoklonalen cMyc-Antikörpers mit einem anderen *E. histolytica* Protein ist unwahrscheinlich da BLAST-Analysen mit der cMyc-Sequenz nur drei Proteine ermittelt haben welche diese Sequenz beinhalten und alle drei waren größer als 15 kDa. Die Tatsache, dass die unspezifische Bande nicht in den Extrakten aller Klon A1 Transfektanten detektiert wurde spricht ebenfalls gegen eine Kreuzreaktion. Untransfizierte Zellen von Klon A1 und Klon B2, sowohl permeabilisiert als auch nicht permeabilisiert, weisen nach der Inkubation mit dem cMyc-Antikörper und anschließender Reaktion mit *antimouse* ALEXA Fluor 488 keine Fluoreszenz auf. Somit bindet der monoklonale cMyc-Antikörper nicht unspezifisch an oder in der Zelle. Daher konnte die Herkunft der unspezifischen Bande nicht geklärt werden. Das Fusionsprotein Grainin1-cMyc konnte in der Westernblot-Analyse sowohl in Klon A1 als auch in Klon B2 detektiert werden. Wie bereits in einer früheren 2D-Dige-Analyse festgestellt wurde es bei Klon A1 in größeren Mengen in der löslichen Proteinfraction detektiert und bei Klon B2 in der Membranfraktion (Biller *et al.*, 2009).

Für alle Fusionsproteine konnte sowohl eine intrazelluläre als auch Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden und somit die von Frau Dr. Laura Biller (2009) in den vorausgegangenen Studien erhaltenen Ergebnisse für die hier getesteten Proteine bestätigt werden. Im Fall der permeabilisierten Zellen konnte immer eine cytosolische Lokalisation zusammen mit klaren Signalen um Vesikel und den Zellkern beobachtet werden. Dies lässt für alle Fusionsproteine auf eine Assoziation mit Organellmembranen schließen. Da bei allen Fusionsproteinen Signale an der Oberfläche detektiert werden konnten ist es unwahrscheinlich, dass sie über die Phagozytose aufgenommenes Biotin markiert wurden. Bei den Oberflächenfärbungen traten teilweise ungewöhnliche Phänotypen auf. Im Fall der *alcoholdehydrogenase*-cMyc zieht die Färbung von verschiedenen Stellen oder von einer Stelle aus in die Zelle hinein und

man erkennt Färbungen um Vakuolen und den Kern. Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich um kaputte Zellen handelt, da in diesem Fall die ganze Zelle angefärbt wäre. Außerdem wurde dieser Phänotyp dafür zu zahlreich beobachtet. Es liegt die Vermutung nah, dass das detektierte Fusionsprotein an der Oberfläche und in Vakuolen lokalisiert ist welche mit der Membran verschmelzen. Auch ist eine Lokalisation in der ER-Membran, welche besonders in der Kernregion in die Außenmembran integriert ist möglich. Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine *alcoholdehydrogenase* als membrangebundenes Enzym nachgewiesen (Tassin *et al.*, 1973). Bei B2_pNCEhmaldehyd-cMyc wirkt es bei den nicht permeabilisierten Zellen sogar so als wäre die ganze Zelle angefärbt. Auch dieser Phänotyp konnte so oft beobachtet werden das nicht intakte Zellen als Grund ausgeschlossen wurden. Auch hier wieder eine Färbung um den Kern zu erkennen, was wieder auf eine Fusion von intrazellulären Membranen mit der Außenmembran hinweist. In der Literatur wird die *malatedehydrogenase* meist als cytosolisches oder im Mitochondrium lokalisiertes Protein beschrieben. Im Mitochondrium ist es beteiligt an einem Malat/Aspartat-Transport durch die Mitochondrienmembran (Minarik *et al.*, 2002). In Schweinenierenzellen (LLC-PK₁) konnte eine *malatedehydrogenase* mit der Plasmamembran assoziiert nachgewiesen werden (Hanss *et al.*, 2008). Bei Thioredoxin tritt neben der cytosolischen Färbung eine fleckenartige Färbung an wenigen Stellen der Plasmamembran auf. Bei *E. coli*-Zellen wurde Thioredoxin durch immunologische Detektion ebenfalls im Cytoplasma und mit der inneren Membran assoziiert gefunden (Bayer *et al.*, 1987). In menschlichen Zellen bindet sezerniertes Thioredoxin an die äußere Zellmembran wo es den Zell-Zell-Kontakt reguliert und an der Redoxregulation des extrazellulären Raumes beteiligt ist (Sahaf *et al.*, 1997; Stathakis *et al.*, 1997). Auch das *clathrin-adaptor-complex*-cMyc Fusionsprotein wurde nur in wenigen kleinen Bereichen an der Oberfläche lokalisiert und intrazellulär, abgesehen von der cytosolischen Färbung, klar um Vesikel herum und den Zellkern. Clathrin findet man hauptsächlich als Mantel um Vesikel. Bei *Dicystostelium* findet man es auch in über die Zelle verteilten punktartigen *Loci*. Diese Strukturen sind sehr beweglich und befähigt zu schnellem Transport durch die Zelle (Damer und O'Halloran, 2000). Rho-GTPasen werden als cytosolische Proteine synthetisiert, können aber durch posttranslationale Modifikationen mit der Membran assoziiert sein (Clarke, 1992). *V-type ATPases* sind wichtige Enzyme welche mit vielen Membranen und Organellen assoziiert sind z.B. auch bei *Saccharomyces cerevisiae*, wo eine Verbindung zwischen den *V-type ATPases* und der Sezernierung festgestellt wurde (Nelson *et al.*, 1999). All diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei den getesteten Proteinen um membranassoziiert-

te Proteine handelt, welche unterschiedliche Funktionen in der Zelle und an der Zellmembran abdecken. Gerade bei Kandidaten die in anderen Zellsystemen einen Zell-Zell Kontakt vermitteln können, wie das Thioredoxin, sollten in weiterführenden Studien als potentielle Pathogenitätsfaktoren mit einbezogen werden.

4.5.2 Lokalisation ausgewählter potentieller Membranoberflächenproteine mit Hilfe polyklonaler Antikörper

Bei allen getesteten Proteinen konnte ein spezifisches Signal in der Membranfraktion beobachtet werden, was eine Membranassoziation bestätigt. Im Fall des α -rEhKinase liegt das erhaltene Signal bei 140 kDa, erwartet wurde es bei 28 kDa. Dies lässt auf die Detektion eines Pentamers, also eines Proteinkomplexes schließen, was unter reduzierenden Bedingungen eigentlich nicht möglich sein sollte. Gründe hierfür können das nicht ausreichende Erhitzen der Probe oder die Verwendung von oxidiertem und somit nicht mehr funktionalem DTT sein. In sehr seltenen Fällen können auch SDS-resistente Komplexe auftreten.

Da über die hier untersuchten Proteine wenig bis gar nichts über ihre Funktion und Lokalisation sowohl bei *E. histolytica* als auch bei anderen Organismen bekannt ist können in diesem Zusammenhang keine Vergleiche gezogen werden. Bei allen in der Immunfluoreszenz eingesetzten Antikörpern bei denen Signale detektiert wurden lassen die angefärbten Strukturen auf eine Membranassoziation schließen. Es wurden sehr interessante Färbungen beobachtet. Im Fall von α -rEhKinase konnte bei Klon A1 kein Signal detektiert werden während bei Klon B2 in der Zelle Vesikel gefärbt sind die, wie es scheint mit der Membran fusionieren, da bei nicht permeabilisierten Zellen diverse kreisförmige Färbungen an der Oberfläche zu beobachten sind. Dies könnte eine Erklärung sein, warum auch Proteine biotinyliert werden die nicht mit der Außenmembran assoziiert sind sondern in Vesikeln transportiert werden. *E. histolytica* weist einen so enormen Membranumsatz auf das somit ständig neue Vesikel mit der Membran fusionieren und von der Außenmembran gebildet werden. Ein weiteres Beispiel hierfür sind die durch α -rEhDnaJ erhaltenen Signale. Klon A1 und Klon B2 weisen hier intrazellulär den gleichen Phänotyp auf. Es ist ein angefärbtes Vesikel zu erkennen. An der Oberfläche sind allerdings unterschiedliche Signale zu sehen. Hier sind bei Klon A1 viele kleine Punktlokalisationen zu erkennen während bei Klon B2 wieder eine klare Fusion eines Vesikels mit der Außenmembran zu beobachten ist. Festzuhalten ist das auch in diesem Ansatz eine Membranassoziation der untersuchten Proteine belegt worden ist. Für zukünftige Studien wäre es interessant herauszufinden was genau von diesen Vesikel, welche mit der Plasmamembran fusionieren, sezerniert wird. Ein Vergleich zwischen dem apathogenen Klon A1

und dem pathogenen Klon B2 auf Sekretomebene kann zur Aufklärung der Gründe für die Unterschiede in der Virulenz beitragen.

5 Literaturverzeichnis

- Adl**, S.M., Simpson, A. et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot. Microbiol.* **52**(5): 399-451
- Ali**, I. K., Zaki, M. und Clark, C. G. (2005) Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica* *J Clin Microbiol.* **43**:5842-5847.
- Ankri**, S., T. Stolarsky, et al. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol Microbiol* **28**(4): 777-785.
- Ankri**, S., Bracha, R., Padilla-Vaca, F. und Mirelmann, D. (1999a) Applying antisense technology to the study of *Entamoeba histolytica* pathogenesis: response. *Trends Microbiol.* **7**: 473-474.
- Ankri**, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F., and Mirelman, D. (1999b). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect.Immun.* **67**, 421-422.
- Bär**, A. (2011) Expressionsprofil der Cysteinpeptidasen von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903) während der Leberabszessbildung im experimentellen Mausmodell.
- Bayer**, M.E., Bayer, M.H., Lunn, C.A., Pigiet, V. (1987) Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*. *J Bac.* **169**(6): 2659-2666
- Bhattacharya**, D., Haque, R. und Singh, U. (2005) Coding and noncoding genomic regions of *Entamoeba histolytica* have significantly different rates of sequence polymorphisms: implications for epidemiological studies. *J Clin. Microbiol.* **43**(9): 4815-4819
- Bracha**, R. and D. Mirelman (1984). Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J Exp Med* **160**(2): 353-368.
- Bracha**, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M. und Mirelmann, D. (1999) Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol.* **34**: 463-472.
- Bracha**, R., Y. Nuchamowitz, et al. (2003). Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell* **2**(2): 295-305.

- Biller** (2009) Identifizierung der Pathogenitätsfaktoren von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN) mittels vergleichender Transkriptom-Analysen, Proteom-Analysen und Phänotypisierung.
- Biller**, L., Schmidt, H., Krause, E., Gelhaus, C., Matthiesen, J., Handal, G., Lotter, H., Jansen, O., Tannich, E. und Bruchhaus, I. (2009) Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics* **9**: 4107-4120
- Biller**, L., Davis, P.H., Tillack, M., Matthiese, J., Lotter, H., Stanley, S.L., Jr., Tannich, E., Bruchhaus, I. (2010) Differences in the transcriptome signatures of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *BMC Genomics*. **11**:63
- Blessmann**, J., Ali, I.K., Nu, P.A., Dinh, B.T., Viet, T.Q., Van, A.L., et al. (2003) Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. *J Clin Microbiol.***41**:4745-4750
- Bredeston**, L.M., Caffaro, C.E., Samuelson, J. und Hirschberg, C.B. (2005) Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*. **280**:32168-32176.
- Bruchhaus**, I., Jacobs, T., Denat, M. und Tannich, E. (1996) Pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase of *Entamoeba histolytica*: molecular cloning, recombinant expression and inhibition by pyrophosphate analogues. *Biochem. J* **316**: 57-63
- Bruchhaus**, I., Loftus, B.J., Hall, N. und Tannich, E. (2003) The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell*. **2**: 501-509.
- Beck**, D.L., Boettner, D.R., Dargulev, B. Ready, K., Nozaki, T. und Petrie, W.A., Jr. (2005). Identification and geneexpression analyses of a large family of transmembrane kinases related Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*. **4**: 722-732.
- Clark**, C. G., U. C. Alsmark *et al.* (2007). Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv Parasitol* **65**: 51-190.
- Clarke**, S. (1992) Protein isoprenylation and methylation at carboxylterminal cystein residues. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 355-386

- Diamond**, L.S. und Clark, C.G. (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903) separating it from *Entamoeba dispar*. Brumpt, 1925 *J Euk. Microbiol.* **40**(3): 340-344
- Cleves**, A.E. (1997) Protein transports: the nonclassical ins and outs. *Curr Biol.* **7**:318-320
- Clos**, J. and S. Brandau (1994). pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* **5**: 133-137.
- Cooper**, D.N. und Barondes, S.H. (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* **110**: 1681-1691
- Davis**, P.H., Zhang, X., Guo, J., Townsend, R.R. und Stanley, S.L., Jr. (2006) Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol.* **61**: 1523-1532.
- Davis**, P.H., Schulze, J. und Stanley, S.L., Jr. (2007) Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol.* **151**: 118-128.
- Desjardins**, M. (2003) ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol.* **3**: 280-291.
- Damer**, C.K., Bayeva, M., Hahn, E.S., Rivera, J. und Socec, C.I. (2005) Copine A, a calcium-dependent membrane-binding protein, transiently localizes to the plasma membrane and intracellular vacuoles in *Dictyostelium*. *BMC Cell Biology* **6**: 46
- Damer**, C.K. und O'Halloran, T.J. (2000) Spatially regulated recruitment of Clathrin to the plasma membrane during capping and cell translocation. *Mol Biol Cell* **11**: 2151-2159
- Diamond**, L. S., D. R. Harlow, et al. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**: 431-432.
- De Chasse**y, B., Dubois, A., Lefkir, Y., Letournour, F. (2001) Identification of clathrin-adaptor medium chains in *Dictyostelium discoideum*: differential expression during development. *Gene.* **262**:115-122.

- Ehrenkauf**, G.M., Haque, R., Hackney, J.A., Eichinger, D.J. und Singh, U. (2007) Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a Protozoan parasite. *Cell Microbiol.* **9**: 1426-1444.
- Gadasi**, H. and E. Kessler (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **39**: 528-531.
- Gagnon**, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., *et al* (2002) Endoplasmic retikulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell.* **110**:119-131.
- Gilchrist**, C.A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., *et al* (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol.* **147**: 163-176.
- Gilchrist**, C.A., Petri, W.A., Jr. (2008) Using differential gene expression to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Transient Parasitol.* **25** (3): 124-131
- Ghosh**, S., Frisardi, M., Ramirez-Avila, L. *et al* (2000) Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol.* **38**: 3815-3821
- Goll**, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiol Rev.* **83**: 731-801.
- Hamann**, L., R. Nickel, *et al.* (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8975-8979.
- Houpt**, E.R., Glemmbocki, D.J., Obrig, D.G. *et al* (2002) The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol.* **169**(8): 4496-4503
- Hanss**, B., Leal-Pinto, E., Teixeira, A., Tran, B. *et al* (2008) Localisation of the nucleic acid channel regulatory subunit cytosolic malate dehydrogenase. *J Mem. Biol.* **226**: 1-8
- He**, C., Nora, G.B., Schneider, E.L., Kerr, I.D., Hansell, E.E., Hirata, K., Gonzalez, D. *et al.* (2010) A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amoebiasis and a therapeutic target. *J Biol Chem.* **285** (24): 18516-18527.

- Hellberg**, A., Leippe, M. und Bruchhaus, I. (2000) Two major 'higher molecular mass proteinases' of *Entamoeba histolytica* are identified as cysteine proteinases 1 and 2. *Mol Biochem Parasitol.* **105**: 305-309.
- Hellberg**, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E., and 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.
- Horstmann**, R.D., Leippe, M. und Tannich, E. (1992) Host tissue destruction by *Entamoeba histolytica*: molecules mediating adhesion, cytolysis, and proteolysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **87 Suppl 5**: 57-60.
- Hughes**, R.C. (1999) secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochem Biophys Acta.* **1473**: 172-185
- Irmer**, H., M. Tillack, *et al.* (2009). *Entamoeba histolytica* cysteine peptidases are involved in rosetting and digestion of erythrocytes but not in phagocytosis. *Mol Microbiol.* **72**: 658-667
- Jacobs**, T. und Leippe, M. (1995) Purification and molecular cloning of a major antibacterial protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* with lysozyme-like properties. *Eur J Biochem.* **231**: 831-838.
- Jacobs**, T., I. Bruchhaus, *et al.* (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **27**(2): 269-76.
- Joyce**, M.P. and Ravdin, J.I. (1988) Antigens of *Entamoeba histolytica* recognized by immune sera from liver abscess patients. *M J Trop Med Hyg.* **38**: 74-80.
- Karas**, M. und Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 Daltons. *Anal Chem.* **60**: 2299-2301.
- Keene**, W. E., M. E. Hidalgo *et al.* (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol* **71**: 199-206.
- Keene**, W. E., Petitt, M. G., Allen, S., and McKerrow, J. H. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J.Exp.Med.* **163**, 536-549.

- Knobloch**, J. and Mannweiler, E. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **32**, 727-732.
- Laemmli**, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leippe**, M., J. Andra et al. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* **14**: 895-904.
- Leippe**, M., H. J. Sievertsen, et al. (1995). Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* **111**: 569-574.
- Loftus**, B., I. Anderson et al. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**: 865-868.
- Lorenzi**, H.A., Puiu, D., Miller, J.R., Binkac, L.M., Amedeo, P., Hall, N., Caler, E.V. (2010) New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl. Trop. Dis* **4**, e716.
- Luaces**, A. L. and A. J. Barrett (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* **250**: 903-909.
- Lushbaugh**, W. B., A. F. Hofbauer, et al. (1985). "Entamoeba histolytica: purification of cathepsin B." *Exp Parasitol* **59**: 328-36.
- MacFarlane**, R.C. und Singh, U. (2006) Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amoebic pathogenesis. *Infect Immun.* **74**: 340-351.
- Mai**, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., and Samuelson, J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2198-2205.
- Marien**, D (2008) Expression der Peptidasen und weiterer putativer Pathogenitätsfaktoren von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903) während der Leberabszessbildung von *Meriones unguiculatus*

- Marino, G., Uria, J.A., Puente, X.S., Quesada, V., Bordallo, J. and Lopez-Otin, C. (2003)** Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem.* **278**: 3671-3678.
- Marino, G. and Lopez-Otin, C. (2004)** Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci.* **61**: 1439-1454.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, et al. (1997).** Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**: 67-85.
- Matthiesen (2009)** Charakterisierung putativer EhAIG-Proteine und Aufbau eines Protein-Markierungssystems bei *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903)
- Miguel, N., Lustig, G., Twu, O., Johnson, P.T. et al (2010)** Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol. Cell. Prot.* **9.7**: 1554-1567
- Minaric, P., Tomakova, N., Kollarovaz, M., und Antalik, M. (2002)** Malate dehydrogenases structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.* **21**: 257-265
- Nelson, N., Perzov, N., Cohen, A., Hagai, K., Padler, V. und Nelson, H. (2000)** The cellular biology of proton-motif force generation by V-ATPases. *J Exp. Biol.* **203**: 89-95
- Nowak, N. (2005)** Einschluss der Cysteinpeptidasen auf die Pathogenität von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN; 1903)
- Okada, M., Hoston, C.D., Mann, B.J., Petri, W.A., Jr., Kita, K. und Nozaki, T. (2005)** Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell.* **4**: 827-831.
- Olivas-Garcia, A., Tello, E., Nequiz-Avendano, M., Gonzalez-Canto, A., Lopez-Vancell, R., Garcia de Leon, M.C., et al (2004)** Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology.* **129**: 19-25.
- Petri, W., Jr. (1996).** Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *J Investig Med* **44**: 24-36.
- Que, X., Brinin, L.S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B.E., et al (2002)** Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **119**: 23-32.

- Reed**, S.L., Keene, W.E., McKerrow, J.H. and Gigli, I. (1989) Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* **143**: 189-195
- Robotelli**, A., Cozzolino, F., Talio, M. und Sitia, R. (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* **9**: 1503-1510
- Robotelli**, A. und Sitia, R. (1991) Interleukin 1 β and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion. *Biochem Soc Trans.* **19**: 255-259
- Robotelli**, A., Bonifazi, N. und Sitia, R. (1995) High rates of thioredoxin secretion correlate with growth arrest in hepatoma cells. *Cancer Res.* **55**: 675-680
- Rigothier**, M. C., H. Khun, et al. (2002). Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun* **70**: 3208-3215.
- Sambrook**, J. und Gething, M.J. (1989) Proteine structure. Chaperones, paperones. *Nature.* **342**: 224.225.
- Sambrook**, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.
- Sahaf**, B., Soderberg, A., Spyrou, G. *et al* (1997) Thioredoxin expression and localisation in human cell lines: detection of full-length and truncated species. *Exp. Cell. Res.* **236**: 181-192
- Scholze**, H. and E. Tannich (1994). Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol* **244**: 512-523.
- Schulte**, W. and Scholze, H. (1989). Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J. Protozool.* **36**, 538-543.
- Shah**, P.H., MacFarlane, R.C., Bhattacharya, D., Matese, J.C., Demeter, J., Stoup, S.E. und Singh, U. (2005) Comparative genomic hybridisations of *Entamoeba* strains reveal unique genetic fingerprints that correlate with virulence. *Eukaryot. Cell* **4**(3): 404-515
- Sonnhammer**, E.L.L., von Heijne, G., Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 175-182.
- Sprang**, S.R. (1997). G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annu Rev biochem* **66**: 639-678.

- Stanley, S. L., Jr.** (2003). Amoebiasis. *Lancet* **361**: 1025-1034.
- Stanley, S.L., Jr., Zhang, T., Rubin, D. und Li, E.** (1995) Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amoebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect Immun.* **63**: 1587-1590.
- Stanley, S. L., Jr., H. Huizenga et al.** (1992). Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **50**: 127-138.
- Stathakis, P., Fitzgerald, M., Matthias, L.J., Chesterman, C.N. und Hugg, B.J.** (1997) Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. *J Bio Chem.* **272**(33): 20641-20645
- Strachan, W. D., Chiodini, P. L., Spice, W. M., Moody, A. H., and Ackers, J. P.** (1988). Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* **1**, 561-563..
- Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J., and Arnold, H. H.** (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**: 5118-5122.
- Tassin, J._P., Celier, C. et al** (1973) Purification and properties of a membrane-bound alcohol dehydrogenase involved in oxidation of long-chain hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa*. *BBA* **315**(2): 220-232
- Tillack, M., N. Nowak, et al.** (2006). Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **149**: 58-64.
- Tillack** (2009) Identifizierung, Genexpressionsanalyse und funktionelle Charakterisierung von Peptidasen von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903)
- Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M.A., Tannich, E., Bruchhaus, I.** (2007) The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics.* **8**: 170.
- Tovar, J., Fischer, A. und Clark, C.G.** (1999) The mitosome, a novel organell related to mitochondria in the amitochondrial parasites *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* **32**: 1013-1021.

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

Zhang, Z., Wang, L., Seydel, K.B., Li, E., Ankri, S., Mirelmann, D. und Stanley, S.L., Jr. (2000) Entamoeba histolytica cysteine proteinases with interleukin -1 β converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol*. **37**: 542-548.

6 Anhang

Tab. 6.1: PCR-Oligonukleotide für die Klonierung in den pJC45-Vektor

Accession-Nr.	Sequenz (5'→3')	sense (s)/ anti-sense (as)	Eingefügte Restriktions-schnittstellen
XM_644108	GGCATATGGGTCTTTCTTTAAGTTCTG	s	<i>NdeI</i>
XM_644108	GGGGATCCTTAATTTAAATATCCTAATTCT	as	<i>BamHI</i>
XM_648397	GGCATATGAGAAGTAATGGAAATGAAGG	s	<i>NdeI</i>
XM_648397	GGGGATCCTTACATCTTATAACCATCATTAG	as	<i>BamHI</i>
AF262400	GGCATATGATTTTTGGAAGGACTGGAGG	s	<i>NdeI</i>
AF262400	GGGGATCCTTAGTTTTGATATCTGGGAG	as	<i>BamHI</i>
XM_651634	GGCATATGGCTGTACTTCATATTAACG	s	<i>NdeI</i>
XM_651634	GGGGATCCTTATGCTGTTTCAACCATTG	as	<i>BamHI</i>
XM_647328	GGCATATGGGAGAAGAAGCACCAG	s	<i>NdeI</i>
XM_647328	GGGGATCCTTAAAGTGCCTTTCTTCTTG	as	<i>BamHI</i>
XM_651958	GGCATATGTCTGCTGGTCTTGCCTTTG	s	<i>NdeI</i>
XM_651958	GGGGATCCTTATCTAACACATGAAACCCAT	as	<i>BamHI</i>
XM_645280	GGCATATGTCTTTGTTTGCTATTCAAG	s	<i>NdeI</i>
XM_645280	GGGGATCCTTAAGCGTCATCCATCAACA	as	<i>BamHI</i>
XM_647942	GGAAGCTTATGAATTCAATACCAAACCT	s	<i>HindIII</i>
XM_647942	GGGGATCCCTATTGGCATATTTTCG	as	<i>BamHI</i>
AF291721	GGCATATGCAACCACCTGTAGCT	s	<i>NdeI</i>
AF291721	GGGGATCCTTATCCAAGAGGGGAAGT	as	<i>BamHI</i>
XM_648051	GGCATATGAGAATTGCTACCAAAG	s	<i>NdeI</i>
XM_648051	GGGGATCCTTATTCAGCTTTTTTCATTTCTG	as	<i>BamHI</i>
XM_646950	GGCATATGTCACACAGAAAGTTG	s	<i>NdeI</i>
XM_646950	GGGGATCCTTAAAATTGATTTTTAG-TATTTTTG	as	<i>BamHI</i>

Tab. 6.2: PCR-Oligonukleotide für die Amplifikation der Gene der putativen Membranoberflächen-Proteine für die Klonierung in den pNCmyc-Vektor

Accession-Nr	Sequenz (5'→3')	sense (s)/ anti-sense (as)	Eingefügte Restriktions-schnittstellen
XM_651158	GGGGTACCATGATCAAGTTCTTATTGGTTG	s	<i>KpnI</i>
XM_651158	GGGGATCCTCGTTTTTCTAAGTCTG	as	<i>BamHI</i>
XM_650063	GGGGTACCATGATGAATAATTACATACA	s	<i>KpnI</i>
XM_650063	GGGGATCCGAAATCAAACATAGCGTCTG	as	<i>BamHI</i>
XM_651634	GGGGTACCATGGCTGTACTTCATATTAACG	s	<i>KpnI</i>

XM_651634	GGGGATCCTGCTGTTTCAACCATTTG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
XM_649396	GGGGTACCATGCTTGCATTTTCTGATATG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
XM_649396	GGGGATCCTTGTA AAAAGGCATTTTG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
XM_650258	GGGGTACCATGGAAGGAGGAGAAGATG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
XM_650258	GGGGATCCATTGGCAATATCCAAATA	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
XM_643978	GGGGTACCATGAAAAATTTACATACT	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
XM_643978	GGGGATCCGTAAATATCATTAAAGATAG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
XM_645763	GGGGTACCATGAATACTGGTTTAG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
XM_645763	GGGGATCCTTCGTGAACATTGGAATG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
XM_645280	GGGGTACCATGTCTTTGTTTGCTATTCAAG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
XM_645280	GGGGATCCAGCGTCATCCATCAACATCA	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
XM_649277	GGGGTACCATGAGTACCTCTCAAGAA	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
XM_649277	GGGGATCCATCTCTCCAGTCATTCTCT	<i>as</i>	<i>BamHI</i>

Tab. 6.3: PCR-Oligonukleotide für die Klonierung der *ehcp*-Gene in den pNC-Vektor

Amplifikat	Sequenz (5'→3')	<i>sense (s)/ anti-sense (as)</i>	Eingefügte Restriktions-schnittstellen
<i>ehcp-a6</i>	GGGGTACCATGTTTGGTTTACTCTTTG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
<i>ehcp-a6</i>	GGGGATCCTTATTTCTTACTTCAGTAACACCAG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
<i>ehcp-a7</i>	GGGGTACCATGATTGTATTGATTTATTTG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
<i>ehcp-a7</i>	GGGGATCCGATTA AACTATTCATTTAAAG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
<i>ehcp-b8</i>	GGGGTACCATGATATTCTTTGTTAT	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
<i>ehcp-b8</i>	GGGGATCCTCAAATAAGAAGAACAATCAAAG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>
<i>ehcp-c13</i>	GGGGTACCATGGAAACTGGTCTTCTTGG	<i>s</i>	<i>KpnI</i>
<i>ehcp-c13</i>	GGGGATCCTCATT CAGTGAATCTCTTTTG	<i>as</i>	<i>BamHI</i>

Tab. 6.4: Oligonukleotide für die quantitative *Real-Time* PCR

Accession-Nr.	<i>sense (s)/ anti-sense (as)</i>	Sequenz (5'→3')
10.m00319 (<i>β-actin</i>)	<i>s</i>	TTAACTGAAAGAGGATATGCT
10.m00319	<i>as</i>	TTCACTGCTTGATGCAGCTTTTTG
Test der Klone A1, B2, B8 und B9 auf zwischen Zelllinie A und B differentiell exprimierte Gene		
XM_648456	<i>s</i>	GGTTATCCACCACAACCAAT
XM_648456	<i>as</i>	CCATAGGACCTGACATTCTC
XM_644469	<i>s</i>	AATGAACCAACGAGTATTGA

XM_644469	<i>as</i>	TGCTAGATCAGCTGAAGGAA
XM_643681	<i>s</i>	TGCTAGATCAGCTGAAGGAA
XM_643681	<i>as</i>	AATTGCACCAGCAACAATAA
XM_647137	<i>s</i>	CGTGATTATCAAGTGTGCGTTC
XM_647137	<i>as</i>	GCTTCAACATCAATCCAGTCTT
XM_648869	<i>s</i>	TTGTTGTTGCAGCTCAAGATTT
XM_648869	<i>as</i>	TGGGGAAGACCAAACATCAC
XM_648725	<i>s</i>	CCTCAAGCTGTGTTAGAAGAATC
XM_648725	<i>as</i>	TGACCTAGAGTTATCTTGTCCTG
XM_645223	<i>s</i>	TGGTCTTGCTAGTGGTGCTA
XM_645223	<i>as</i>	CAGGTGCTGTGATAAGTGGA
XM_643009	<i>s</i>	TTGTGGACCAAGACCAACTAA
XM_643009	<i>as</i>	CCATGGTCCTTCTGATGATG
XM_647540	<i>s</i>	ATTGCTGTCATTCCTGTGTG
XM_647540	<i>as</i>	TCACGAACTTCTTCTGCTTG
XM_647747	<i>s</i>	GTGCTTATGGACCAGGGTGT
XM_647747	<i>as</i>	CAACCCATCTTCCTTCTGGA
XM_646110	<i>s</i>	CCGTGGTAGTGAATTGTTGTC
XM_646110	<i>as</i>	AACATTAGCACCATTGAGGAA
XM_650207	<i>s</i>	GGACGTTTTTCCAGGTGAAG
XM_650207	<i>as</i>	GACCTGGGAAACCATTCAAA
XM_651358	<i>s</i>	CTCACGAGCACTCAATGGAA
XM_651358	<i>as</i>	TTCCTTACACCATTGACGA
XM_645291	<i>s</i>	CATTCAACCAGCAATTGAAGT
XM_645291	<i>as</i>	TGATGATTCAAGTTATCCGACT
XM_649962	<i>s</i>	GCAGATCTTAATTGGTGCTTCAA
XM_649962	<i>as</i>	CTACCACCAGCCTCACCAAG
Validierung differentielle Oberflächenmembran-Proteine auf Transkriptomebene		
XM_646100	<i>s</i>	GACAGAGCAGCAGAGGCATA
XM_646100	<i>as</i>	TGGATGTGCTCCTTTTGACA
XM_649407	<i>s</i>	CAACAACCAGGTGCTTACCC
XM_649407	<i>as</i>	TCCTCCTTGTGGTGGATAGC
XM_651659	<i>s</i>	TGTATTGGAGTAGGAGATGG
XM_651659	<i>as</i>	ACAGCAAATGCAATGTCAGG
XM_648268	<i>s</i>	GGCTTCATGAAAGTGAAGAAGG
XM_648268	<i>as</i>	TACCCAAGGAAATTGGCAAC
XM_648660	<i>s</i>	GATGGCAAATGAAGTTACGG

XM_648660	<i>as</i>	CCATCCTCAGGGATTTTTCC
XM_649716	<i>s</i>	TTCAAAGGATGGGATCAACG
XM_649716	<i>as</i>	GAACGGTCTACCCAATCAGG
AB054588	<i>s</i>	TTTTGATGCAATAGAACGATGG
AB054588	<i>as</i>	CAAATTCAGTCCCATCTGAGG
XM_649396	<i>s</i>	TGTTTCGAGAAAAGGCTGAGG
XM_649396	<i>as</i>	TTACCAACAGCACCATCACC
XM_001914588	<i>s</i>	TTATTCCAGAATTACTGAGACG
XM_001914588	<i>as</i>	TTATCACATCTTTCATCTGG
XM_651390	<i>s</i>	GAAATATTGTTTCATTGGGATGC
XM_651390	<i>as</i>	GCACTACATGGTGCTGATCG
XM_648905	<i>s</i>	GGACCAGCTTTAGACCTTACTCC
XM_648905	<i>as</i>	TGTGTGGACTTGTTGTTGAGG
XM_643978	<i>s</i>	TGGGGTGCTCATATGATTGG
XM_643978	<i>as</i>	TTGCGTTCCTTTCTTTGTGG
XM_648678	<i>s</i>	TTCTTTCAAATCCACTTCATGC
XM_648678	<i>as</i>	TCCTCCAGTGGTTAACATTCC
XM_646213	<i>s</i>	GATGATTGCGATTGTGAAGG
XM_646213	<i>as</i>	TTGTTGTGGACATTCTTGTGG
XM_645887	<i>s</i>	GGAATGGCTGAAATAATTGG
XM_645887	<i>as</i>	CTCCAACGCTCCACAAACC
XM_001913522	<i>s</i>	GCAGATCGTGATTCTTTTGAGG
XM_001913522	<i>as</i>	GGATTAACACGATCAAAATAGC
XM_644377	<i>s</i>	CTTTACATTGGCGTCCTTCC
XM_644377	<i>as</i>	AATGATTGAGGCGATAGTAGG
XM_649351	<i>s</i>	GCTCTTCAATTAGATTCAACTCC
XM_649351	<i>as</i>	AATCCACTGATTCAGATAATCC
XM_651526	<i>s</i>	GGAGCAAATTCAGTGATGTTACC
XM_651526	<i>as</i>	TGGATGTGCTGCATGACC
XM_651122	<i>s</i>	GAAAAAGCAGGATGGGAACA
XM_651122	<i>as</i>	AACCATTGATGTGCTCGAA
XM_647680	<i>s</i>	CTTCTGCTGCTCAAGATGGA
XM_647680	<i>as</i>	GCCAAATTAGCGTCAGCTTC
XM_649999	<i>s</i>	TCAACTATGGAAACAACAAGG
XM_649999	<i>as</i>	AATGCACGTTACATTGTCC
XM_649901	<i>s</i>	AAGACACTGGTGTTCTTGTTC
XM_649901	<i>as</i>	GGTCAAACGACCCATCACC
XM_644371	<i>s</i>	TTCTTTCTATTGACCTTGAACC

XM_644371	<i>as</i>	TCTTCCACCAAAAACAAGTCG
Überexpression Cysteinpeptidasen		
XM_645064	<i>s</i>	TGCATCATCTGTTCAATTCC
XM_645064	<i>as</i>	CAACACCATATCCAACAGCA
XM_645550	<i>s</i>	ATCCAAGCACCAGAATCAGT
XM_645550	<i>as</i>	TTCCTTCAAGAGCTGCAAGT
XM_651510	<i>s</i>	CAGAAGGACCAGTTGCTGTT
XM_651510	<i>as</i>	TATCCTACAGCGGCAACAC
XM_645845	<i>s</i>	CCAGAATCTGTTGATTGGAGA
XM_645845	<i>as</i>	GCAACCAACAATCTTCCTTC
XM_652272	<i>s</i>	TTGCTATTGATGCAGGTCAA
XM_652272	<i>as</i>	GATCCATATCCAACAGCACA
XM_643904	<i>s</i>	ATTGCAGCACTTGAAGGAAG
XM_643904	<i>as</i>	AATCCTCCTCCACATCCATT
XM_645957	<i>s</i>	TATGCAGCATCAACAGCAAAC
XM_645957	<i>as</i>	CTATCCATCGTTGGGCTGTAA
XM_651464	<i>s</i>	TGGATAAAGCCGTTCAAGATG
XM_651464	<i>as</i>	TGCCCAACATGTTCTCTATT

Tab. 6.5: Verwendete Oligonukleotide der SNP-Analysen

Accession-Nr / DS Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Sets für SNPs im kodierenden Bereich		
XM_649480	<i>s</i>	ATATCTCCTAAAGATTCACATGC
XM_649480	<i>as</i>	TAATCATTTAGAAGTAAAATTCTCGG
XM_649480	Sensor	TCCAATAGTTTTTAAACAAGGACACAT-6fam
XM_649480	Anker	BMN5-GCTAATGAACATGAAACAAGTGATGTAGGTAATGT-Spacer3
XM_646600	<i>s</i>	TCCAATCCAACCAATGGG
XM_646600	<i>as</i>	TCTTAACATTGGATCTAACATAATTTGAC
XM_646600	Sensor	BMN5-AATTCATGGATGAATAGTCGTGTTT- Spacer3
XM_646600	Anker	ATCAGCACTTTGTCTTTGGAATTTAGTTCCATCAT-6fam
XM_644808	<i>s</i>	CAGATTGAGAGATTGAACATTG
XM_644808	<i>as</i>	TCCTATGCATTTAACTCATGACC
XM_644808	Sensor	ATGAACTTGGATGAAGAGAAATACAAA-6fam
XM_644808	Anker	BMN5-ACTTGTAGTCTTGAAGATTCAAATGATTCCCAACA-Spacer3
XM_647593	<i>s</i>	GTATCAACTTTCTTTCCATTTAATAAGG
XM_647593	<i>as</i>	ACTTATAAATTTGAAGGAATGAAGAAAC

XM_647593	Sensor	ATTTTCTCTATTTCTTCTGCTTGTTCTA-6fam
XM_647593	Anker	BMN5-TGACTCTGCTTCATCAATAATTCTAGTACCATTAAAT- Spacer3
XM_649141	<i>s</i>	TAATGGTGTATATCCAATATCTCCTG
XM_649141	<i>as</i>	AATTAAGTGGAGCAATGGG
XM_649141	Sensor	TCACTTACTGGATGTGGTCTT- 6fam
XM_649141	Anker	BMN5-GTTCAACTCTAACATATAATTGTGCTGTTTCCTTTTCTT- Spacer3
XM_646946	<i>s</i>	TCATTAGGATGTATTTCATAGAGACC
XM_646946	<i>as</i>	TGGAACACCAACAAGCA
XM_646946	Sensor	CTGATTATGTTGCACCAGA-6fam
XM_646946	Anker	BMN5-GTTATTAATGAAAGGTTATATTCTACTGTAAGCGAT- Spacer3
XM_647062	<i>s</i>	GTTTCTCAACAACATTTGGCT
XM_647062	<i>as</i>	CAACTAATAAAGGTAAAATACTTCCAG
XM_647062	Sensor	TTTACAACACATTGCATGTATTTTTT-6fam
XM_647062	Anker	BMN5-AAGACAATCAATTTACACACTAATATGGATGTAT- Spacer3
XM_001914342	<i>s</i>	ATTTTTACACATTTCAAATGCTCC
XM_001914342	<i>as</i>	GTCAAATTGAAGAAATTACTATTCCATC
XM_001914342	Sensor	BMN5-TTTCTTTAATCCCTTCATGTAATGTAATATTT- Spacer3
XM_001914342	Anker	ATTTTTTCTATTTGTCCACAATATTTTATAAATCCTTTTGGT- 6fam
XM_644810	<i>s</i>	ATCTATTGAAGGTGAATTTGGTC
XM_644810	<i>as</i>	TCTTCATCAACTATTCCTTTTAATAAGTCT
XM_644810	Sensor	BMN5-CATTGACTTCGGCAGATAAATTAATAA- Spacer3
XM_644810	Anker	GAGTCTAATGATCCTTCTTTTTTACAAGAACAAGGT- 6fam
XM_001914354	<i>s</i>	TTAATTGTTTTGGTCAGTGTGATATTC
XM_001914354	<i>as</i>	TGTTGGAATAGTAATTGATTGTATTGA
XM_001914354	Sensor	CATAAAAACACTTATTTTCTATTTCACTA- 6fam
XM_001914354	Anker	BMN5-CACTTGTTGAAATATTAATTGTTGTTAATGATGTACAT- Spacer3
Sets für SNPs im nicht kodierenden Bereich		
DS571292	<i>s</i>	ATTGAAGTGGTGTATATTCATCATC
DS571292	<i>as</i>	GAGACTTGTTTATCAGGTATTGG
DS571292	Sensor	BMN5-ATTTTCACTCAGACTTTTTGAATAAAGAGAAA- Spacer3
DS571292	Anker	AAGAAATTGACAGCAGTTAATTCAGAAGTTAATTTT- 6fam
DS571496 (1)	<i>s</i>	GGGAAAGTATAGAATGAAATTTCAATTTG
DS571496 (1)	<i>as</i>	GTTATTGTTAATAATAAAGTCTACTTATCC
DS571496 (1)	Sensor	TTCATTTCTTTTGTATATCCTTTATTTCTTT- 6fam
DS571496 (1)	Anker	BMN5-TCTTTTTTCTTTAATCCTTGCTTTAGCTCTCTCCT- Spacer3
DS571496 (2)	<i>s</i>	TATGAATCAAAAGGGAAAGTATAGAATG

DS571496 (2)	<i>as</i>	AGTCTACTTATCCATAATCAATAAACG
DS571496 (2)	Sensor	TTCATTTCTTTTGTTTATACTCTTATTTCTTT-6fam
DS571496 (2)	Anker	BMN5-TCTTTTTTCTTTAATCCTTGCTTTAGCTCTCTCCT-Spacer3
DS571243	<i>s</i>	TGGATGTGTAAGTATGTTTCTCCTA
DS571243	<i>as</i>	ATAAGTATGACGATTTTCTCAGC
DS571243	Sensor	ACCTTTTAACCCAAATTTTTTTTACTTTAA-6fam
DS571243	Anker	BMN5-AAGGCACAAGTCAGGTTGAAATAATTCTGGTATAGT-Spacer3

Tab. 6.6: Verwendete Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

Bezeichnung	Vektor	Sequenz (5'→3')
<i>pJC45 forward</i>	pJC45	GGATAACAATTCCCCTCTAG
<i>M13F</i>	TOPO	GTAAAACGACGGCCAG
<i>M13R</i>	TOPO	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>I239-S-Neo</i>	pNC	GAATTAGTCTCAACTCAACAATGTTTGTGG

Tab. 6.7: Auflistung der gefundenen SNPs zwischen Klon A1 und Klon B2

Contig	Position	Klon A1	Klon B2	Accession-Nr.	Genname
Kodierende Bereiche					
DS571595	7892	G ₆₀ T ₁₃	G ₅₈	EHI_001630	<i>tyrosine_kinase,_putative</i>
DS571195	27339	G ₆₂ A ₁₃	G ₇₇	EHI_004855	<i>hypothetical_protein,_conserved</i>
DS571178	17490	C ₉₀ T ₂₈	C ₇₇	EHI_007640	<i>hypothetical_protein,_conserved</i>
DS571148	20161	A ₁₀₇ C ₁	A ₅₂	EHI_011850	<i>hypothetical_protein</i>
DS571148	35380	C ₄₈ A ₁	C ₅₅	EHI_011940	<i>dolichyl-diphosphooligosaccharide— protein_glycosyltransferase_ subunit_STT3A,_putative</i>
DS571148	87893	A ₄₀	A ₅ C ₅	EHI_012270	<i>Gal/GalNAc_lectin_heavy_subunit</i>
DS571351	3458	C ₁₅ A ₄	C ₂₀	EHI_019070	<i>hypothetical_protein</i>
DS571721	1926	A ₆₀ C ₂₄	A ₂₄ C ₁₀	EHI_022490	<i>AIG_family_protein</i>

DS571721	1981	C ₁₁₀	C ₂₅ A ₉	EHI_022490	<i>AIG_family_protein</i>
DS571721	1986	G ₉₄	G ₂₅ T ₆	EHI_022490	<i>AIG_family_protein</i>
DS571153	53823	C ₁₅₂	C ₉₇ T ₁₁	EHI_023010	<i>protein_kinase_putative</i>
DS571153	53828	G ₁₆₄	G ₁₀₈ T ₁₂	EHI_023010	<i>protein_kinase_putative</i>
DS571153	83973	T ₂₈	T ₂₄ C ₁₈	EHI_023160	<i>hypothetical_protein</i>
DS571215	48808	T ₁₆₅	T ₄₅ G ₁₈	EHI_027730	<i>WD_repeat_protein</i>
DS571215	60280	A ₉₈ T ₂₃	A ₈₄	EHI_027790	<i>hypothetical_protein</i>
DS571208	42240	A ₉₁	A ₄₁ T ₁₂	EHI_030840	<i>casein_kinase_II_regulatory_subunit_family_protein</i>
DS571580	6599	T ₈₁ G ₁₁	T ₆₉	EHI_032470	<i>hypothetical_protein</i>
DS571391	9017	G ₁₂₅ A ₃₉	G ₉₃ A ₃₆	EHI_034560	<i>deoxyuridine_5'-triphosphate_nucleotidohydrolase_domain_containing_protein</i>
DS571174	62915	G ₈₃	G ₃₈ T ₁₀	EHI_035650	<i>ribose-phosphate_pyrophosphokinase_putative</i>
DS571616	97	C ₇₇₃ T ₂₇	C ₅₄₇	EHI_041580	<i>hypothetical_protein_conserved</i>
DS571616	99	T ₇₅₉ C ₂₉	T ₅₃₅	EHI_041580	<i>hypothetical_protein_conserved</i>
DS571616	181	G ₅₀₅ C ₉₃	G ₃₄₇	EHI_041580	<i>hypothetical_protein_conserved</i>
DS571616	442	A ₄₄₂ G ₈₉	A ₃₁₆	EHI_041580	<i>hypothetical_protein_conserved</i>
DS571616	126	T ₉₂₃ C ₂₆	T ₅₆₂	EHI_041580	<i>hypothetical_protein_conserved</i>
DS571292	34585	A ₁₀₄ G ₄₆	A ₁₁₉	EHI_043020	<i>protein_kinase_domain_containing_protein</i>
DS571147	83764	T ₄₇ C ₁₇	T ₆₃	EHI_045030	<i>trans-2,3-enoyl-CoA_reductase_putative</i>
DS571743	4073	G ₁₄₇	G ₁₄₆	EHI_046150	<i>hypothetical_protein</i>

		A ₃₄			
DS571743	4083	C ₁₅₂ T ₃₁	C ₁₂₈	EHI_046150	<i>hypothetical_protein</i>
DS571613	5983	T ₂₉ G ₁₈	T ₂₈	EHI_047520	<i>hypothetical_protein</i>
DS571613	5984	T ₂₉ C ₁₈	T ₂₇	EHI_047520	<i>hypothetical_protein</i>
DS571341	28684	G ₇₅ T ₁₈	G ₆₈	EHI_047820	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571152	49574	A ₁₂₅	A ₈₁ T ₂₀	EHI_049500	<i>SAC3/GANP_family_protein</i>
DS571245	15806	A ₁₁₃	A ₁₆ G ₆₃	EHI_052770	<i>glycosyl_hydrolase_family_31_protein</i>
DS571225	46910	C ₁₉₄	C ₁₀₇ T ₂₂	EHI_054830	<i>Plasma_membrane_calcium-transporting_ATPase, putative</i>
DS571322	15288	C ₅₄ T ₅₂	C ₈₀	EHI_055710	<i>protein_kinase, putative</i>
DS571234	35854	A ₈₄	A ₂₄ T ₃₁	EHI_059870	<i>hypothetical_protein</i>
DS571413	9997	A ₈ C ₁₀	A ₁₄	EHI_060990	<i>HEAT_repeat_domain_containing_protein</i>
DS571192	59796	A ₁₁₃	A ₃₄ T ₁₈	EHI_065790	<i>Rab_family_GTPase</i>
DS571803	2576	T ₈₇ C ₁₂	T ₁₀₂	EHI_066620	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571803	2592	A ₉₂ T ₁₄	A ₁₀₃	EHI_066620	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571150	45029	G ₄₃	G ₃₁ A ₅	EHI_067990	<i>hydrolase, carbon-nitrogen_family</i>
DS571164	58280	C ₁₄₅ T ₂₄	C ₁₀₉	EHI_069290	<i>protein_kinase_domain_containing_protein</i>
DS571457	12801	T ₃₄ C ₁₃	T ₁₂	EHI_072510	<i>hypothetical_protein</i>
DS571557	5961	A ₄₁ T ₇	A ₃₀	EHI_072740	<i>hypothetical_protein</i>
DS571557	9584	T ₄₃	T ₄₄ C ₉	EHI_072850	<i>AIG1_family_protein, putative</i>
DS571557	9782	T ₃₄	T ₅₄	EHI_072850	<i>AIG1_family_protein, putative</i>

		C ₁₁			
DS571557	9578	G ₃₉ A ₇	G ₅₃	EHI_072850	<i>AIG1_family_protein, putative</i>
DS571557	9597	T ₃₈ G ₈	T ₅₉	EHI_072850	<i>AIG1_family_protein, putative</i>
DS571544	4193	T ₃₂ A ₅	T ₃₈	EHI_073060	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571171	79129	C ₄₀ G ₁₁	C ₄₄	EHI_073630	<i>serine-threonine- isoleucine_rich_protein, putative</i>
DS571634	3195	C ₈₆ A ₁₉	C ₈₀	EHI_076370	<i>hypothetical_protein</i>
DS571634	3167	T ₈₄ C ₄₃	T ₆₈	EHI_076370	<i>hypothetical_protein</i>
DS571258	2097	T ₅₀ C ₂₆	T ₃₁	EHI_078540	<i>hypothetical_protein</i>
DS571226	1682	A ₉ G ₂₉	A ₁ G ₅₄	EHI_079710	<i>hypothetical_protein, pseudogene</i>
DS571275	6527	C ₁₃₅	C ₆₇ T ₂₁	EHI_081250	<i>importin_beta-3_family_protein</i>
DS571211	7483	A ₁₀₉	A ₄₇ T ₁₈	EHI_084660	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS572050	1288	A ₆₃ T ₁₄	A ₄₉	EHI_089670	<i>AIG1_family_protein</i>
DS572050	1258	T ₉₄ C ₂₂	T ₅₆	EHI_089670	<i>AIG1_family_protein</i>
DS571155	29905	C ₁₀₄	T ₄₇	EHI_092200	<i>hypothetical_protein</i>
DS571169	73664	A ₁₁₆	A ₅₄ T ₁₄	EHI_098440	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571299	10794	C ₂₅₂ G ₄₁	C ₁₈₉	EHI_099700	<i>NAD(FAD)- dependent_dehydrogenase, putative</i>
DS571434	15636	C ₈₉	C ₄₅ G ₁₁	EHI_102600	<i>AIG1_family_protein</i>
DS571158	2392	G ₂₀	G ₁₉ A ₃	EHI_103240	<i>protein_kinase_domain_containing_protein</i>
DS571403	6221	C ₉₅	C ₄₅ A ₁₃	EHI_105800	<i>protein_kinase_domain_containing_protein</i>
DS571236	51933	C ₂₉ T ₁₅	C ₂₇	EHI_106360	<i>hypothetical_protein</i>

DS571205	43639	C ₂₁	C ₁₅ T ₄	EHI_107190	<i>hypothetical_protein</i>
DS571548	5799	T ₃₆ C ₇	T ₄₀	EHI_107540	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571548	6231	G ₅₄	G ₁₇ A ₄	EHI_107540	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571333	11038	G ₂₀₈	G ₇₉ A ₆	EHI_109220	<i>proteoglycan-4_precursor, putative</i>
DS571378	10648	A ₁₄₃	A ₆₁ T ₂₈	EHI_113950	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571700	1539	C ₃₄	C ₄₇ T ₆₉	EHI_115500	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571183	6474	C ₉₁ T ₂₉	C ₈₅	EHI_117820	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571183	46020	G ₈₉	G ₅₅ A ₂₃	EHI_118070	<i>hypothetical_protein</i>
DS571180	3263	C ₆ A ₁₄	C ₂₀	EHI_118400	<i>hypothetical_protein</i>
DS571267	36132	A ₂₄	A ₁₈ C ₃	EHI_119310	<i>hypothetical_protein, conserved_domain_containing</i>
DS571281	4143	C ₁₁₀ T ₉₃	C ₁₈₉	EHI_122710	<i>hypothetical_protein, conserved</i>
DS571433	1804	T ₂₇₈	T ₃₈ C ₁₀	EHI_123820	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571433	1748	A ₂₃₆	A ₂₆ C ₁₄	EHI_123820	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571433	2593	C ₅₈	C ₁₃ T ₅	EHI_123820	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571435	11014	C ₂₉₈ A ₂₄	C ₁₂₅	EHI_125020	<i>hypothetical_protein</i>
DS571166	6630	C ₇₅ T ₁₇	C ₅₆	EHI_126900	<i>hypothetical_protein</i>
DS571519	6422	G ₂₇	G ₃₀ A ₅	EHI_132860	<i>DNA_polymerase, putative</i>
DS571730	4056	G ₁₄	G ₁₀ A ₉	EHI_134140	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571203	35136	C ₁₃₅	C ₆₁ T ₁₁	EHI_135080	<i>histone_H3, putative</i>

DS571287	1258	A ₂₈₄ G ₄₈	A ₂₄₃	EHI_136940	<i>AIG1_family_protein</i>
DS571287	1259	T ₂₇₄ C ₄₆	T ₂₃₇	EHI_136940	<i>AIG1_family_protein</i>
DS571241	5843	C ₁₀₂	C ₄₉ T ₁₂	EHI_138180	<i>hypothetical_protein</i>
DS571241	21168	A ₁₈ G ₄	A ₁₁	EHI_138370	<i>hypothetical_protein,_conserved</i>
DS571241	23085	C ₂₂₀	C ₁₀₄ T ₁₂	EHI_138380	<i>glycogen_phosphorylase,_putative</i>
DS571241	43625	A ₇₈	A ₄₆ T ₁₂	EHI_138510	<i>hypothetical_protein</i>
DS571260	28012	A ₂₆	A ₁₈ T ₁₀	EHI_138970	<i>hypothetical_protein</i>
DS571161	44398	C ₂₉₅	C ₂₄₉ G ₁₉	EHI_141830	<i>RNA_modification_enzymes,_MiaB-family</i>
DS571161	71911	T ₅₄	T ₄₅ C ₇	EHI_141950	<i>hypothetical_protein</i>
DS571146	101042	G ₁₀₄ T ₃₁	G ₈₉	EHI_148550	<i>protein_tyrosine_kinase_domain-containing_protein</i>
DS571145	19426	C ₁₃₇	C ₁₂₂ T ₁₁	EHI_151250	<i>hypothetical_protein,_conserved</i>
DS571476	10489	T ₁₃₃ C ₂₇	T ₇₂	EHI_154760	<i>hypothetical_protein</i>
DS572478	288	T ₆₁	T ₄₂ C ₁₀	EHI_157360	<i>AIG1_family_protein,_putative</i>
DS572478	317	G ₇₇	G ₅₁ A ₁₃	EHI_157360	<i>AIG1_family_protein,_putative</i>
DS571485	8521	G ₁₀₄	G ₆₁ A ₁₁	EHI_160720	<i>exosome_complex_exonuclease,_putative</i>
DS571304	30191	C ₈₁	C ₅₁ T ₁₀	EHI_161970	<i>leucyl-tRNA_synthetase,_putative</i>
DS571246	2328	T ₈₆	T ₄₂ A ₈	EHI_163480	<i>90_kDa_heat_shock_protein,_putative</i>
DS571214	3489	G ₂₆₃	G ₉₂ T ₁₆	EHI_164190	<i>DNA_polymerase,_putative</i>
DS571214	3570	C ₂₈₆	C ₁₀₆ T ₁₃	EHI_164190	<i>DNA_polymerase,_putative</i>

DS571214	3623	G ₂₄₉	G ₈₂ A ₂₈	EHI_164190	<i>DNA_polymerase, putative</i>
DS571214	7079	A ₃₆₆	A ₁₅₉ G ₁₆	EHI_164300	<i>hypothetical protein</i>
DS571216	23097	C ₁₄₀ T ₂₅	C ₁₂₆	EHI_164810	<i>Adapter-related protein complex 3 (AP-3)_subunit, putative</i>
DS571217	43694	C ₁₄₀	C ₆₂ A ₁₅	EHI_165280	<i>hypothetical protein</i>
DS571219	52443	A ₈ T ₆	A ₁₁	EHI_169320	<i>phosphatidylinositol3-kinaseTor2, putative</i>
DS571189	48127	T ₁₂₃ A ₂₄	T ₈₉	EHI_174940	<i>nucleolar_GTP-binding_protein_1, putative</i>
DS571189	71347	C ₇₄ A ₆₅	C ₇₅	EHI_175110	<i>hypothetical protein</i>
DS571581	864	A ₅₅ G ₁₂	A ₂₂	EHI_176580	<i>AIG1_family_protein, putative</i>
DS571581	865	A ₅₅ G ₁₂	A ₂₁	EHI_176580	<i>AIG1_family_protein, putative</i>
DS571154	119600	T ₇₄	T ₄₁ A ₁₂	EHI_178970	<i>hypothetical protein</i>
DS571563	3617	T ₄₉	T ₂₈ C ₇	EHI_179700	<i>hypothetical protein</i>
DS571156	45940	A ₇₈	A ₄₁ G ₁₇	EHI_182760	<i>hypothetical protein</i>
DS571156	46022	T ₁₁₅ A ₁₀	T ₁₀₁	EHI_182760	<i>hypothetical protein</i>
DS571156	94542	G ₁₅₄	G ₇₄ A ₁₁	EHI_183060	<i>pantothenate_kinase_1, putative</i>
DS571156	107030	C ₁₀₅ G ₂₀	C ₁₀₈	EHI_183120	<i>centromeric_protein_E, putative</i>
DS571156	144397	C ₁₅	C ₁₀ A ₄	EHI_183260	<i>leucine-rich_repeat_containing_protein</i>
DS571364	17116	T ₂₅ C ₇	T ₂₇	EHI_191510	<i>leucine_rich_repeat_protein, BspA_family</i>
DS571538	6578	C ₂₃₀	C ₁₁₂ T ₁₄	EHI_193640	<i>hypothetical protein</i>
DS571599	3884	T ₁₀₀ A ₂₀	T ₄₄ A ₁₅	EHI_195250	<i>AIG1_family_protein</i>

DS571599	6138	A ₉ G ₇₄	A ₁₅ G ₄₆	EHI_195260	<i>AIG1_family_protein, putative</i>
DS571157	97475	G ₉₀	G ₅₁ A ₉	EHI_197300	<i>phospholipid-transporting_ATPase_Neol, putative</i>
DS571157	97478	C ₉₀	C ₅₃ T ₁₀	EHI_197300	<i>phospholipid-transporting_ATPase_Neol, putative</i>
DS571157	139143	A ₁₃₈	A ₂₀ T ₄₂	EHI_197510	<i>EF-hand_calcium-binding_domain_containing_protein</i>
DS571248	48932	T ₅₅	T ₁ C ₄₅	EHI_200840	<i>Signal_recognition_particle_receptor_alpha_subunit, putative</i>
Nicht-kodierende Bereiche					
DS571145	2561	C ₆₃ T ₁₂	C ₈₆		
DS571253	48719	C ₆₇ T ₈	C ₇₆		
DS571253	49558	T ₂ A ₂₁	T ₅ A ₁₂		
DS571298	4594	G ₂₄₀	G ₄₀ A ₃₄		
DS571258	25541	C ₂₂₂₀	C ₁₈₈₀ T ₄₃		
DS571191	9327	T ₆₆	T ₃₁ A ₅		
DS571261	47357	C ₈₁ T ₁₀	C ₆₆		
DS571148	133121	C ₂₇	C ₂₁ T ₅		
DS571150	42460	A ₉₉	A ₆₃ G ₂₉		
DS571200	25870	A ₃₁ T ₁₃	A ₃₃		
DS571201	39372	G ₂₁ A ₄	G ₁₅		
DS571152	89119	C ₅₀ A ₁₄	C ₄₉		

DS571202	51051	T ₁₃₀	T ₇₅ C ₈		
DS571292	23160	A ₅₃	G ₄₈		
DS571496	4410	A ₇ G ₅	A ₁₁		
DS571292	38388	A ₁₂₃ G ₁₇	A ₉₇		
DS571161	5077	C ₇₇	C ₅₉ A ₆		
DS571155	90793	G ₂₇₁₉ G ₁₀₄	G ₁₃₅₉		
DS571155	140183	C ₂₄ A ₄	C ₁₆		
DS571530	2251	T ₄₁₃	T ₂₀₇ C ₃₃		
DS571530	2253	A ₄₁₂ C ₂₆	A ₂₅₄		
DS571530	2373	C ₉₈₆ T ₂₅	C ₆₃₉		
DS571333	29386	G ₄₀₁ A ₂₂	G ₂₁₆		
DS571171	69029	A ₁₅	A ₂₀ T ₄		
DS571157	4445	C ₄₁₃₇ A ₄₈	C ₂₈₀₂		
DS571949	2226	A ₁ C ₃₅	A ₁₁ C ₂₄		
DS571366	8474	T ₁₇₄	T ₄₉ C ₁₂		
DS571368	22554	T ₇₃	T ₃₉ C ₄		
DS571369	15138	G ₂₁	G ₂₁ T ₆		
DS571496	4411	A ₆ G ₅	A ₁₁		
DS571161	11152	A ₆₄ T ₆	A ₅₉		

DS571562	8204	T ₉₁	T ₄₂ A ₁₅		
DS571395	3958	T ₃₁ C ₆	T ₂₃		
DS571401	13630	A ₃₉ C ₁₉₉	A ₉ C ₁₃₅		
DS571565	1197	G ₉₉	G ₇₇ T ₁₄		
DS571410	20855	C ₂₀₀₄ T ₃₇	C ₁₀₈₀		
DS571479	1072	A ₄₆₄ G ₂₀	A ₃₀₆		
DS571428	2993	T ₆ G ₅	T ₁₀		
DS571590	1671	A ₂₂ G ₁₁	A ₃₂		
DS571246	43718	A ₁₁₉₅	A ₇₇ C ₂₂₂		
DS572594	45	G ₅₈₂ T ₂₄	G ₂₄₂		
DS571467	10800	G ₇₄	G ₃₀ A ₁₀		
DS571743	2837	G ₈₀ T ₁₄	G ₅₃		
DS571502	3186	A ₁₉₅	A ₁₀₆ G ₃₈		
DS571457	15710	C ₇₈	C ₃₆ T ₇		
DS571769	1623	G ₉₅	G ₆₅ A ₁₂		
DS571479	1082	A ₃₃₄	A ₁₈₇ T ₃₀		
DS571192	71412	A ₃₄ C ₁₂	A ₇₅		
DS571479	1011	T ₆₂₅ A ₃₀	T ₄₁₇		
DS571658	2912	G ₄₀₀₇ A ₁₄₁	G ₂₆₉₈		

DS571520	1963	A ₂₄ G ₁₅	A ₂₉		
DS571202	51048	T ₁₂₅	T ₆₈ C ₈		
DS571483	12063	A ₁₅₁	A ₆₉ G ₁₈		
DS571298	16253	C ₃₀₁	C ₁₂₂ T ₁₄		
DS571479	995	A ₂₉₀ T ₃₉	A ₂₂₀		
DS571562	8205	T ₉₁	T ₄₃ A ₁₃		
DS571232	39477	G ₃₅	G ₁₆ A ₁₈		
DS572101	58	T ₁₈	T ₂₀ C ₇		
DS572019	1222	G ₅₁ A ₉	G ₇₀		
DS571243	37782	A ₇ G ₂₀	A ₂₆		
DS572095	469	T ₁₂₄ A ₁₅	T ₁₁₄		
DS572594	26	C ₄₆₉	C ₁₀₆ T ₃₁		
DS571378	24962	C ₆₇	C ₄₃ T ₁₀		
DS572073	94	T ₃₆₄ C ₈₆	T ₂₄₄		
DS571217	15916	T ₃₂ G ₆	T ₁₂		
DS572095	452	G ₁₂₂ A ₁₇	G ₁₁₁		
DS571261	47365	C ₁₀₇ T ₁₆	C ₈₁		
DS572594	28	G ₄₈₃	G ₁₀₇ A ₃₁		
DS572073	58	T ₅₁₂ G ₁₀₃	T ₄₃₂ G ₄₀		

DS572485	699	A ₉ G ₇₁	A ₂ G ₇₅		
DS571480	14938	G ₈₇ A ₁₃	G ₆₀		
DS572073	10	T ₁₈₅	T ₁₂₄ C ₂₂		
DS571658	2894	T ₅₉₅₂ A ₅₃	T ₃₈₉₈		
DS571658	2877	G ₄₇₂₅ A ₁₉₉	G ₂₉₉₆ T ₁₂₆		

Tab. 6.8: Liste der 765 Proteine welche mittels Nano-LC und anschließender MS/MS-Analyse aus Zelloberflächen-Protein-angereicherten Proben in *E. histolytica* Zelllinie A oder Zelllinie B gefunden wurden. Abkürzungen: SP = Signalpeptid (vorhergesagte Position an der das Signalpeptid abgespalten wird), SA = Signalanker, TMD = Transmembrandomäne (vorhergesagte Anzahl), N-K sez: als nicht klassisch sezerniert vorausgesagt, Myr: Myristoylierung. Voraussagen Lokalisation: Cyto = cytoplasmatisch, Mito = mitochondrial, ER = endoplasmatisches Retikulum, Nucl = Nucleus, GA = Golgi-Apparat. Weitere Voraussagen: LIM = enthält LIM-Domänen. Grau hinterlegt: Kategorien. Lila hinterlegt: differentiell in Zelllinie A gefunden. Pink hinterlegt: differentiell in Zelllinie B gefunden. Schrift hellblau: Im Rahmen dieser Arbeit zur Validierung und Lokalisierung ausgewählt.

Proteinname	Accession-Nr	SP/SA	TMD	N-K sez	Myr	Weitere Voraussagen
Vesikuläres Trafficking, Vesikel Bildung						
adaptor protein (AP) family protein	XP_649291	-	-	-	-	-
adaptor protein (AP) family protein	XP_001913524	-	-	-	-	-
Adapter-related protein complex 3	XP_001913940	-	-	-	-	-
ap-1 complex subunit mu-2	XP_648705	-	-	✓	-	Mito, Clathrin-adaptor
ap-2 complex subunit mu	XP_001913621	-	-	-	-	Clathrin adaptor
c2 domain protein	XP_654499	-	-	-	-	-
c2 domain containing protein	XP_655299	-	-	-	-	-
c2 domain containing protein	XP_656043	-	-	-	-	-
c2 domain containing protein	XP_648781	-	-	-	-	-
clathrin adaptor complex small chain	XP_649458	-	-	-	-	-
clathrin adaptor complex small chain	XP_657115	-	-	✓	-	Mito
clathrin adaptor complex small chain	XP_656250	-	-	✓	-	Mito
clathrin-adaptor medium chain	XP_654291	-	-	✓	-	-

clathrin heavy chain	AB261052.1	-	-	-	-	-
coatomer alpha subunit	XP_648580	-	-	-	-	Mito, WD40
coatomer beta subunit	XP_654513	-	-	-	-	-
coatomer beta subunit	XP_657557	-	-	-	-	-
coatomer complex subunit	XP_656797	-	-	✓	-	WD40
Coatomer gamma subunit	XP_654004	-	-	-	-	-
coatomer protein gamma subunit	XP_648199	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_651549	-	-	-	-	-
alpha2-COP	XP_656051	-	-	-	-	Mito, WD 40
zeta-COP	XP_654219	-	-	-	-	-
hypothetical protein (COPII-coated vesicle membrane protein P24)	XP_656857	15	1	-	-	-
cop9 signalosome complex subunit 1	XP_655155	-	-	✓	-	-
delta subunit	XP_655217	-	-	-	-	-
gamma subunit isoform 1	XP_650052	-	-	-	-	-
importin beta	XP_651571	-	-	✓	-	-
leucine rich repeat / protein phosphatase 2C domain containing protein	XP_650359	-	-	-	-	-
receptor mediated endocytosis protein	XP_653938	-	-	-	-	EF-hand-like Domäne
alpha-soluble NSF attachment protein	XP_651192	-	-	✓	-	Cytoplasmatische Vesikel Membran
protein transport protein Sec24	XP_647962	-	-	✓	-	-
v-SNARE protein VampF	gi 103484664,	-	1	✓	-	WD40
SNF7 family protein	XP_656010	-	-	-	-	-
vacuolar sorting protein VPS4	XP_654105	-	-	-	-	Endosom Membran
vacuolar sorting protein 26	XP_653057	-	-	✓	-	-
vacuolar sorting protein 26	XP_651148	-	-	-	-	-
vacuolar sorting protein 29	XP_652937	-	-	-	-	-
vacular protein sorting 33A	XP_649746	-	-	-	-	-
vacuolar protein sorting 35	XP_652967	-	-	-	-	-
vacuolar protein sorting 35	XP_656527	-	-	✓	-	-
vacuolar protein sorting-associated protein 45	XP_001913852,	-	-	-	-	-
chorein	XP_656773	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649367	-	-	✓	-	Mito, Vacuolar-membran

Stressantwort						
chaperonin 1 60 kDa	XP_656268	-	-	-	-	-
chaperonin containing TCP-1 delta subunit	XP_651775	-	-	-	-	-
chaperonin containing TCP-1 epsilon subunit	XP_655740	-	-	-	-	-
chaperonin-containing TCP-1, zeta subunit	XP_656288	-	-	✓	-	Mito
copine	XP_656751	-	-	✓	✓	-
copine	XP_649200	-	-	✓	✓	Mito
copine	XP_647967	-	-	-	✓	-
hypothetical protein	XP_655670	-	-	-	✓	-
hypothetical protein	XP_652587	-	-	✓	✓	-
defender against cell death protein	XP_653360	SA	3	✓	-	-
dnaJ family protein	XP_653489	15	-	-	-	ER
dnaJ family protein	XP_657430	-	-	-	-	-
dnaJ family protein	XP_652865	-	-	-	-	-
dnaJ homolog subfamily A member 1	XP_656707	20	-	-	-	-
Fe-S cluster assembly protein NifU	XP_655888	-	-	-	-	-
heat shock protein, Hsp20 family	XP_656495	-	-	✓	-	-
heat shock protein 70	XP_650833	-	-	-	-	-
heat shock protein 70	XP_650458	-	-	-	-	-
70 kDa heat shock protein	XP_654737	16	-	-	-	ER Zielsequenz KDEL
heat shock protein 70 family	XP_653218	14	-	-	-	ER Zielsequenz KDEL
heat shock protein 90	XP_653132	-	-	-	-	-
90 kDa heat shock protein	XP_649964	19	-	-	-	ER Zielsequenz KNEL
Hsc70-interacting protein	XP_650801	-	-	-	-	-
TPR repeat protein	XP_655642	-	-	-	-	-
putative iron hydrogenase HydA	AAG31036	-	-	-	-	-
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	XP_656494	-	-	-	-	-
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	XP_648283	15	-	-	-	-
protein disulfide isomerase	XP_650651	14	1	-	-	Thioredoxin-ähnlich

peripheral membrane protein peroxiredoxin	XP_647907	-	-	✓	-	-
sec 13 protein	XP_649874	-	-	-	-	WD40
Iron-containing superoxide dismutase	XP_648827	-	-	✓	-	-
t-complex protein 1 subunit alpha	XP_648370	-	-	-	-	-
t-complex protein 1 subunit beta	XP_655030	-	-	-	-	-
t-complex protein 1 beta subunit	XP_652436	-	-	-	-	-
t-complex protein 1 gamma subunit	XP_650158	-	-	-	-	-
t-complex protein 1 theta subunit	XP_654184	-	-	✓	-	-
tetratricopeptide repeat domain containing protein	XP_656358	-	-	✓	-	-
thioredoxin 1	XP_656726	-	-	✓	-	-
thioredoxin	XP_651032	15	-	-	-	-
thioredoxin	XP_655385	17	-	-	-	-
thioredoxin	XP_654476	17	-	-	-	-
thioredoxin	XP_655421	14	-	-	-	ER
thioredoxin	XP_650000	14	-	-	-	-
thioredoxin	XP_657045	15	-	-	-	-
phosducin-like protein	XP_655040	-	-	✓	-	-
thioredoxin reductase	XP_655748	-	-	-	-	-
type A flavoprotein	XP_656946	-	-	✓	-	-
ubiquitin	XP_654066	-	-		-	-
ubiquitin-activating enzyme	XP_649192	-	-		-	-
ubiquitin-conjugating enzyme family protein	XP_648678	-	-		-	-
Cytoskelett						
actin	XP_653718	-	-	-	-	-
actin	XP_652727	-	-	-	-	-
actin protein	gi 158914	-	-	✓	-	-
actin-binding protein	XP_650926	-	-	-	-	-
actin-binding protein	gi 56471255	-	-	-	-	-
actin-binding protein, cofilin/tropomyosin family	XP_656437	-	-	-	-	-
actin-binding protein, cofilin/tropomyosin family	XP_656444	-	-	-	-	-
actin binding protein	XP_652419	-	-	✓	-	-
actin binding protein	XP_655017	-	-	-	-	-

actin-like protein	XP_657596	-	-	✓	-	-
F-actin capping protein alpha subunit	XP_650645	-	-	✓	-	-
F-actin capping protein beta subunit	XP_652863	-	-	-	-	-
Actin-related protein 3	XP_647871	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_652420	-	-	-	-	actin verwandtes protein
hypothetical protein	XP_651499	-	-	-	-	alpha-actinin, LIM-type
actinin-like protein	XP_648365	-	-	✓	-	-
actinin-like protein	AAF20148	-	-	-	-	-
actobindin	XP_656837	-	-	✓	-	-
actobindin	XP_649708	-	-	✓	-	-
actophorin	XP_651689	-	-	-	-	-
adenylyl cyclase-associated protein	XP_655240	-	-	-	-	-
ARP2/3 complex 20 kDa subunit	XP_648567	-	-	-	-	-
ARP2/3 complex 21 kDa subunit	XP_653342	-	-	-	-	-
ARP2/3 complex 34 kDa subunit	XP_650569	-	-	✓	-	-
ARP2/3 complex 41 kDa subunit	XP_649043	-	-	-	-	WD40
calmodulin	XP_657577	-	-	-	-	Calcium-binding EF-hand
calmodulin	XP_652365	-	-	-	-	Calcium-binding EF-hand
calmodulin	XP_655757	-	-	-	-	Calcium-binding EF-hand
calmodulin	XP_651708	-	-	-	-	Calcium-binding EF-hand
calmodulin	XP_655621	-	-	✓	-	Calcium-binding EF-hand
hypothetical protein	XP_648832	-	-	-	-	-
calponin homology domain protein	XP_653283	-	-	-	-	EF-hand
coronin	XP_654419	-	-	✓	-	WD40
cortexillin	XP_001913607	-	-	-	-	-
cortexillin	XP_654961	-	-	-	-	-
cortexillin II	XP_652421	-	-	-	-	-
diaphanous protein	XP_653752	-	-	✓	-	-
diaphanous protein	XP_653884	-	-	✓	-	-
diaphanous protein	XP_656030	-	-	✓	-	-
diaphanous protein, homolog 2	XP_651696	-	-	✓	-	-

fibrillarin	XP_654111	-	-	-	-	-
filamin 2	XP_657265	-	-	-	-	-
filopodin	XP_654303	-	-	-	-	-
filopodin	XP_654777	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650448	-	-	-	-	-
gelsolin repeat protein	XP_6546691	-	-	-	-	-
myosin heavy chain	XP_654202	-	-	-	-	-
myosin heavy chain	AAB48065	-	-	-	-	-
myosin heavy chain	XP_657028	-	-	-	-	-
unconventional myosin IB	XP_654280	-	-	-	-	-
pleckstrin homology (PH) domain containing protein	XP_656064	-	-	-	-	-
prefoldin	XP_648692	-	-	✓	-	-
prefoldin subunit 2	XP_649483	-	-	✓	-	-
prefoldin subunit 3	XP_656814	-	-	-	-	-
profilin	gi 2350952	-	-	✓	-	-
beta-tubulin	XP_657170	-	-	-	-	-
villidin	XP_655365	-	-	-	-	-
villidin	XP_655366	-	-	-	-	-
villidin	XP_655822	-	-	-	✓	-
villin	XP_654808	-	-	-	-	-
GTPasen, GTP Bindung						
14-3-3 protein 1	XP_652946	-	-	-	-	-
14-3-3 protein 2	XP_653621	-	-	-	-	-
ADP-ribosylation factor	XP_654041	-	-	-	✓	-
ADP-ribosylation factor	XP_657135	-	-	-	-	Mito
ADP-ribosylation factor	XP_654690	-	-	-	-	-
aig1 family protein	XP_001914623	-	-	✓	-	-
dynamamin-1-like protein	XP_649650	-	-	-	-	-
dynamamin-like protein	XP_651634	SP	-	-	-	-
G protein alpha subunit	XP_651737	-	-	✓	✓	-
GTP-binding protein	XP_657513	-	-	✓	-	-
GTP binding protein	XP_650519	-	-	-	-	-
GTP-binding protein	XP_649850	-	1	-	-	-
GTP-binding protein ypt2	XP_652309	-	-	✓	-	-
GTP-binding protein	XP_648869	17	-	-	-	-
guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1	XP_649948	-	-	-	-	WD40

guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2like1	XP_657050	-	-	-	-	WD40
hypothetical protein	XP_653455,	-	-	-	-	ER Membran
guanine nucleotide regulatory protein	XP_650203	-	-	-	-	-
nucleotide binding protein 2	XP_653192	-	-	✓	-	-
PH domain containing protein	XP_001914050	-	-	-	-	-
cell cycle-associated GTPase	XP_657549	-	-	-	-	-
rab family GTPase	XP_651336	-	-	-	-	-
small GTPase RabC1	XP_656355	-	-	-	-	-
ehRab2B	XP_649335	-	-	✓	-	-
ehRab2C	XP_656786	19	-	-	-	-
rab family GTPase						
rab family GTPase EhRabC3	XP_652352	-	-	-	-	-
rab family GTPase	XP_656060	-	-	✓	-	-
small GTPase Rab7A	XP_649196	-	-	-	-	-
rab family GTPase	XP_656820	-	-	✓	-	Mito
rab family GTPase	XP_651202	-	-	✓	-	Recycling Endo- sommembran
rab family GTPase	XP_651915	-	-	-	-	Recycling Endo- sommembran
rab family GTPase	XP_653051	-	-	-	-	-
ehRab11A	XP_647948	-	-	-	-	-
small GTPase Rab11B	XP_652776	-	-	✓	-	-
small GTPase Rab11C	gi 13537449	-	-	-	-	Recycling Endo- sommembran
rab family GTPase	XP_653656	-	-	-	-	Mito
rab family GTPase	XP_655208,	-	-	-	-	Recycling Endo- sommembran
rab family GTPase	XP_655922	-	-	-	-	-
rab family GTPase	XP_656536	-	-	-	-	-
rab GDP dissociation inhibitor alpha	XP_001913575,	-	-	-	-	-
ran family GTPase	XP_657523	-	-	✓	-	-
rap/Ran GTPase activating protein	XP_651327	-	-	-	-	-
rap/Ran GTPase activating protein	XP_657431	-	-	-	-	-
rap/Ran GTPase activating protein	XP_649538	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655940	-	-	-	-	-
ras family GTPase	XP_650704	-	-	✓	-	-
ras family GTPase	XP_651163	-	-	-	-	-

ras family GTPase	XP_654039	-	-	-	-	-
ras family GTPase	XP_649693	-	-	-	-	-
ras GTPase-activating protein	XP_653058	-	-	-	-	-
ras GTPase activating protein	XP_656154	-	-	-	-	-
ras guanine nucleotide exchange factor	XP_655598	-	-	✓	-	Mito, ER Membran
ras guanine nucleotide exchange factor	XP_654415	-	-	✓	-	-
rhoGAP domain containing protein	XP_653274	-	-	-	-	GA Membran
rho GDP exchange inhibitor	XP_654522	-	-	-	-	-
rho family GTPase	XP_653812	-	-	✓	-	Cyto
rho family GTPase	XP_650831	-	-	-	-	-
rho family GTPase	XP_649502,	-	-	✓	-	Cyto
rho family GTPase	XP_654488,	-	-	✓	-	Cyto
rho family GTPase	XP_653308	-	-	-	-	-
rho family GTPase, RAC GTPase	XP_656301	-	-	✓	-	-
rho family GTPase	XP_651800	-	-	-	-	-
rho GTPase activating protein	XP_656475	-	-	-	-	LIM
rho guanine nucleotide exchange factor	XP_657220	-	-	-	-	Mito
rho guanine nucleotide exchange factor	XP_653415	-	-	-	-	-
rho-related protein racC	gi 2500188	-	-	✓	-	-
soluble calcium-activated nucleotidase 1	XP_649057	-	-	-	-	-
ER/Golgi						
cell division cycle protein 48/transitional endoplasmic reticulum ATPase	XP_657329	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_00191345	SA	1	-	-	ER Membran
sec6	XP_656804	-	-	-	-	-
sec23 protein	XP_652973	-	-	✓	-	-
sec61 alpha subunit	AAU43735	SA	5	-	-	-
signal recognition particle protein SRP54	XP_650715	-	-	-	-	-
Peptidasen						

aminopeptidase	XP_656618	-	-	-	-	-
methionine aminopeptidase	XP_651539	-	-	-	-	-
aminoacyl-histidine dipeptidase	XP_655596	-	-	✓	-	-
serine carboxypeptidase (S28) family protein	XP_652089,	16	-	-	-	Mito
xaa-Pro dipeptidase	XP_657085	-	-	-	-	-
Zn-dependent peptidase	XP_654849	-	-	✓	-	-
peptidase	XP_649891	-	-	-	-	-
CAAX prenyl protease	XP_648770,	17	6	-	-	-
calpain large subunit domain III containing protein	XP_649922	-	-	-	-	-
cell surface protease gp63	XP_655394	18	1	-	-	-
cysteine proteinase (EhCP-A1)	XP_650156	13	-	-	-	-
cysteine proteinase 2	XP_650642	13	-	-	-	-
cysteine proteinase (EhCP-A5)	XP_650937	13	-	-	-	-
cysteine proteinase (EhCP-A7)	XP_001914429	13	-	-	-	-
cysteine protease inhibitor 1	XP_653255	-	-	✓	-	-
serine protease inhibitor	XP_650262	-	-	-	-	-
26S protease regulatory subunit	XP_654722	-	-	✓	-	ATPase AAA+ type
26S protease regulatory subunit	XP_649078	-	-	✓	-	ATPase AAA+ type
26S protease regulatory subunit	XP_653833	-	-	✓	-	ATPase AAA+ type
26S protease regulatory subunit 7	XP_001914172	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
26S protease regulatory subunit	XP_657099	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
proteasome beta subunit	XP_653346	-	-	✓	-	-
proteasome alpha subunit	XP_655350	-	-	-	-	-
proteasome alpha subunit	XP_656396	-	-	-	-	-
proteasome alpha subunit	XP_648707	-	-	-	-	-
proteasome alpha subunit	XP_650714	-	-	-	-	-
proteasome alpha subunit	XP_649572	-	-	-	-	-
proteasome alpha subunit	XP_655561	-	-	-	-	Mito
proteasome alpha subunit	XP_653086	-	-	-	-	-
19S cap proteasome S2 subunit	XP_648181	-	-	✓	-	-
26s proteasome subunit P45 family protein	XP_648721	-	-	✓	-	ATPase AAA+ type
proteasome regulatory subunit	XP_655395	-	-	✓	-	Mito
proteasome regulatory subunit	XP_651402	-	-	-	-	-
proteasome regulatory subunit	XP_649261	-	-	✓	-	-
proteasome regulatory subunit	XP_653351	-	-	-	-	-

proteasome regulatory subunit	XP_656698	-	-	-	-	-
proteasome regulatory subunit	XP_655243	-	-	-	-	-
proteasome regulatory subunit	XP_655570	-	-	✓	-	-
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	XP_650487	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_657147	-	-	-	-	-
Metabolismus						
deoxyribose-phosphate aldolase	XP_651785	-	-	-	-	Cyto
putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase	AAL23716	-	-	-	-	Cyto
beta-N-acetylhexosaminidase	XP_650273	16	-	-	-	ER
arginase	XP_656978	-	-	-	-	Cyto
acetyl-coA carboxylase	XP_651829	-	-	✓	-	Cyto
Orn/Arg/Lys decarboxylase	XP_648734	-	-	✓	-	Cyto
threonine dehydratase catabolic	XP_650405	-	-	-	-	Cyto
threonine dehydratase	XP_657171	-	-	-	-	Cyto
alcohol dehydrogenase	XP_001914269	-	-	-	-	Cyto
alcohol dehydrogenase	XP_649070	-	-	✓	-	Cyto
alcohol dehydrogenase	XP_650419	-	-	✓	-	Cyto
alcohol dehydrogenase 3	Q24857	-	-	-	-	Cyto
alcohol dehydrogenase	XP_652262	-	-	✓	-	Cyto
alcohol dehydrogenase	XP_652300	-	-	-	-	Cyto
dihydropyrimidine dehydrogenase	XP_656317	-	-	-	-	Cyto
NAD(FAD)-dependent dehydrogenase	XP_649611	19	-	-	-	Plasmamembran, ER
NADP-dependent alcohol dehydrogenase	XP_653507	-	-	-	-	Cyto ER
NADP-dependent alcohol dehydrogenase	XP_652772	-	-	-	-	Cyto
malate dehydrogenase	XP_650855	-	-	-	-	Cyto
malate dehydrogenase	XP_649756	-	-	-	-	Cyto
malate dehydrogenase	XP_655601	-	-	-	-	Cyto
short chain dehydrogenase family protein	XP_652218	SA	-	-	-	Extr
EF-hand calcium-binding domain containing protein	XP_651692	-	-	✓	-	Cyto-nucl
EF-hand calcium-binding domain containing protein	XP_001913381	-	-	-	-	Cyto
aldose 1-epimerase	XP_649046	-	-	-	-	Nucl
UDP-glucose 4-epimerase	XP_650346	-	-	✓	-	Cytoskelett
hypothetical protein	XP_652516	-	-	-	-	Cyto

glucosidase	XP_655628	15	-	-	-	ER
glycoprotein FP21 precursor	XP_001913917	-	-	-	-	Cyto
grainin	XP_001914018	-	-	-	-	Cyto
grainin 1	XP_650372	-	-	-	-	Cyto
grainin 2	XP_650357	-	-	✓	-	Cyto
NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	XP_001913541	-	13	✓	-	Plasmamembran
glucosamine-6-phosphate isomerase	XP_653317	-	-	-	-	Cyto
70 kDa peptidyl-prolyl isomerase	XP_656239,	-	-	-	-	Cyto
triosephosphate isomerase	CAA73817	-	-	✓	-	Cyto
6-phosphofructokinase	XP_656482	-	-	✓	-	Cyto
phosphofructokinase	XP_653373	-	-	✓	-	Cyto
PPi-dependent phosphofructokinase	AAC04465	-	-	✓	-	Cyto
phosphoglycerate kinase	XP_653686	-	-	-	-	Cyto
pyruvate phosphate dikinase	XP_657332	-	-	-	-	Cyto
aspartate--ammonia ligase	XP_657492	-	-	✓	-	Cyto
long-chain-fatty-acid--CoA ligase	XP_651087	-	-	-	-	Nucl, ER Membran
long-chain-fatty-acid--CoA ligase	XP_649712	SA	-	-	-	ER
long-chain-fatty-acid--CoA ligase	XP_655072	SA	-	-	-	Plasmamembran
phosphopantothenoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate--cysteine ligase	XP_654544	-	-	✓	-	Cyto
aspartate ammonia-lyase	XP_655826	-	-	-	-	-
methionine gamma-lyase	XP_648806	-	-	-	-	-
malic enzyme	XP_648590	-	-	✓	-	-
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	XP_654182	-	-	✓	-	-
phosphoglucomutase	XP_657021	-	-	✓	-	-
phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	XP_648671	-	-	-	-	-
oxysterol binding protein	XP_655624	-	-	✓	-	GA Membran
oxysterol binding protein	XP_653552	-	-	-	-	-
protein phosphatase family protein	XP_650992	-	-	-	-	-
serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform (protein phosphatase-2A)	XP_656214	-	-	✓	-	-

inorganic pyrophosphatase	XP_649445	-	-	-	-	-
glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	XP_649476	SA	1	-	-	-
glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	XP_654143	SA	1	-	-	-
glycogen phosphorylase	XP_655120	-	-	-	-	-
glycogen phosphorylase	XP_655667	-	-	-	-	Mito
UDP-glucose pyrophosphorylase	XP_652750	-	-	-	-	-
hydroxylamine reductase	XP_650006	-	-	✓	-	-
oxidoreductase	XP_656504	-	-	-	-	Mito
pyruvate:ferredoxin oxidoreductase	XP_657019	-	-	-	-	-
steroid 5-alpha reductase	XP_654922	-	4	✓	-	-
cysteine synthase A	XP_650965	-	-	-	-	-
dolichol monophosphate mannose synthase	XP_651399	-	4	-	-	-
geranylgeranyl pyrophosphate synthase	XP_653910	-	-	-	-	-
glutamate synthase beta subunit	XP_656997	-	-	-	-	-
acyl-CoA synthetase	XP_656410	-	-	✓	-	-
acetyl-CoA synthetase	XP_656290	-	-	-	-	-
acyl-CoA synthetase	XP_653997,	-	-	✓	-	Cytoplasmatisches Vesikel, Mikrosom, ER
acetyltransferase, GNAT family	XP_654782,	-	-	✓	-	-
acetyltransferase, GNAT family	XP_649513,	-	-	✓	-	-
4-alpha-glucanotransferase	XP_655091	-	-	✓	-	-
alpha-1,3-mannosyltransferase ALG2	XP_653222	-	1	-	-	-
chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase	XP_650919,	-	2	-	-	ER Membran
dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase	XP_653407	16	1	-	-	ER Membran
dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	XP_001913394	-	1	-	-	-
glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	XP_648703	-	-	✓	-	-
glycosyltransferase	XP_657275,	SA	3	-	-	ER
glycosyltransferase	XP_653076	-	-	✓	-	-
UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase	XP_654498	14	-	-	-	-

glycylpeptide tetradecanoyltransferase	N-	XP_653252	-	-	-	-	-
53sulfate adenylyltransferase		XP_653570	-	-	-	-	-
transketolase		XP_001913844	-	-	-	-	-
Kinasen							
adenylate kinase		XP_649500	-	-	-	-	-
choline/ethanolamine kinase		XP_656977	-	-	-	-	-
hypothetical protein		XP_655630	-	-	-	-	-
enolase		XP_649161	-	-	-	-	-
FKBP-rapamycin associated protein (FRAP)		XP_650639	-	-	-	-	-
kinase		XP_653034	-	-	✓	-	-
galactokinase		XP_649045	-	-	-	-	-
hexokinase		XP_655965	-	-	-	-	-
mitogen-activated protein kinase		XP_653959	-	-	-	-	-
nucleoside diphosphate kinase		XP_655004	-	-	-	-	-
p21-activated kinase		XP_657512	-	-	-	-	-
phosphatidylinositol 3-kinase		XP_649802	-	-	-	-	-
phosphoribulokinase/uridine kinase family protein		XP_651299	-	-	-	-	-
protein kinase		XP_650711	-	-	-	-	-
protein kinase		XP_654883	-	-	-	-	-
protein kinase		XP_654636	-	-	-	-	-
protein kinase domain containing protein		XP_651793	-	-	-	-	-
protein kinase domain containing protein		XP_654114	28	2	-	-	-
protein tyrosine kinase domain-containing protein		XP_654020	13	1	-	-	-
receptor protein kinase		XP_648987	19	1	-	-	-
SH2-protein kinase domain containing protein		XP_649115	-	-	-	-	-
thymidine kinase		XP_655924,	-	-	-	-	-
tyrosine kinase		XP_650137	16	1	-	-	-
Lipid Metabolismus							
fatty acid elongase		XP_656100	-	2	✓	-	-
fatty acid elongase		XP_654403	-	2	✓	-	-
fatty acid elongase		XP_650157	-	2	✓	-	-
sphingosine-1-phosphate lyase 1		XP_653770	SP	-	✓	-	ER Membran

b-keto acyl reductase	XP_649970	SA	-	-	-	-
Membran						
non-transporter ABC protein	XP_649280	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
galactose-specific adhesin 170kD subunit	XP_655415	16	1	-	-	-
arsenite-translocating ATPase	XP_649286	-	-	✓	-	-
plasma membrane calcium-transporting ATPase	XP_650864	-	8	✓	✓	-
plasma membrane calcium-transporting ATPase	XP_651287,	-	8	-	✓	-
v-type ATPase, A subunit	XP_652625	-	-	✓	-	-
v-type ATPase, B subunit	XP_656034	-	-	✓	-	-
v-type ATPase, D subunit	XP_651598	-	-	-	-	-
v-type ATPase, F subunit	XP_654369,	-	-	✓	-	Membran
vacuolar ATP synthase subunit D	XP_651515	-	-	✓	-	-
vacuolar ATP synthase subunit E	XP_656703	-	-	✓	-	-
bacterial transferase hexapeptide family protein	XP_650707	-	-	-	-	-
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	XP_652140	-	-	-	-	-
diphthamide synthesis protein	XP_653288	-	-	✓	-	-
galactose-specific adhesin light subunit	XP_001913429	SP	-	-	-	-
galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit	XP_001913693	16	-	-	-	-
galactose lectin 35kDa (light) subunit	XP_656145	-	-	✓	-	-
Gal/GalNAc lectin heavy subunit	XP_650534	15	1	-	-	-
Gal/GalNAc lectin heavy subunit	XP_656181	15	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_654447	13	-	-	-	-
Gal/GalNAc lectin light subunit	XP_657460	18	-	-	-	-
Gal/GalNAc lectin subunit Igl2	XP_652394	13	-	-	-	-
immuno-dominant variable surface antigen	XP_654508	SA	-	-	-	-
multidrug resistance protein	XP_651702	SA	16	✓	-	ATPase AAA+ type
P-glycoprotein-1	XP_651764	-	9	✓	-	ATPase AAA+ type
P-glyco protein 6	XP_656596	-	11	✓	-	ATPase AAA+ type
DNA/RNA metabolismus, Translation						
activator 1 40 kDa subunit	XP_651156	-	-	-	-	ATPase AAA+ type

centromere/microtubule binding protein cbf5	XP_649989	-	-	-	-	-
enhancer binding protein-1	XP_651783	-	-	-	-	Nucleotide-binding
enhancer binding protein 2 (EBP2)	XP_650734	-	-	✓	-	Nucleotide-binding
enhancer binding protein-2	XP_649106	-	-	✓	-	Nucleotide-binding
nucleolar GTP-binding protein 1	XP_653339	-	-	-	-	-
polyadenylate-binding protein	XP_650900	-	-	-	-	-
polyadenylate-binding protein	XP_655191	-	-	-	-	Nucleotide-binding
snoRNA binding protein	XP_648166	-	-	-	-	-
URE3-BP sequence specific DNA binding protein	AAG18423	-	-	✓	-	Calcium-binding EF-hand
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	XP_649981	-	-	✓	-	Mito
elongation factor 1-alpha 1	XP_648361	-	-	-	-	-
elongation factor 1-alpha 1	XP_651869	-	-	-	-	-
elongation factor 1 beta	BAA22014	-	-	✓	-	-
elongation factor 2	XP_001913572	-	-	✓	-	-
helicase	XP_655794	-	-	-	-	-
DEAD/DEAH box helicase	XP_657280	-	-	-	-	-
DEAD/DEAH box helicase	XP_654408	-	-	-	-	-
ruvB-like DNA helicase	XP_651853	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
ruvB-like DNA helicase	XP_650562	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
helix-turn-helix protein	XP_655832	-	-	✓	-	-
high mobility group (HMG) box domain containing protein	XP_653089	-	-	-	-	-
histone H2A	XP_652470	-	-	-	-	-
Initiation factor eIF-2B delta subunit	XP_652622	SA	1	-	-	-
translation initiation factor eIF-5A	XP_651531	-	-	-	-	Nucleic acid-binding
translation initiation factor IF-2	XP_652306	-	-	-	-	-
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit	XP_652843,	-	-	-	-	Nucleic acid-binding
hypothetical protein	XP_655399,	-	-	-	-	WD40 repeat
Eukaryotic translation initiation factor eIF-5	XP_651802	-	-	-	-	-
eukaryotic translation initiation factor 6	XP_653440,	-	-	-	-	-
ribose 5-phosphate isomerase	XP_651609	-	-	-	-	-
eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	XP_655687	-	-	-	-	-

proliferating-cell nucleolar anti-gen p120	XP_654993	-	-	-	-	-
nucleolar complex protein 2 homolog	XP_656638	-	-	-	-	-
nucleolar protein Nop56	XP_654230	-	-	-	-	-
nucleolar phosphoprotein Nopp34	XP_650506	-	-	✓	-	nucleotide-binding
nucleosome assembly protein	XP_651305	-	-	-	-	nucl
3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	XP_651950	-	-	-	-	-
purine nucleoside phosphorylase	XP_655550,	-	-	-	-	-
purine nucleoside phosphorylase	XP_655507	-	-	-	-	-
purine nucleoside phosphorylase	XP_655398	-	-	-	-	-
purine nucleoside phosphorylase	XP_652740	-	-	-	-	-
Replication factor C subunit 4	XP_654775	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
endoribonuclease L-PSP	XP_651357	17	-	-	-	-
3' exoribonuclease family protein	XP_651847	-	-	-	-	-
ribosome biogenesis protein	XP_649898	-	-	-	-	-
ribosome biogenesis protein Nop10	XP_654909	-	-	✓	-	-
DNA-directed RNA polymerase subunit	XP_652347	-	-	-	-	-
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	XP_649386	-	-	-	-	nucl
RNaseL inhibitor-like protein	XP_001913806	-	-	-	-	ATPase AAA+ type
Nonsense-mediated mRNA decay protein	XP_648084	-	-	✓	-	-
rRNA biogenesis protein RRP5	XP_654947	-	-	-	-	-
arginyl-tRNA synthetase	XP_651552	-	-	-	-	-
asparaginyl-tRNA synthetase	XP_651543	-	-	-	-	Nucleic acid binding
aspartyl-tRNA synthetase	XP_649894	-	-	-	-	Nucleic acid binding
glutamyl-tRNA synthetase	XP_650546	-	-	-	-	-
glutamyl-tRNA synthetase	XP_655785	-	-	-	-	Anti-codon binding domain
glycyl-tRNA synthetase	XP_656678	-	-	-	-	Anti-codon binding domain
histidyl-tRNA synthetase	XP_655565	-	-	-	-	Anti-codon binding domain
hypothetical protein	XP_650600	-	-	-	-	nucleic acid binding
phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit	XP_651987	-	-	-	-	-
prolyl-tRNA synthetase	XP_651857	-	-	-	-	Anti-codon binding domain
seryl-tRNA synthetase	XP_650679	-	-	-	-	-

threonyl-tRNA synthetase	XP_653365	-	-	-	-	Anti-codon binding domain
tyrosyl-tRNA synthetase	XP_650212	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657442	-	-	✓	-	-
S-phase kinase-associated protein 1A	XP_651670	-	-	✓	-	-
structural maintenance of chromosomes protein	XP_656581	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655216	-	-	-	-	-
snoRNP protein gar1	XP_654725	-	-	-	-	-
transcription factor BTF3	XP_654992	-	-	-	-	-
Protein-protein Interaktion						
ubiquitin-like	XP_649463	-	-	✓	-	-
cdc48-like protein	XP_650911	-	-	-	-	AAA ATPases
ankyrin repeat protein	XP_650635	-	-	-	-	-
ankyrin repeat protein	XP_652122	-	-	-	-	-
replication factor C family protein	XP_651283	-	-	✓	-	AAA ATPases
Signaling						
FKBP-rapamycin associated protein (FRAP)	XP_650639	-	-	-	-	-
phosphatidylinositol3-kinase Tor2	XP_651206,	-	-	-	-	-
L-myo-inositol-1-phosphate synthase	XP_654310	-	-	✓	-	-
Ribosomale Proteine						
13 kDa ribonucleoprotein-associated protein / ribosomal protein l7ae	XP_654237	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein SA	XP_647879	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S2	XP_648968	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S3	XP_649921	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S3a	XP_652399	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S3a	XP_648594	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S5	XP_650402	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S6	XP_648173	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S7	XP_001913775	-	-	✓	-	Mito
40S ribosomal protein S7	XP_657156	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S9	XP_656500	-	-	✓	-	RNA-binding
40S ribosomal protein S10	XP_653143	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S11	XP_649442	-	-	✓	-	Nucleic acid-binding

40S ribosomal protein S11	XP_655751	-	-	✓	-	Nucleic acid-binding
40S ribosomal protein S12	XP_650093	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S13	XP_656099	-	-	✓	-	Mito RNA-binding
40S ribosomal protein S14	XP_653549	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S15	XP_648450	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S15a	XP_650361	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S16	XP_656860	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S17	XP_651661	-	-	✓	✓	-
40S ribosomal protein S17	XP_648986	-	-	✓	✓	-
40S ribosomal protein S18	XP_654098	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S19	XP_649039	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S20	XP_656743	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S20	XP_655378	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S21	XP_651538	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S23	XP_648346	-	-	✓	-	Mito
40S ribosomal protein S24	XP_649038	-	-	✓	-	Nucleotide-binding
40S ribosomal protein S25	XP_655917	-	-	-	-	-
40S ribosomal protein S26	XP_649710	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S26	XP_653928	-	-	✓	-	-
40S ribosomal protein S27	XP_656988	19	-	-	-	-
40S ribosomal protein S28	XP_652698	-	-	-	-	Nucleic acid-binding
ribosomal protein S29	XP_652452	-	-	✓	-	-
Ribosomal protein S30	XP_656699	-	-	✓	-	-
60S acidic ribosomal protein P0	XP_648494	-	-	✓	-	-
60S acidic ribosomal protein P0	XP_649340	-	-	-	-	-
60S acidic ribosomal protein P1	XP_650578	28	-	-	-	-
60S acidic ribosomal protein P1	XP_652637	26	-	-	-	-
60S acidic ribosomal protein P2	XP_656438	--	-	-	-	-
60S acidic ribosomal protein P2	XP_650140	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L2/L8	XP_652173	-	-	✓	-	Mito
60S ribosomal protein L3	XP_652042	-	-	✓	-	Mito
60S ribosomal protein L4	XP_001913650	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L5	XP_650508	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L6	XP_654189	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L6	XP_653603	-	-	-	-	-

60S ribosomal protein L6	XP_657157	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L7	XP_653065	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L7	XP_656887	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L7	XP_649035	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L7a	XP_649126	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L9	XP_652462	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L10	XP_652099	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L10a	XP_654001	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L11	XP_651463	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L12	XP_648500	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L13	XP_650787	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L14	XP_649601	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L15	XP_648344	-	-	-	-	Mito
60S ribosomal protein L16-B	XP_649726	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L17	XP_652544	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L17	XP_652305	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L17	XP_652070	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L18	XP_649082	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L18a	XP_648709	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L19	XP_657044	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_647933	-	-	✓	-	60S ribosomal protein L22
60S ribosomal protein L23	XP_651297	-	-	✓	-	-
ribosomal protein L23A	XP_655485	-	-	✓	-	Nucleotide-binding
60S ribosomal protein L24	XP_648504	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L26	XP_649063	-	-	-	-	Mito
60S ribosomal protein L26	XP_656954	-	-	-	-	Mito
60S ribosomal protein L27	XP_649918	-	-	-	-	Mito
60S ribosomal protein L27	XP_654328	-	-	-	-	Mito
60S ribosomal protein L30	XP_653650	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L31	XP_651162	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L31	XP_651726	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L32	XP_657219	-	-	-	-	-
60S ribosomal protein L34	XP_654784	-	-	-	-	Mito
60S ribosomal protein L35	XP_654433	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L35a	XP_651074	-	-	✓	-	Mito
60S ribosomal protein L36	XP_649173	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L37a	XP_652970	-	-	✓	-	-

60S ribosomal protein L38	XP_651276	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L40	XP_651040	-	-	✓	-	-
60S ribosomal protein L44	XP_649950	-	-	✓	-	-
60S ribosome subunit Biogenesis protein NIP7	XP_648037	-	-	-	-	-
synapsin-2	XP_652171	-	-	✓	-	-
Proteine unbekannter Funktion						
20 kDa antigen	AAC37177	-	-	✓	-	-
antigen	CAA55733	-	-	✓	-	-
HEAT repeat domain containing protein	XP_648949	-	-	-	-	-
HEAT repeat domain containing protein	XP_649444	-	-	✓	-	-
HEAT repeat domain containing protein	XP_654840	-	-	✓	-	-
glutamic acid-rich protein	XP_001913764	-	-	✓	-	-
leucine rich repeat / protein phosphatase 2C domain containing protein	XP_650359	-	-	-	-	-
lysine and glutamic acid-rich protein 1 (KERP1)	XP_653629	-	-	-	-	-
MIR domain protein	XP_655109	19	-	-	-	-
alpha-NAC protein	XP_655031	-	-	-	-	-
RNA recognition motif domain containing protein	XP_655375	-	-	-	-	Nucleotide-binding
serine-threonine-isoleucine rich protein	XP_001913596	16	-	-	-	-
serine-threonine-isoleucine rich protein	XP_649372	-	1	-	-	-
SH3 domain protein	XP_656019	-	-	-	-	BAR
BAR/SH3 domain containing protein	XP_650391	-	-	-	-	BAR
TolA-like protein	XP_651632	-	-	-	-	-
TolA protein	XP_653253	-	-	✓	-	-
viral A-type inclusion protein repeat	XP_657286	-	-	-	-	-
WD domain containing protein	XP_650923	-	-	-	-	WD40 repeat
WD domain containing protein	XP_652423	-	-	-	-	WD40 repeat
WD domain containing protein	XP_654125	-	-	✓	-	WD40 repeat
WD domain containing protein	XP_657491	-	-	✓	-	WD40 repeat
WD repeat protein 2	XP_001913490	-	-	-	-	WD40 repeat
WD-repeat protein	XP_654879	-	-	✓	-	WD40 repeat

WD repeat-containing protein pop3	Keine Eh Sequenz vorhanden	-	-	-	-	WD40 repeat
WD repeat protein	XP_653734	-	-	-	-	WD40 repeat
WD repeat protein	XP_651916	-	-	-	-	WD40 repeat
WD repeat protein	XP_654286	-	-	✓	-	WD40 repeat
WD repeat protein	XP_656876	-	-	✓	-	Mito WD40 repeat
zinc finger protein	XP_650789	-	-	✓	-	double stranded RNA binding
hypothetical protein	XP_652016	15	-	-	-	ER
hypothetical protein	XP_648732	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650979,	SA	5	-	-	ER
hypothetical protein	XP_656104	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649876	-	-	-	-	5 LIM
hypothetical protein	XP_653039	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657426	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_657429	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657442	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_654752	-	-	-	-	AAA+ ATPases
hypothetical protein	XP_656594,	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656253	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_001913451	SA	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656943	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655054	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656143	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001913557	19	1	-	-	ER
hypothetical protein	XP_652818	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_653602	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_654691	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001913951	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_001914097	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654299	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_648373	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_649155	-	-	✓	-	LIM
hypothetical protein	XP_649469	SA	6	-	-	-
hypothetical protein	XP_649559	-	9	-	-	-
hypothetical protein	XP_649879	16	1	-	-	ER
hypothetical protein	XP_649888	16	-	-	-	ER

hypothetical protein	XP_650031	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650077	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_650197	-	-	-	-	LIM
hypothetical protein	XP_650806	18	-	-	-	ER
hypothetical protein	XP_650987	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652116	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652202	17	-	-	-	ER
hypothetical protein	XP_652293	-	-	✓	✓	-
hypothetical protein	XP_653761,	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654420	15	1	-	-	ER
hypothetical protein	XP_654443	-	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_654688	-	-	✓	-	LIM
hypothetical protein	XP_654693	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_654714,	-	4	-	-	-
hypothetical protein	XP_655639	-	-	-	-	ATPase-like, ATP-binding domain
hypothetical protein	XP_656510	-	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_656900,	16	1	-	-	ER
hypothetical protein	XP_656996	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_657298	15	-	-	-	ER
hypothetical protein	XP_657518	15	-	-	-	ER
hypothetical protein	XP_657444	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_650063	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652327	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_648249	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_656635	-	2	✓	-	-
hypothetical protein	AAFB02000124.1	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649139	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_653512	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_651160	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_653039	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652046	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654500	-	-	✓	✓	-
hypothetical protein	XP_649813	-	-	-	-	DNA polymerase V
hypothetical protein	XP_650998	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654045	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_653350	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656616	-	-	-	-	-

hypothetical protein	XP_649359	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650383	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657167	-	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_655607	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_653141	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650629	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656594	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650409	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_001913538	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001913634	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_648545	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001913701	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649859	-	2	✓	-	-
hypothetical protein	XP_656525	-	-	✓	-	Heat shock protein DnaJ N-terminal
hypothetical protein	XP_001913816	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_651295	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652023	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_651268	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001913915	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001913941	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650601	20	-	-	-	GPI-omega-site
hypothetical protein	XP_649546	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_649932	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_651447	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_001914372	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652254	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_648689	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_648723	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_648934	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649159	SA	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649236	14	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_649520	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_649606	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650151	SA	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650291	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650648	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650677	-	-	-	-	-

hypothetical protein	XP_650812	-	-	✓	-	4 LIM
hypothetical protein	XP_650862	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_650967	-	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_651234	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_651237	20	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_651738	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_651751	15	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652143	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_652195	14	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652196	15	-	-	-	PI omega-site
hypothetical protein	XP_652202	17	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652241	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_652362	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_652719	-	-	-	-	Mito
hypothetical protein	XP_652816	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652847	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_652904	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_653006	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_653036	20	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_653430	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_653482	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_653548	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_653843	-	3	-	-	-
hypothetical protein	XP_653931	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654122	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654163	15	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654164	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654200	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654267	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654422	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654479	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654576	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_654744	-	3	-	-	-
hypothetical protein	XP_654765	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655528	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655559	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655605	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_655651	-	-	-	-	-

hypothetical protein	XP_655973	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656027	20	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_656115	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656126	15	1	-	-	-
hypothetical protein	XP_656332	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656416	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656607	13	-	-	-	GPI omega-site
hypothetical protein	XP_656657	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656666	-	-	-	-	Heat shock protein DnaJ
hypothetical protein	XP_656720	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_656918	-	-	-	-	LIM
hypothetical protein	XP_657012	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657038	-	-	✓	-	-
hypothetical protein	XP_657108	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657537	-	-	-	-	-
hypothetical protein	XP_657550	-	-	-	-	-

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an die Menschen richten, die mich auf unterschiedliche Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulare Parasitologie“ am Bernhard-Nocht-Institut für ihre Hilfe und das angenehme Arbeitsklima während meiner Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus für eine sehr engagierte und fürsorgliche Betreuung. Es ist schön wenn man mit seiner Chefin auch Spaß haben kann.

Ich danke Prof. Dr. Egbert Tannich für die Unterstützung und die Möglichkeit dieses Projekt durchzuführen.

Großer Dank geht an PD Dr. Hannelore Lotter für die Durchführung der zahlreichen Tierversuche.

Jürgen Sievertsen danke ich für die Einführung in das Anker- und Sensordesign und ein stets offenes Ohr für jegliche SNP-Fragen.

Ich danke Claudia Marggraff, Heidrun von Thien, Susann Ofori und Ina Hennings für die große Hilfe in so diversen Bereichen, dass ich sie hier nicht alle nennen kann.

Meinen Labor 5 Mitinsassen danke ich für eine schöne und lustige Zeit und Dr. Anna Bachmann zusätzlich für die bis ins Ausland reichende Unterstützung. Und auch durch Sabine Predehl, Elena Helk und Anna Tilly hat sich die Arbeit teilweise gar nicht wie Arbeit angefühlt.

Spezieller Dank geht an mein Haserl für die Hilfe, das Lachen, das Chaos und die Erfahrungen innerhalb und außerhalb des Labors.

Tiefer Dank geht auch an meine engen Freunde Miriam Dobberstein und Nicolas Böge ohne deren „Kontrolle“ und Motivation diese Arbeit nicht in Druck gegangen wäre.

Abschließend möchte ich den für mich wichtigsten Menschen danken, meiner Familie. Meinen großartigen Schwestern Jessica und Nina für das Vertrauen in mich, wo ich schon manchmal schon keins mehr hatte, für die Liebe und für die Kritik, welche mich immer weiter gebracht hat. Meinen Eltern, die den Grundstein gelegt haben. Ich denke ihr wäret stolz.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht.

Hamburg, den 24.02 2012

(Jenny Matthiesen)