

Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren durch
Überexpression differentiell exprimierter Gene in
pathogenen und nicht-pathogenen *Entamoeba*
histolytica (SCHAUDINN, 1903) Klonen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften -
Fachbereich Biologie - der Universität Hamburg

vorgelegt von

Martin Andreas Meyer

Hamburg, 2016

Gutachter der Dissertation

1. Prof.Dr. Iris Bruchhaus
2. Prof.Dr Jonas Schmidt-Chanasit

Tag der Disputation: 13. Oktober 2016

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 ENTAMOEBA HISTOLYTICA	1
1.1.1 DER PARASIT	1
1.1.2 KRANKHEITSVERLAUF UND THERAPIE	1
1.1.3 PHYLOGENIE	3
1.1.4 ZELLBIOLOGIE	4
1.1.5 DAS GENOM	5
1.2 PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	5
1.2.1 DAS GALAKTOSE/ <i>N</i> -ACETYL-D-GALAKTOSAMIN SPEZIFISCHES LEKTIN (GAL/GALNAC)	6
1.2.2 AMOEBAPORES	6
1.2.3 CYSTEINPEPTIDASEN	7
1.3 BEDEUTUNG VON KULTURISOLATEN	8
1.4 METHODEN ZUR IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER PATHOGENITÄTSFAKTOREN	10
1.4.1 VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOMANALYSEN	10
1.4.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG VON PROTEINEN	12
1.5 ALKOHOLDEHYDROGENASEN IN <i>E. HISTOLYTICA</i>	13
1.6 ZIELSETZUNG	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 GERÄTE UND SOFTWARE	16
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.3 CHEMIKALIEN	17
2.4 MARKER UND LADEPUFFER	17
2.5 ASSAY-SYSTEME	17
2.6 PUFFER UND LÖSUNGEN	18
2.7 KULTURMEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE	21
2.7.1 LB-MEDIUM UND LB-AGAR	21
2.7.2 KULTURMEDIEN	21
2.10 ORGANISMEN	22
2.10.1. <i>ENTAMOEBA HISTOLYTICA</i>	22
2.10.2 <i>MUS MUSCULUS</i>	22
2.10.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i> – STÄMME	23
2.11 PLASMIDE	23
2.13 ZELLKULTUR VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	24
2.13.1 KULTIVIERUNG VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	24
2.13.2 KLONIERUNG VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	24
2.13.3 ZELLERNTEN VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	25
2.13.4 TRANSFEKTION VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	25
2.14 BAKTERIENZELLKULTUR	25
2.14.1 ANZUCHT VON BAKTERIEN	25
2.14.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	26

2.15	ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	26
2.15.1	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS <i>E. COLI</i>	26
2.15.2	PLASMID-MINI-PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i>	26
2.16	ISOLIERUNG, REINIGUNG UND FÄLLUNG VON RNA AUS <i>E. HISTOLYTICA</i>	26
2.16.1	RNA-ISOLIERUNG MIT TRIZOL (INVITROGEN)	26
2.16.2	RNA-REINIGUNG UND DNA-VERDAU MIT <i>RNEASY-MINI-KIT</i> (QIAGEN)	27
2.17	DNA-ANALYSEN	27
2.17.1	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG UND REINHEITSKONTROLLE	27
2.17.2	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	27
2.17.3	DNA-EXTRAKTION UND PRÄPARATION AUS AGAROSEGELEN	28
2.17.4	DNA SEQUENZANALYSEN	28
2.18	KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	28
2.18.1	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	28
2.18.2	RESTRIKTIONSANALYSE VON DNA	30
2.18.3	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	30
2.19	RNA-ANALYSEN	30
2.19.1	ERSTRANGSYNTHESE (cDNA SYNTHESE)	30
2.19.2	QUANTITATIVE <i>REAL-TIME</i> PCR	31
2.19.3	ÜBERPRÜFUNG DER RNA INTEGRITÄT	33
2.19.4	HERSTELLUNG VON NGS-BIBLIOTHEKEN AUS GESAMT-RNA	33
2.20	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	34
2.20.1	REKOMBINANTE EXPRESSION	34
2.20.2	REINIGUNG DER GST MARKIERTEN REKOMBINANT EXPRIMIERTEN PROTEINEN MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	34
2.20.3	HERSTELLUNG VON PROTEINEXTRAKTEN AUS <i>E. HISTOLYTICA</i>	35
2.20.4	GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE	36
2.20.5	ANIONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE	36
2.20.6	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	37
2.20.7	COOMASSIEFÄRBUNG VON SDS-POLYACRYLAMIDGELEN	38
2.20.8	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	38
2.20.9	WESTERN-BLOT IMMUNODETEKTION	38
2.20.10	<i>THERMAL SHIFT ASSAY</i>	39
2.20.11	KRISTALLISIERUNG VON PROTEINEN	40
2.21	HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER	41
2.22	IMMUNFLUORESZENZANALYSE	42
2.22.1	IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	42
3.	ERGEBNISSE	44
3.1	VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOM-ANALYSEN	44
3.1.1	VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOM-ANALYSEN DES PATHOGENEN KLONS B2 ^P MIT DEM APATHOGENEN KLON B8 ^{NP}	44
3.1.3	ANALYSE DER DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE ZWISCHEN DEM PATHOGENEN KLON B2 ^P UND DEN APATHOGENEN KLONEN A1 ^{NP} UND B8 ^{NP}	46
3.1.4	GENERIERUNG DER ÜBEREXPRESSIONSKONSTRUKTE	47
3.1.5	EINFLUSS DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE AUF DIE PATHOGENITÄT IM MAUSMODELL	48
3.2	TRANSKRIPTOMANALYSE MITTELS mRNA-SEQUENZIERUNG NACH ÜBEREXPRESSION IN TROPHOZOITEN VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	50
3.3	GENOMANALYSEN DER ALKOHOLDEHYDROGENASEN EHI_160670 UND EHI_088020	54
3.3.1	SEQUENZANALYSE VON EHI_160670 UND EHI_088020	54
3.3.2	IDENTIFIZIERUNG HOMOLOGER ALKOHOLDEHYDROGENASEN AUS <i>E. HISTOLYTICA</i>	57
3.3.3	EINFLUSS VON ALKOHOLDEHYDROGENASEN AUF DIE ALA-BILDUNG VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	59
3.4	EXPRESSION UND REINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE	60
3.4.1	EXPRESSION UND REINIGUNG DER ALKOHOLDEHYDROGENASE EHI_088020 VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	60
3.4.2	GENERIERUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER GEGEN DIE ALKOHOLDEHYDROGENASE EHI_088020 VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	64

3.5	CHARAKTERISIERUNG DER ALKOHOLDEHYDROGENASE EHI_088020 AUS <i>E. HISTOLYTICA</i>	66
3.5.1	LOKALISATIONSSTUDIEN DER ALKOHOLDEHYDROGENASE EHI_088020 VON <i>E. HISTOLYTICA</i> IN TROPHOZOITEN DER KLONE A1 ^{NP} , B2 ^P UND B8 ^{NP} MITTELS IMMUNFLUORESCENZMIKROSKOPIE	66
3.4.2	<i>THERMAL SHIFT ASSAY</i>	74
3.5.3	KRISTALLISATION ZUR RÖNTGENSTRUKTURANALYSE DER ADH EHI_088020 VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	78
4.	DISKUSSION	81
4.1	VERGLEICHENDE TRANSKRIPTIONSANALYSEN	81
4.2	EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE AUF DIE PATHOGENITÄT IM KLON B2^P	83
4.2.1	EINFLUSS DER PHOSPHOSERINAMINOTRANSFERASE AUF DIE PATHOGENITÄT	83
4.2.2	EINFLUSS VON AKTOBINDIN AUF DIE PATHOGENITÄT	84
4.2.3	EINFLUSS DER AIG'S AUF DIE PATHOGENITÄT	85
4.2.4	EINFLUSS DER HYPOTHETISCHEN PROTEINE AUF DIE PATHOGENITÄT	85
4.2.5	EINFLUSS DER ADHS EHI_088020 UND EHI_160670 AUF DIE PATHOGENITÄT	87
4.3	EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION AUF DIE PATHOGENITÄT IM NICHT-PATHOGENEN KLON B8^{NP}	88
4.3.1	EINFLUSS DER METHIONINGAMMALYASE AUF DIE PATHOGENITÄT	88
4.3.2	EINFLUSS DES LEUCINREICHEN PROTEINS EHI_073680 AUF DIE PATHOGENITÄT	90
4.3.3	EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION HYPOTHETISCHER PROTEINE AUF DIE PATHOGENITÄT	91
4.4	VERGLEICHENDE TRANSKRIPTOMANALYSEN	92
4.4.1	TRANSKRIPTOMANALYSE ZWISCHEN DER EHI_088020-TRANSFEKTANTE UND DER PNC-(KONTROLLE)-TRANSFEKTANTE	93
4.4.2	TRANSKRIPTOMANALYSE ZWISCHEN DER EHI_088020MUT-TRANSFEKTANTE UND DER PNC-(KONTROLLE)-TRANSFEKTANTE	93
4.4.3	TRANSKRIPTOMANALYSE ZWISCHEN ZWEI EHI_160670-TRANSFEKTANTEN (_2/_1) UND DER PNC-(KONTROLLE)-TRANSFEKTANTE	94
4.5	SEQUENZANALYSE VON EHI_160670 UND EHI_088020	99
4.6	IDENTIFIZIERUNG HOMOLOGER ADHS ZUR ADH EHI_088020 IM GENOM VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	99
4.7	EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION DER ADHS EHI_192470, EHI_193530 UND EHI_125950 AUF DIE PATHOGENITÄT	100
4.8	ANALYSE DER ALKOHOLDEHYDROGENASE EHI_088020	100
4.8.1	EXPRESSION UND REINIGUNG REKOMBINANTER ADH EHI_088020	100
4.8.2	LOKALISATION DER ADH EHI_088020 IN TROPHOZOITEN VON <i>E. HISTOLYTICA</i>	101
4.8.3	IDENTIFIZIERUNG MÖGLICHER BINDUNGSPARTNER DER ADH EHI_088020	102
4.8.4	KRISTALLISATION DER ADH EHI_088020	103
	ZUSAMMENFASSUNG	104
5.	LITERATURVERZEICHNIS	106
6.	ANHANG	116
	DANKSAGUNG	123
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	125

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	auffüllen bis
ALA	Amöbenleberabszess
ADH	Alkoholdehydrogenase
Bidest.	Bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre DNA
CT	<i>cycle of threshold</i>
<i>Da</i>	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. moshkovskii</i>
Rh/eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
<i>et al.</i>	<i>et al.</i>
FC	<i>Fold change</i>
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm

GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatographie</i>
kb	Kilobasenpaar (Größenangabe)
kDa	1000 Da (atomare Masseneinheit)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
M	Mol
m	milli
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
N	nano
Na	Natrium
n.d.	nicht differentiell
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
p	pico
padj	adjustierter p-Wert
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
mRNA-Seq	<i>messenger RNA-Sequenzierung</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
Seq	Sequenzierung
T	Thymin
tRNA	transfer RNA
U	Unit (Einheit)
vgl.	vergleiche

vs.	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	micro
Δ	delta
%	Prozent
°C	Grad Celsius

Für die natürlich vorkommenden zwanzig Aminosäuren werden folgende Abkürzungen verwendet:

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

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*

Abbildung 2: Darstellung der Amöbenleberabszessgröße 7 Tage nach intrahepatischer Injektion von $1,25 \times 10^5$ Trophozoiten der Zelllinien A und B des *E. histolytica* Isolats HM-1:IMSS sowie der Klone A1-A12 und B1-B12 in *Meriones unguiculatus* (n = 4-6) (Diss Matthiesen, Meyer et al., eingereicht).

Abbildung 3: Amöbenleberabszessbildung 7 Tage nach Injektion in *Meriones unguiculatus* durch Trophozoiten der *E. histolytica* HM-1:IMSS Klone B8^{np} und B2^p und der aus ihnen generierten Subklone B8_1-B8_5 und B2_1-B2_5 (Meyer et al., eingereicht).

Abbildung 4: Phasendiagramm der Proteinkristallisation

Abbildung 5: Expressionsprofile der zwischen dem pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} signifikant differentiell exprimierten Genen

Abbildung 6: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit Klon B2^p-Transfektanten

Abbildung 7: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit Klon B8^{np}-Transfektanten

Abbildung 8: Lokalisation der ADHs EHI_088020 und EHI_160670 im Genom von *E. histolytica* Sequenzanalyse

Abbildung 9: Sequenzalignment verschiedener ADHs von *E. histolytica*

Abbildung 10: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit B2^p ADH-Transfektanten

Abbildung 11: Rekombinante Expression der ADH EHI_088020 und Abspaltung des GST-tags

Abbildung 12: Größenausschlusschromatographie der ADH EHI_088020

Abbildung 13: Anionenaustauschchromatographie von EHI_088020

Abbildung 14: Western-Blot Analyse des polyklonalen Antikörpers von EHI_088020 in den Amöbenlysaten der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np}

Abbildung 15: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in den Klonen A1^{np}, B2^p und B8^{np}

Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in den Klonen A1^{np}, B2^p und B8^{np}

Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in dem Klon B2^p und der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K)

Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) und der pNC-EHI_088020-Transfektante (I)

Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in der pNC-EHI_160670-Transfektante (II) und pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K)

Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in der pNC-(Kontrolle)-Tranfektante (K) und pNC-EHI_088020Mut-Transfektante (M)

Abbildung 21: *Thermal Shift Assay* zur Untersuchung verschiedener Metallionen auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020

Abbildung 22: *Thermal Shift Assay* des konzentrationsabhängigen Einflusses von Nickel auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020

Abbildung 23: Kristalle der ADH EHI_088020 von *E. histolytica*

Abbildung 24: Streubild der ADH EHI_088020 von *E. histolytica*

Abbildung 25: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit Klon A1-Transfektanten

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gene differentiell höher exprimiert in Klon B8^{np} im Vergleich zu Klon B2^p (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 2: Gene differentiell höher exprimiert in Klon B2^{np} im Vergleich zu Klon B8^p (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 3: Gene differentiell höher exprimiert zwischen dem Klon B2^p im Vergleich mit den Klonen Klon B8^{np} und A1^{np} (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 4: Relative Expression von B2^p und B8^{np} Transfektanten, die Gene überexprimieren, die normalerweise höher in Klon B8^{np} bzw Klon B2^p höher exprimiert sind

Tabelle 5: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der ADH EHI_088020-Transfektante (I) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 6: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der ADH EHI_160670-Transfektante_2 (II) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 7: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 (III) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 8: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der Mutante ADH EHI_088020Mut-Transfektante (M) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , p_{adj} ≤ 0.05)

Tabelle 9: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in A1^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Tabelle 10: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in A1^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, mittels qPCR

Tabelle 11: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in B2^p im Vergleich zu A1^{np} hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Tabelle 12: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in A1^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, mittels qPCR

Tabelle 13: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in B8^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Tabelle 14: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in B8^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, mittels qPCR

Tabelle 15: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in B2^p im Vergleich zu B8^{np} hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Tabelle 16: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in B2^p im Vergleich zu B8^{np} hochreguliert sind, mittels qPCR

Tabelle 17: Oligonukleotide für die qualitative *Real-Time* PCR

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

Tabelle 19: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($p_{adj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_088020-Transfektante in B2^p

Tabelle 20: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($p_{adj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_160670-Transfektante_2 in B2^p

Tabelle 21: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($p_{adj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_160670-Transfektante_1 in B2^p

Tabelle 22: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($p_{adj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_088020Mut-Transfektante in B2^p

1 Einleitung

1.1 *Entamoeba histolytica*

1.1.1 Der Parasit

Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903) ist ein parasitisches Protozoon und Erreger der Amöbiasis. Die erste Beschreibung der Spezies erfolgte 1875 (Lösch, 1875). Fedor Lösch konnte im Stuhl eines Farmers mit Amöbenruhr Trophozoiten nachweisen und nannte diesen Parasiten *Amoeba coli*. Fritz Schaudinn etablierte 1903 den Namen *Entamoeba histolytica*, nachdem er die Fähigkeit des Parasiten erkannte Wirtsgewebe zu zerstören (SCHAUDINN, 1903). Mit 50 Mio. Infektionen pro Jahr und einer Mortalitätsrate von 50-100000 Menschen jährlich gilt die Amöbiasis neben Malaria und Schistosomiasis als drittwichtigste humanpathogene protozoische Erkrankung (WHO, 1997). In endemischen Gebieten wie Mexiko liegt die Seroprävalenz bei 8,4 %, wobei keine klimatische Korrelation festgestellt werden konnte (Caballero-Salcedo *et al.*, 1994).

Bedingt durch mangelnde Hygiene, vorwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten, erfolgt die Infektion zumeist durch die orale Aufnahme vierkerniger Zysten über kontaminiertes Trinkwasser oder Lebensmitteln (Brand *et al.*, 1970). Geschützt durch eine säureresistente, chitinhaltige Hülle, passieren diese den Magen. Durch die pH Änderung zum basischen und neutralen Bereich kommt es im Dünndarm zur Exzystierung, die in vierkernigen metazystischen Trophozoiten resultiert. Diese sind durch Bildung von Pseudopodien in der Lage sich fortzubewegen (Bailey *et al.*, 1992). Durch Kern- und Plasmateilung kommt es zur Entstehung von 8 einkernigen Trophozoiten (Marshall *et al.*, 1997). Diese besiedeln den oberen Dickdarm und können dort mehrere Jahre als nicht-pathogene Kommensalen leben und ernähren sich durch Phagozytose von Bakterien der Darmflora sowie Nahrungsresten (Das *et al.*, 2002).

1.1.2 Krankheitsverlauf und Therapie

Bei der Amöbiasis unterscheidet man zwei Verlaufsformen. In 90 % der Fälle verläuft die Infektion ohne Symptome als nicht invasive Amöbiasis (Blessmann *et al.*, 2002). Die Trophozoiten besiedeln dabei den oberen Dickdarm und persistieren dort für Monate oder Jahre (Knobloch und Mannweiler, 1983). Bei 10 % der Infizierten jedoch entwickelt

sich eine invasive, intestinale Amöbiasis. Diese aggressive Verlaufsform der Infektion zeichnet sich dadurch aus, dass die Trophozoiten die intestinale Mucosa des Dickdarms penetrieren und in das Darmepithel eindringen können (Stanley *et al.*, 2003). Als typische Symptome treten dabei Bauchschmerzen, Kolitis, blutige Durchfälle und Fieber auf. Gelangen die Parasiten nach Penetration des Darmepithels in den Blutstrom und von dort weiter zu anderen Organen wie der Leber, der Lunge oder dem Gehirn, können sie dort Abszesse verursachen (Burchard und Tannich 2004). Diese invasiv, extraintestinale Amöbiasis ist die aggressivste Verlaufsform einer Infektion mit *E. histolytica* (Rigotherier *et al.*, 2002).

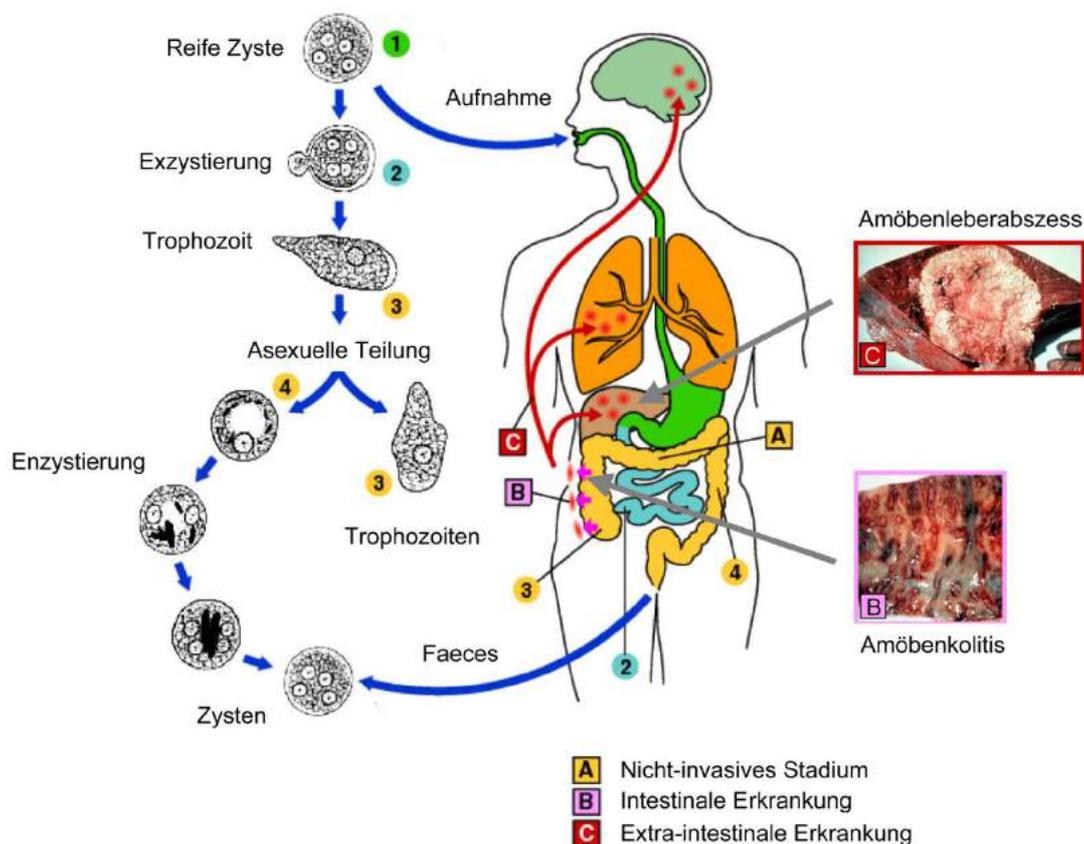


Abbildung 1: Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*

Reife Zysten von *E. histolytica* werden durch kontaminierte Lebensmittel oder Trinkwasser oral aufgenommen (1). Nach Passieren des Magens gelangen die vierkernigen Zysten in den oberen Dünndarm, wo sie durch pH Änderung excystieren und acht-kernige Trophozoiten entstehen. Durch Plasmateilung entstehen 8 einkernige Trophozoiten (2 und 3). Diese sind beweglich und besiedeln so den oberen Dünndarm (A). Bei der nicht-invasiven Verlaufsform verbleiben die Trophozoiten im Darm, vermehren sich durch eine asexuelle Zweiteilung, enzystieren sich und die Zysten werden mit dem Stuhl ausgeschieden (4). Die intestinale Verlaufsform der Infektion kennzeichnet sich durch die Schädigung der Darmmucosa und einer möglichen Amöbenkolitis (B). Bei der extra-intestinalen Verlaufsform durchdringen die Parasiten die Darmwand und gelangen in den Blutstrom zu anderen Organen wie dem Gehirn oder der Lunge und können Abszesse verursachen (C).

Quelle: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/e-histol-life.gif> (online- Lehrbuch)

Zur Therapie der nicht invasiven Verlaufsform wird Paromomycin verabreicht, das zur Gruppe der Aminoglykoside gehört (Young *et al.*, 1956). In einer Patientenstudie zeigte sich im Vergleich zur Behandlung mit Diloxanidfuroat eine um 34 % höhere Heilungsrate (Blessmann *et al.*, 2002). Paromomycin bindet dabei an die Ribosomen und blockiert so die Proteinbiosynthese der Amöben. Metronidazol, als Vertreter der Gruppe der Nitroimidazole, wird zur Therapie der invasiven Verlaufsform einer Amöbiasis über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht. Metronidazol in seiner normalen Form ist nicht aktiv, sondern muss erst an seiner Stickstoffgruppe reduziert werden, beispielsweise durch Ferredoxin, um ein Nitro-Radikalanion zu bilden, das cytotoxische Eigenschaften besitzt (Müller, 1983). Das Antibiotikum wird im Darm im Vergleich zu Paromomycin schnell resorbiert und führt bei Amöben unter anaeroben Bedingungen durch Übertragung von Elektronen auf das Ferredoxin zur Entstehung von Nitroradikalen. Die so erzeugten Radikale führen in der Amöbe zu irreparablen Schädigungen von Lipiden, Proteinen und der DNA. Die Behandlung mit Metronidazol führt bei intestinal persistierenden Trophozoiten lediglich zu einer Reduktion von 40-60 %. Daher wird zur vollständigen Eliminierung der Infektion eine kombinierte Therapie mit Paromomycin durchgeführt. Bei rechtzeitiger Diagnose und Therapie ist der Amöbenleberabszess vollständig reversibel.

1.1.3 Phylogenie

Taxonomisch teilt man *E. histolytica* in den Stamm der Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Ordnung Entamoebida, Familie Entamoebidae und der Gattung *Entamoeba* ein (Adl, 2005).

Zusätzlich zu dem pathogenen Parasiten *E. histolytica* unterscheidet man zwei weitere humaninfektiöse Spezies, die den Darm des Menschen besiedeln, ohne klinische Symptome zu entwickeln. 1925 beschrieb Emile Brumpt die nicht-pathogene Spezies *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925). Während des zweiten Weltkrieges wurde 1941 in Russland die amphizoischen Spezies *Entamoeba moshkovskii* identifiziert (Tschalaia, 1941). Der anfängliche Versuch einer Unterteilung nach mikroskopisch-morphologischen Unterschieden scheiterte anhand der hohen Ähnlichkeit der drei Spezies (Pritt und Clark, 2008). Eine schlussendliche Einteilung konnte erst durch neue Methoden wie der Isoenzymanalyse, Untersuchung repetitiver DNA Sequenzen oder Verwendung von Antikörpern erzielt werden (Clark und Diamond 1993; Tannich und

Burchard, 1991; Strachan *et al.*, 1988). Zur Untersuchung der verschiedenen Spezies nutzt man heutzutage die Analyse der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA (Clark *et al.*, 1991). Aufgrund ihrer hohen Konservierung lassen sich mittels PCR Untersuchungen phylogenetische und molekular taxonomische Einteilungen von *Entamoeba* vornehmen. War die Untersuchung zuvor auf wenige in Kultur gehaltene Isolate beschränkt, konnten nun über Stuhlproben neue Spezies wie *Entamoeba suis* identifiziert werden (Clark *et al.*, 2006).

1.1.4 Zellbiologie

Die Zellwand von *E. histolytica* besteht aus einer einfachen Zellmembran. Besonders ist hier die hohe Zahl an nicht geladenen Phospholipiden und Cholesterin zu erwähnen (Andrä *et al.*, 2004). Die Trophozoiten haben eine Bipolarität und sind in der Lage, sich durch das Bilden von Pseudopodien, fortzubewegen. Die Pseudopodien bilden sich dabei am vorderen Teil und der Uroid am hinteren Teil des Parasiten aus (Bailey *et al.*, 1992). Das Zytoskelett der Amöben ist aktinreich. Beide Strukturen bilden sich durch die Umverteilung von F-Aktin (Guillén, 1996).

Die Zysten haben einen Durchmesser von 10 – 15 µm, während die Trophozoiten einen Durchmesser von 10 – 50 µm erreichen können (Stanley, 2003). Das Endoplasma des Parasiten besteht zu 40 % aus Vakuolen und Vesikeln, die Ähnlichkeit zu cytotoxischen Vesikeln und Lysosomen höherer eukaryotischer Organismen zeigen. (Scholze und Tannich, 1994).

Obwohl lange Zeit keine Beweise für das Vorhandensein eines Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder eines Golgi Apparates (GA) erbracht werden konnten, gelang es durch Mikroskopie, Färbungen und Einsatz von spezifischen Antikörpern schließlich Vesikel zu identifizieren, deren Komponenten dem ER und GA zugeordnet werden können (Bredeston *et al.*, 2005; Gosh *et al.*, 1999; Mazzuco *et al.*, 1997). In den Trophozoiten von *Entamoeba* finden sich daneben Proteosomen im Zytoplasma und scheinen einen wichtigen Einfluss bei der Differenzierung und Replikation zu haben, wie durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren gezeigt werden konnte (Makioka *et al.*, 2002).

Eines der letzten Rätsel konnte 1999 durch die Entdeckung der Mitosomen gelöst werden (Mai *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass sie dem gleichen Vorfahren wie die normalen eukaryotischen Mitochondrien entstammen (van der Giezen und Tovar,

2005). Aufgrund der mikroaerophilen Lebensweise jedoch haben sich die Mitosomen im Laufe der Entwicklung zurück gebildet und besitzen auch kein eigenes Genom (Tovar *et al.*, 1999). Für das Mitochondrium typische Proteine wie die Chaperone Hsp10, Hsp60, Hsp70 und einem ungewöhnlichen ATP/ADP Transporter konnten in den Mitosomen lokalisiert werden (Chan *et al.*, 2005; Bakatselou *et al.*, 2007; Tovar *et al.*, 2007). Über ihre genaue Funktion wird bisher nur spekuliert, wobei jedoch die Vermutung nahe liegt, dass sie eine Rolle bei der Reifung von Eisen-Schwefel (Fe-S) Proteinen besitzen (Tovar *et al.*, 2003, Maralikova *et al.*, 2010).

1.1.5 Das Genom

Genauere Aussagen über das Genom von *E. histolytica* sind sehr schwierig. Die Chromosomen kondensieren nicht während der Mitose, wodurch deren Anzahl und die Ploidie schwer zu bestimmen sind. Daten aus einer Untersuchung mittels Pulsfeldgelelektrophorese deuten jedoch darauf hin, dass es 14 Chromosomen mit einer Größe von 0.3 bis 2.2 Mbp und einer Ploidie von 4 gibt (Willhoeff *et al.*, 1999). Nachdem Loftus und Kollegen bereits 2005 das Genom des pathogenen Isolates HM-1:IMSS mit Hilfe der *Shotgun* Methode sequenzieren konnten, wurden diese Ergebnisse 2010 von Lorenzi und Kollegen noch einmal überarbeitet (Loftus *et al.*, 2005, Lorenzi *et al.*, 2010). Das Genom von *E. histolytica* ist 20 Mbp groß und besitzt 8201 vorhergesagte Gene. Die durchschnittliche Länge eines Gens liegt bei 1260 kb und macht 49 % des Genoms aus (Lorenzi *et al.*, 2010, Clark *et al.*, 2007). Der AT Gehalt liegt mit 75.8 % erstaunlich hoch. Auffällig ist die Menge an tRNA codierenden Bereiche von 10 % (Clark *et al.*, 2007). Interessanterweise finden sich im Genom ebenfalls eine Vielzahl von metabolisierenden Enzymen, die prokaryotischen Ursprungs sind. Beispiele sind die Acetyl-CoA-Synthetase (Field *et al.*, 2000) oder die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase (Sánchez *et al.*, 2002). Man vermutet, dass diese Gene ihren Weg in das Genom des Parasiten über lateralen Gentransfer fanden (Alsmark *et al.*, 2009).

1.2 Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

Untersucht man die Pathogenität eines Mikroorganismus, so sind es die Pathogenitätsfaktoren, die ausschlaggebend sind für dessen Virulenz. *E. histolytica* zeichnet sich besonders durch seine hohe Zytotoxizität aus, sowie der Fähigkeit

menschliche Gewebe invadieren zu können. Ein wichtiger Schritt ist dabei die Adhärenz des Parasiten. Diese ist von entscheidender Bedeutung für die Lyse und Phagozytose von Wirtszellen, sowie dem Wirken von Effektormolekülen. Die Virulenz wird darüberhinaus durch andere Faktoren wie der Mortalität und der Fähigkeit des Parasiten sich der Wirtsimmunantwort entziehen zu können, definiert. Bislang konnten für *E. histolytica* drei Gruppen von Pathogenitätsfaktoren bestimmt werden, die besonders an der Adhärenz und Lyse beteiligt sind.

1.2.1 Das Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifisches Lektin (Gal/GalNAc)

Für die Adhäsion der Trophozoiten an die intestinale Mucosa des Wirtes ist das membrangebundene Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifische Lektin (Gal/GalNAc) verantwortlich (Petri *et al.*, 1996; Horstmann *et al.*, 1992).

Dieses Molekül eignet sich besonders für die Diagnose von Patienten mit einer *E. histolytica* Infektion, da es in 95 % der Seren von Patienten mit einer intestinalen Amöbiasis erkannt wird (Abd-Alla *et al.*, 2003). Es handelt sich dabei um ein 260 kDa großes, heterodimeres Protein, das aus einer schweren (Hgl) und leichten Kette (Lgl) zusammengesetzt ist, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Petri *et al.*, 2002). Obwohl bereits viel über das Molekül bekannt ist, konnte dessen genaue Rolle in der intestinalen Amöbiasis nicht vollkommen geklärt werden. Die Inhibierung von Gal/GalNAc führt zu einer verminderten Adhärenz, einhergehend mit einer verminderten Zytotoxizität (Petri *et al.*, 1987).

Die Adhäsion an Gewebe der Wirtszellen scheint daher von fundamentaler Bedeutung für die Virulenz der Trophozoiten zu sein. Darüberhinaus scheint die Hgl Untereinheit des Gal/GalNAc Komplexes einen Einfluss auf die Fähigkeit des Parasiten zu haben, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen.

1.2.2 Amoebapores

Der kontaktabhängige zytotoxische Effekt auf die Wirtszellen, nach Adhäsion an die intestinale Mucosa, entsteht durch Sezernierung einer Klasse von Molekülen, die Amoebapores genannt werden. Amoebapores dringen nach ihrer Sezernierung in die Membran der Wirtszellen ein und induzieren dort die Bildung von Kanälen (Tschopp und Nabholz, 1990).

Die Membran verliert so ihre Funktion als Barriere. Die 3 Mitglieder A, B und C, aus der Familie der Amoebapores, sind bekannt den zytotoxischen Effekt auszuüben. Es handelt sich dabei um 8 kDa große Proteine, die als Vorstufen und aktive Form in den cytoplasmatischen Granula der Trophozoiten vorkommen (Leippe und Muller-Eberhard, 1994).

Die biochemische Zusammensetzung der Membran der Amöben besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, die resistent gegen die eigene Hydrolyse durch die Amoebapores sind (Aley *et al.*, 1980). Weitere Faktoren wie die Menge an neutral geladenen Phospholipiden in Kombination mit hohen Mengen an Cholesterin scheint der Membran einen zusätzlichen Schutz zu verleihen (Leippe, 1997).

Untersuchungen haben ergeben, dass die Expression von Amoebapores für die Gewebsschädigung nicht essentiell sind, wohingegen sie für die Induktion des Leberabszesses erforderlich zu sein scheinen (Zhang *et al.*, 2004).

1.2.3 Cysteinpeptidasen

Die Cysteinpeptidasen gehören zur Klasse der Peptidasen. Weitere bekannte Familien bilden beispielsweise die Serinpeptidasen, Aspartpeptidasen und die Metalloproteasen. Durch Sequenzierung konnten bisher mehr als 50 Cysteinpeptidasen im Genom von *E. histolytica* identifiziert werden und bilden so die größte Gruppe der Peptidasen (Clark *et al.*, 2007, Tillack *et al.*, 2006). Bereits früh wurde vermutet, dass es sich dabei um eine Klasse von Molekülen mit Einfluss auf die Pathogenität von *E. histolytica* handelt (Gadasi und Kessler, 1983). Beim direkten Vergleich von Trophozoiten aus axenischer Kultur mit denen aus dem Mäusedarm konnten deutliche Unterschiede im Expressionsprofil der einzelnen Cysteinpeptidasen festgestellt werden (Gilchrist, 2007; He C *et al.*, 2010). So fanden sich *ehcp-a4*, *ehcp-a1*, *ehcp-a6* und *ehcp-a8* höher exprimiert in Proben aus Mäusedärmen. Der Einsatz des Proteaseblockers E-64 führte zu einer reduzierten ALA Bildung und deutete so auf einen Einfluss bei der invasiven Verlaufsform der Amöbiasis hin (Stanley, 1995). Das *Silencen* der wichtigsten Cysteinpeptidasen im Trophozoiten zeigte keinen Einfluss auf die Cythopathogenität (Irmer *et al.*, 2009; Ankri *et al.*, 1998), wohingegen die Überexpression der Cysteinpeptidasen *ehcp-a3*, *ehcp-a5*, *ehcp-ab8*, *ehcp-b9* und *ehcp-c13* in einer normalerweise nicht-pathogenen Zelllinien zur Ausbildung von ALA's führte und so der Einfluss auf die Pathogenität bestätigt werden konnte (Matthiesen *et al.*, 2013). Alle bisherigen Ergebnissen deuten darauf hin, dass

Cysteinpeptidasen für Hämolyse und dem Verdau von Erythrocyten verantwortlich sind, aber entbehrlich bei Phagozytose und Cythopathogenität (Irmer *et al.*, 2009). Neue Untersuchungen führten zum Auffinden neuer Cysteinpeptidasen, die Ca^{2+} abhängig sind und beim programmierten Zelltod der Trophozoiten eine entscheidende Rolle spielen (Monrey *et al.*, 2015).

1.3 Bedeutung von Kulturisolaten

Im Zuge der Untersuchung von Patienten mit einer *E. histolytica* Infektion gelang es verschiedene Amöbenisolate aus Patienten zu gewinnen und diese in axenischer Kultur zu halten. Diese Kulturisolaten sind von entscheidender Bedeutung für die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren, da sie Vergleichsstudien zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Isolaten ermöglichen. Zur näheren phänotypischen Bestimmung besteht die Möglichkeit diverser *in vitro* und *in vivo* Studien (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufner *et al.*, 2007). Als Maß der Pathogenität dient dabei die Fähigkeit, mit der im Tiermodell durch intrahepatische Injektion von Trophozoiten einzelner *E. histolytica* Isolaten, Leberabszesse induziert werden können. Für die Identifizierung potentieller Pathogenitätsfaktoren erfolgte in Vorarbeiten zu der hier vorliegenden Dissertation der Vergleich zweier Subtypen des Amöben-Kulturisolats HM-1:IMSS (Biller *et al.*, 2009; Biller *et al.*, 2010; Dissertation Matthiesen, 2012; Dissertation Fehling, 2015). Bei HM-1:IMSS handelt sich um ein Isolat, das 1967 aus einem Patienten mit Amöbenkolitis isoliert wurde. Beide Isolate wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) zu unterschiedlichen Zeitpunkten bezogen und seitdem ohne Wirtspassage *in vitro* kultiviert. Der im folgenden als Zelllinie A bezeichnete Subtyp befindet sich am BNITM seit 2001 durchgehend in axenischer, mikroaerophiler Kultur, wohingegen es sich bei Zelllinie B um einen Subtyp von HM-1:IMSS handelt, der bereits seit 1991 durchgehend in Kultur gehalten wird. Beide unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Pathogenität und eignen sich aufgrund ihres identischen genetischen Ursprungs als perfektes *Tool* zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren.

Ist für Zelllinie A keine Pathogenität festzustellen, zeigt sich Zelllinie als hoch pathogen. Durch Nutzung der *Microarray*-Technologie ergab sich nun zum ersten Mal die Chance der Analyse der Transkriptomprofile zweier *E. histolytica* Isolate mit identischem genetischem Hintergrund (Biller *et al.*, 2010).

Als Beweis der Abstammung beider Zelllinien vom Isolat HM-1:IMSS, erfolgte eine Genotypisierung hoch polymorpher t-RNAs (Ali *et al.*, 2005). Obwohl sich so zeigte, dass beide Zelllinien syngenisches sind, ist jedoch nur Zelllinie B in der Lage, Leberabszesse im Tiermodell zu induzieren (Biller *et al.*, 2009).

Die Untersuchung der beiden Zelllinien ergab charakteristische, phänotypische Unterschiede. So zeigt Zelllinie A neben einer kleineren Zellgröße eine geringere Wachstumsrate, reduzierte Cysteinpeptidaseaktivität, eine geringere Resistenz gegenüber Stress wie Hitze und reaktiver Stickstoffspezies, sowie eine gesteigerte hämolytische Aktivität. Vergleiche der Resistenz gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies und Erythrophagozytose jedoch zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Zelllinie A und B (Biller *et al.*, 2009).

Für weitere Studien wurden homogene Zellpopulationen aus den einzelnen Zelllinien in Form von jeweils 12 Klonen generiert (Dissertation Matthiesen, 2012). Zur Bestimmung der Homogenität wurden die Klone auf ihre Pathogenität untersucht und 7 Tage nach Infektion in *Meriones unguiculatus* die Leberabszessgröße ermittelt. Die Klone der Zelllinie A zeigten keine Pathogenität. Die Klone der Zelllinie B hingegen zeichnen sich durch eine hohe Streuung der Pathogenität aus. Sichtbar ist dabei eine Streuung von avirulent (Klon B8^{np}) bis hin zu hochgradig virulent (Klon B2^p) (Abbildung 2).

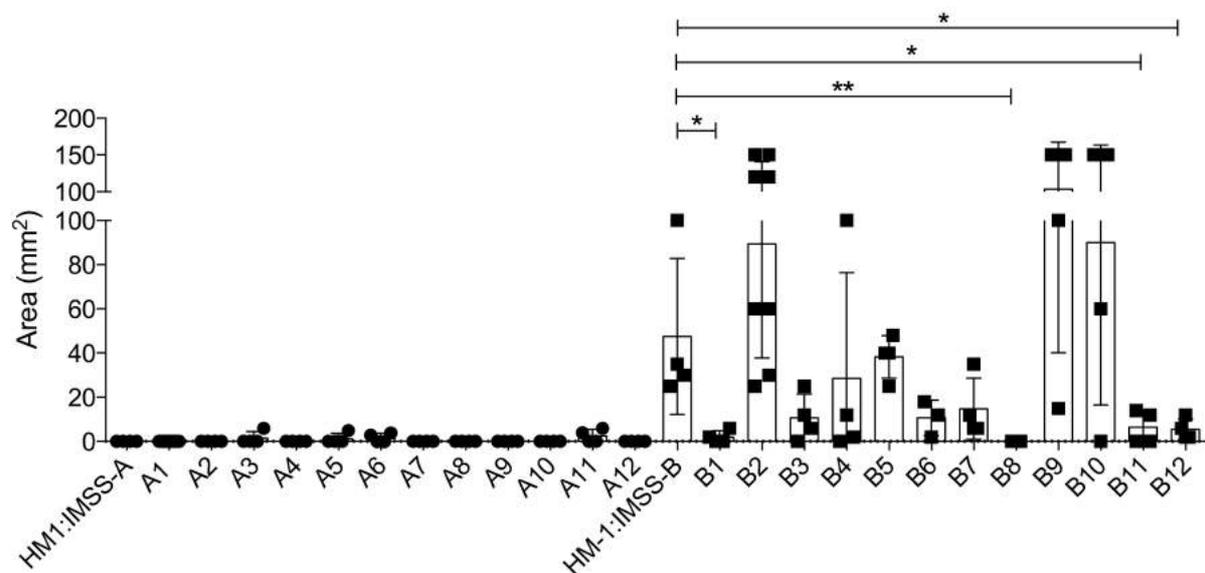


Abbildung 2: Darstellung der Amöbenleberabszessgröße 7 Tage nach intrahepatischer Injektion von $1,25 \times 10^5$ Trophozoiten der Zelllinien A und B des *E. histolytica* Isolats HM-1:IMSS sowie der Klone A1-A12 und B1-B12 in *Meriones unguiculatus* ($n = 4-6$) (Diss Matthiesen, Meyer *et al.*, eingereicht).

Die Stabilität des Phänotyps wurde durch eine Subklonierung der ausgewählten Klone überprüft und deren Stabilität so nachgewiesen.

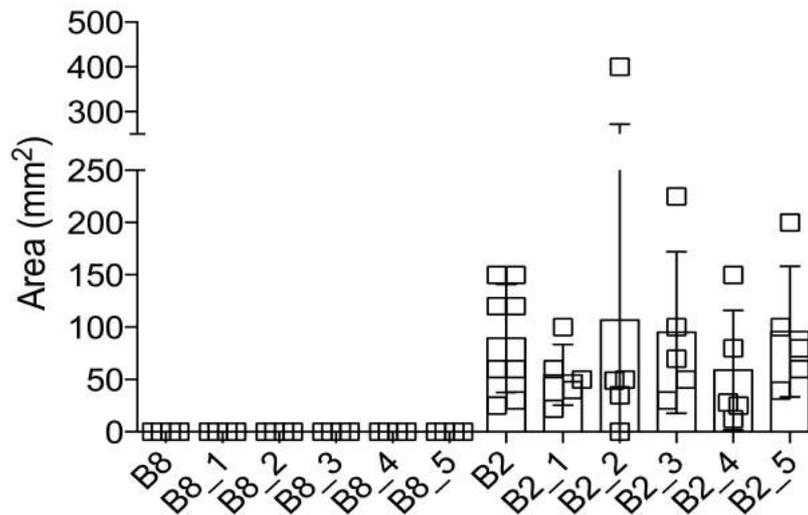


Abbildung 3: Amöbenleberabszessbildung 7 Tage nach Injektion in *Meriones unguiculatus* durch Trophozoiten der *E. histolytica* HM-1:IMSS Klone B8^{np} und B2^p und der aus ihnen generierten Subklone B8_1-B8_5 und B2_1-B2_5 (Meyer et al., eingereicht).

1.4 Methoden zur Identifizierung potentieller Pathogenitätsfaktoren

1.4.1 Vergleichende Transkriptomanalysen

Für ein genaues Verständnis der Pathogenität von *E. histolytica* ist die Identifizierung möglicher Pathogenitätsfaktoren von besonderem Interesse. Konnten anfangs lediglich Aussagen mit Hilfe von cDNA Bibliotheken im Vergleich von pathogenen und nicht pathogenen *E. histolytica* Isolaten getroffen werden, ermöglichten Studien auf Transkriptomebene mit Hilfe der *Microarray*-Technologie neue Einblicke. Ein erster Vergleich erfolgte durch die Analyse der Transkriptionsprofile zwischen den nicht-pathogenen Stämmen *E. histolytica* RAHMANN und *E. dispar* zu dem pathogenen Stamm HM-1:IMSS (Mac Farlane und Singh 2006). Mit Hilfe des DNA *Micoarrays* konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass 415 Gene in *E. dispar* und 32 Gene *E. histolytica* RAHMAN im Vergleich zu HM-1:IMSS bei einem *fold change* >2,4 herunterreguliert waren. Bei den gefundenen Kandidaten zeigte sich bei beiden nicht-pathogenen Stämmen eine Überschneidung von 29 Genen. Die meisten dieser Gene wiederum haben eine Rolle in der Stressantwort oder sind mit der Pathogenität korreliert.

Durch Nutzung des Oligonukleotid *Microarrays* konnte im Vergleich der Transkriptionsprofile zwischen *E. histolytica* HM-1:IMSS und *E. histolytica* RAHMANN noch sensitiver nach regulierten Genen gesucht werden (Davis, 2007). Dabei fanden sich 152 Gene differentiell hochreguliert (*fold change* >2; *padj* <0.01) in HM-1:IMSS und 201 Transkripte in *E. histolytica* RAHMANN. Überraschenderweise jedoch zeigten sich nur 8 Übereinstimmungen mit den Ergebnissen von MacFarlane.

Eine Untersuchung der Expressionsunterschiede zwischen *E. histolytica* RAHMAN und *E. histolytica* HM-1:IMSS unter Nutzung der 2 D Gelelektrophorese und einem *fold change* >5 zeigte 6 differentiell synthetisierte Proteine, wobei 3 höher in HM-1:IMSS und 3 Gene höher in *E. dispar* gefunden wurden (Davis *et al.*, 2006). Bei den drei Genen die höher in HM-1:IMSS reguliert gefunden wurden handelt es sich um ein cysteinreiches LIM Domänen Protein, eine ADH3 (Alkoholdehydrogenase) und das Peroxiredoxin. In *E. dispar* hingegen wurden die Superoxiddismutase, sowie Grainin 1 und 2 in größerer Menge nachgewiesen. Interessanter Weise gab es keine Überschneidungen mit den zuvor identifizierten Kandidaten.

Die bis dahin vorgenommenen Vergleiche erfolgten zumeist zwischen der pathogenen Zelllinie HM-1:IMSS und den nicht-pathogenen Zelllinien *E. histolytica* RAHMANN und *E. dispar*. Obwohl jeweils mehrere Proteine als differentiell exprimiert nachgewiesen werden konnten, zeigen sich nur wenige Überschneidungen. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass Vergleiche zwischen den beiden Zelllinien, aufgrund ihres unterschiedlichen genetischen Ursprungs, ungeeignet sind.

Bei der Untersuchung von 6242 bekannten Genen von *E. histolytica* (Stand 2004), konnten 87 Gene mit einem *fold change* von >2 gefunden werden, wobei 47 Gene höher in Zelllinie A und 40 Gene höher in Zelllinie B exprimiert waren. 39 dieser Gene konnten biologische Funktionen zugeordnet werden, die besonders in der Stressantwort, dem Transport in der Zelle, Signaltransduktion und RNA/DNA Metabolismus eine Rolle spielen. Daneben sind es ebenfalls Lektine, Peptidasen und Mitglieder der AIG Familie, die sich identifizieren ließen. 48 Gene wiederum sind in ihrer biologischen Funktion unbekannt und daher bei den hypothetischen Proteinen eingeordnet. Im Vergleich der Ergebnisse von Davis und Kollegen konnten für die pathogenen Zelllinien B und HM-1:IMSS 5 Überschneidungen identifiziert werden (Davis *et al.*, 2007). Diese sind die EhCP-A4, AIG, hsp70, XM_643005 und ein hypothetisches Protein.

Durch den Einsatz neuer Technologien wie der mRNA-Sequenzierung ist man nun in der Lage, noch genauere Unterscheidungen bei Splicevarianten vorzunehmen, die durch die

Microarray-Technologie zuvor nicht getrennt werden konnten. Aufgrund ihrer höheren Spezifität ist diese Methode geeignet, noch genauer die Unterschiede im Transkriptionsprofil zu analysieren (Zhong *et al.*, 2010).

1.4.2 Strukturaufklärung von Proteinen

Das genaue Wissen über die Wirkungsweise eines Enzyms ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der biochemischen Vorgänge in einem Organismus. Eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen ist die Röntgenstrukturanalyse. Die Voraussetzung dafür jedoch sind Proteinkristalle von geeigneter Größe und Zusammensetzung. Dabei werden Röntgenstrahlen am Kristallgitter gestreut und anhand des Beugungsmusters die Elektronendichte für jede Aminosäure bestimmt. Diese Methode ermöglicht eine genaue Lokalisation der einzelnen Aminosäuren in der Peptidkette, sowie die Lage der einzelnen Aminosäuren im dreidimensionalen Raum. Auch für die Identifizierung pharmakologischer Angriffspunkte einer Infektion mit *E. histolytica* konnten durch die Röntgenstrukturanalyse bereits interessante Ergebnisse erzielt werden. Heterotrimere G-Protein Signalwege bilden beispielsweise einen guten Angriffspunkt für pharmakologische Manipulationen (Gilchrist, 2007). Besonders in der Motilität, Zellanheftung und Cysteinpeptidasen Sekretion von *E. histolytica* spielen diese eine entscheidende Rolle. Der RGS-RhoGEF Komplex als Mitglied der Rho-GTPase Signalproteine fungiert als Effektormolekül der alpha-Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins und bildet so einen geeigneten Angriffspunkt für Inhibitoren. Das Lösen der Struktur konnte in diesem Fall ein tiefergehendes Verständnis in der Evolution und dreidimensionalen Anordnung des RGS-RhoGEF Komplexes liefern (Bosch *et al.*, 2013). Auch die Bedeutung des Calcium bindenden Protein-5 und dessen Beteiligung in der Phagozytose von humanen Erythrozyten konnte eindrucksvoll gezeigt werden (Kumar *et al.*, 2014). Für das tiefergehende Verständnis in der Pathogenität des Parasiten fungiert die Röntgenstrukturanalyse daher als geeignetes Verfahren, besonders zur Analyse der hypothetischen Proteine, die 34 % des Genoms von *E. histolytica* ausmachen (Lorenzi, 2010).

1.5 Alkoholdehydrogenasen in *E. histolytica*

Die Einteilung der Enzyme erfolgt anhand ihrer katalysierten Reaktionen durch die „International Union of Biochemistry“ in 6 Klassen. Ihre Benennung wird durch das EC-Nummern-System mit je 4 Zahlen festgelegt. Die erste Zahl gibt den Reaktionstyp an, die zweite Zahl Aufschluss über die funktionelle Gruppe, die dritte Zahl ein weiteres Merkmal der Reaktion und die vierte Zahl eine fortlaufende Nummer zur Einteilung (Liese, Wiley-VCH). Die Oxidoreduktasen der Klasse 1 katalysieren dabei Redoxreaktionen und sind abhängig von Cofaktoren wie NAD(P)⁺ und FAD. Dehydrogenasen bilden eine Untereinheit der Oxidoreduktasen. Als Teil der Dehydrogenasen kommt den Alkoholdehydrogenasen mit der Nomenklatur EC 1.1.1.1 eine wichtige Rolle zu. Sie sind in der Natur ubiquitär verteilt und kommen in allen untersuchten Organismen vor.

Die Substratspezifität kann bei den Alkoholdehydrogenasen stark variieren. Man unterscheidet NAD(P)⁺-abhängige und NAD(P)⁺-unabhängigen Vertreter, wobei diese noch weiter unterteilt werden können. Eine erste Einteilung der ADHs erfolgte anhand der Aminosäuresequenz in 3 Klassen (Vallee und Bazzone, 1983; Reid und Fewson, 1994). Gruppe I bilden dabei die langkettigen, metallabhängigen ADHs mit mehr als 350 Aminosäuren. Als Metallion enthalten sie hauptsächlich Eisen und Zink. In Gruppe II finden sich kurzkettige ADHs von 250 Aminosäuren Länge, die sich durch die Abwesenheit von Metallionen auszeichnen. Gruppe III bilden ADHs mit einer Länge von 385 Aminosäuren. Wurden bisher lediglich Mitglieder aus Mikroorganismen dieser Gruppe zugeschrieben, konnte inzwischen aber ein homologes Gen im Menschen identifiziert werden. (Deng *et al.*, 2002, Henandes-Tobias *et al.*, 2011). Strukturell ähneln die ADHs der Gruppe III nicht denen der Gruppe I und II. (Elleuche *et al.*, 2013). Zwei weitere Klassen konnten seitdem im Menschen gefunden werden (Moreno und Parés, 1991; Yasunami *et al.*, 1991) gefolgt von einer sechsten in Nagetieren (Höög, 1995) und einer siebten im Huhn (Kedishvili *et al.*, 1997).

Bei der Suche nach neuen Therapeutika gegen die Amöbiasis steht die Forschung an Alkoholdehydrogenasen von *E. histolytica* bereits seit Langem im Fokus. Durch 2D-Gelelektrophorese konnte so eine ADH gefunden werden, die differentiell zwischen dem pathogenen Stamm *E. histolytica* und dem nicht-pathogenen Stamm *E. dispar* exprimiert wird (Davis, 2009). Auch der Einsatz von Alkoholdehydrogenasen als rekombinant

exprimiertes Protein für serodiagnostische Analysen von *E. histolytica* infizierten Patienten konnte bereits erfolgreich gezeigt werden (Kimura *et al.*, 1996).

Phylogenetische Analysen der Alkoholdehydrogenasen deuten darauf hin, dass diese durch lateralen Gentransfer in das Genom von *E. histolytica* integriert wurden und so das Repertoire an Stoffwechselwegen im Parasiten erhöht haben (Loftus und Anderson, 2005).

1.6 Zielsetzung

Obwohl die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren in der Forschung an *E. histolytica* von zentraler Bedeutung ist, gelang es bisher nicht, den genauen Mechanismus der Virulenzentstehung aufzuklären.

Eine Möglichkeit Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren, ist der direkte Vergleich von pathogenen und nicht-pathogenen *E. histolytica*-Isolaten. Allerdings wurden in bisherigen Studien nur Isolate miteinander verglichen, deren genetischer Ursprung unterschiedlich ist.

In einer vorherigen Arbeit gelang es nun, zwei Zelllinien (A und B) aus dem Isolat HM-1:IMSS zu generieren, die sich in ihrer Fähigkeit unterscheiden Amöbenleberabszesse (ALAs) im Tiermodell zu induzieren. Auch alle aus der Zelllinie A generierten Klone (A1-A12) waren nicht-pathogen. Die aus Zelllinie B generierten Klone zeigten allerdings eine starke Streuung in der Pathogenität von hoch pathogen bis nicht-pathogen.

Für diese Arbeit bestand nun die einmalige Möglichkeit den pathogenen Klon B2^p mit dem nicht-pathogenen Klon B8^{np}, beide generiert aus der Zelllinie B des Isolates HM-1:IMSS, miteinander auf Transkriptionsebene zu vergleichen.

Die so als differentiell exprimiert gefundenen, potentiellen Pathogenitätsfaktoren sollen auf ihren Einfluss im Tiermodell überprüft werden. Dazu sollten Überexpressions-Transfektanten in dem jeweiligen Klon mit der geringeren Transkription generiert werden. Anhand der Überexpression sollte analysiert werden, welchen Einfluss die entsprechenden Gene auf die ALA-Bildung durch *E. histolytica* haben.

Kandidaten mit einem Einfluss auf die Pathogenität sollen mittels mRNA-Seq folgend näher auf Transkriptionsebene untersucht werden. Ziel ist es so Signalwege zu identifizieren, die durch die Überexpression beeinflusst werden.

Für die weitere Charakterisierung der potentiellen Pathogenitätsfaktoren sollte durch deren rekombinante Expression die Lokalisation im Trophozoiten ermöglicht werden. Darüberhinaus soll neben der Enzymaktivität auch die dreidimensionale Struktur entschlüsselt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Software

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Geräte sowie die verwendeten Software aufgelistet.

Gerät	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf
<i>Genepulser</i> TM	BioRad
Primus 25 advanced	<i>PeqLab</i>
<i>Rotor-Gene 3000</i>	<i>Corbett Life Science</i>
<i>Tank-Electroblotter PerfectBlue</i> TM	<i>PeqLab</i>
Ultraschallgerät <i>Sonifier 250</i>	Branson

Software	Hersteller
MacVektor 11.0	Accelrys
<i>Rotor-Gene real time Analysis 6.0</i>	<i>Corbett Life Sciences</i>

2.2 Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, sowie deren jeweilige Bezugsquelle werden in der nachstehenden Tabelle aufgelistet.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well-Platten mit rundem Boden	Sarsted
Einmalimpfösen	Carl Roth
Einmalpipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt
Gene Pulser® Küvetten 4 mm	Bio Rad
Kulturflaschen 250 mL, 50 mL, 25 mL	Falcon
Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83	Schleicher&Schuell Biosciences
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen gestopft, nicht gestopft	Greiner <i>Bio-One</i> , Sarstedt
Röntgenfilme	Kodak
Safe-Lock-Tubes 0.5 mL, 1.5 mL, 2 mL	Eppendorf
Skalpelle (Einweg)	B. Braun Aesculap
<i>Stericup</i> ®	<i>Millipore Cooperation</i>
Sterilfilter 0.2 µm	Sarstedt
<i>STRIP Tubes</i> 0.1 mL für <i>Rotor Gene</i>	<i>Corbett Research</i>
UVette	Eppendorf
Whatman-Papier	Biometra

2.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit 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) bezogen. In der nachstehenden Tabelle wurden die Ausnahmen ergänzend aufgelistet.

Chemikalie	Hersteller
<i>Diamond Vitamin Tween 80 Solution</i>	<i>JRH Biosciences</i>
Tricol Reagent	ambion

2.4 Marker und Ladepuffer

Marker	Hersteller
DNA-Ladepuffer 6x Loading Dye	Fermentas
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas

2.5 Assay-Systeme

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> ™	Fermentas
RNase A	Invitrogen
<i>RNase free DNase</i>	Qiagen
<i>RNase Out</i>	Invitrogen
<i>Superscript III</i> ™ Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase	Promega

2.6 Puffer und Lösungen

Na PBS (1x), pH 6,8	
Na ₂ HPO ₄	6,7 mM
NaH ₂ PO ₄	3,3 mM
NaCl	140 mM

PBS (10x), pH 7,4	
Na ₂ HPO ₄	570 mM
KH ₂ PO ₄	180 mM
NaCl	750 mM

TBE (10x)	
Tris	850 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	25 mM

TBS (10x)	
Tris-HCl, pH 8,0	150 mM
NaCl	1 M

TE (10x)	
Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
EDTA, pH 8,0	5 M

Trenngelpuffer für PAGE	
(4x Tris/SDS pH 8,8)	
Trisbase	1.5 M
SDS	0.4 %
steril filtrieren	

Sammelgelpuffer für PAGE	
(4x Tris/SDS pH 8,8)	
Trisbase	500 mM
SDS	0,4 %
steril filtrieren	

Laufpuffer (10x) für PAGE	
Trisbase	250 mM
Glycin	1.9 M
SDS	1 %

Transferpuffer (1 x) (Towtrin-Puffer), pH 8,3	
Tris	25 mM

GST Elutionspuffer, pH 7,5	
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

Gelpuffer (3x) Tricingele, pH 8,45	
Trisbase	3 M
SDS	0,3 %

Kathodenpuffer (10x) Tricingele, pH 8,25	
Trisbase	1 M
Tricine	1 M
SDS (w/v)	1 %

Anodenpuffer (10x) Tricingele, pH 8,9	
Trisbase	2 M

Proteinprobenpuffer (2x), (Laemmli <i>et al.</i> 1970), pH 6,8	
Tris Pure	125 mM
Glycerin (v/v)	20 %
SDS (w/v)	2 %
Bromphenolblau (w/v)	0,25 % vor Gebrauch 10 mM DTT hinzugeben

Puffer A für unlösliche Proteine, pH 8,0	
TrisHCl	10 mM
Na ₃ PO ₄	100 mM

Puffer B für unlösliche Proteine, pH 8,0	
TrisHCl	10 mM
Na ₃ PO ₄	100 mM
Urea	8 M

Puffer A + 1 M GuHCl

Puffer C für unlösliche Proteine, pH 6,3	
TrisHCl	10 mM
Na ₃ PO ₄	100 mM
Urea	8 M

Puffer A + 4 M GuHCl

Coomassie-Entfärber	
Methanol (v/v)	45 %
Eisessig (v/v)	10 %
dH ₂ O (v/v)	45 %

Puffer C + 20 mM Imidazol

Puffer C + 500 mM Imidazol (Elutionspuffer)

Coomassie-Färbelösung	
Methanol (v/v)	50 %
Eisessig (v/v)	10 %
dH ₂ O (v/v)	40 %
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250 (w/v) 0.05%	

Lösung A (ECL-Detektion)	
TrisHCl (pH 6,8) 200 mL	0.1 M
Luminol	50 mg
Lagerung bei 4 °C	

Lösung B (ECL-Detektion)	
DMSO	10 mL
<i>Para</i> - Hydroxycoumarinsäure	11 mg
Dunkel lagern bei RT	

Lösung C (ECL-Detektion)	
H ₂ O ₂	30 %
Lagerung bei 4 °C	

Elektroporationspuffer, (Cytomix inkomplett)	
KCl	120 mM
CaCl ₂	0.15 mM
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6)	10 mM
HEPES (pH 7,6)	25 mM
EDTA (pH 7,6)	2 mM

Elektroporationspuffer, (Cytomix inkomplett)	
KCl	120 mM
CaCl ₂	0.15 mM
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6)	10 mM
HEPES (pH 7,6)	25 mM
EDTA (pH 7,6)	2 mM
MgCl ₂	5 mM
ATP	18 mg
L-Glutathion	24 mg

HEPES	
HEPES	10 mM

Triton X-100	
1 % Triton X-100 in 1 x NaPBS	

Arbeitslösung ECL-Detektion	
Lösung A	5 mL
Lösung B	500 uL
Lösung C	1.5 uL

TAE (50 x)	
NaAcetat x 3H ₂ O	5 mM
Tris Pure	40 mM
Na ₂ EDTA	2 mM

2.7 Kulturmedien und Medienzusätze

2.7.1 LB-Medium und LB-Agar

LB-Medium: Lennox L Broth Base 20g
ad 1 L dH₂O, autoklavieren

LB-Agar: Lennox L Broth Agar 32g
ad 1 L dH₂O, autoklavieren

2.7.2 Kulturmedien

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

Zusammensetzung für 4350 mL inkomplettes Medium:

Bezeichnung	Menge	Hersteller
Trypticase	100 g	Bacton, Dickinson and Company
Hefeextrakt	50 g	Bacton, Dickinson and Company
Glucose	50 g	Roth
NaCl	10 g	Roth
K ₂ HPO ₄	3,8 g	Merck
KH ₂ PO ₄	3 g	Merck
L-Cystein	5 g	US Biological
Ascorbinsäure	1 g	Prolarbo
Fe(III)-Ammoniumcitrat	0,114 g	SIGMA-ALDRICH

Die Komponenten des TY-I-SS-Mediums wurden auf 4350 mL H₂O_{bidest.} aufgefüllt und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf pH 6.8 eingestellt. Zur Sterilisierung wurde das inkomplette Medium in einem Dampfkochtopf bei einem Druck von 1.4 bar auf 120°C erhitzt und o autoklaviert. Das Medium wurde durch Zugabe von 50 mL inaktiviertem Rinderserum (2 x 30min bei 56°C hitzeinaktiviert), 15 mL *Diamond Vitamin Tween 80 Solution*, 270 µg/mL Streptomycin und 130 µg/mL Penicillin vor Gebrauch komplettiert.

Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/mL	100 µg/mL	SIGMA-ALDRICH
G418-Sulfat	50 mg/mL	10-20 µg/mL	Pan Biotech
Kanamycin	50 mg/mL	50 µg/mL	SIGMA-ALDRICH
Streptomycin	125 mg/mL	270 µg/mL	Roth
Penicillin	60 mg/mL	130 µg/mL	Roth

2.10 Organismen

2.10.1. *Entamoeba histolytica*

Systematik von *Entamoeba histolytica*

Domäne: Eukaryota
 Stamm: Amoebozoa
 Klasse: Archamoeba
 Gattung: *Entamoeba*
 Art: *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)

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:

Hierbei handelt es sich um einen pathogenen Stamm, der 1964 aus einem Patienten mit Kolitis isoliert wurde. Mittlerweile werden verschiedene Subtypen dieses Stammes in Kultur gehalten.

HM-1:IMSS Zelllinie A:

Hierbei handelt es sich um ein Isolat, welches im TIGR-Sanger-Genomprojekt sequenziert (Loftus *et al.*, 2005).

HM-1:IMSS Zelllinie B:

Diese Zelllinie zeigt eine hohe Pathogenität im Tiermodell und ist syngenisches zu Zelllinie A. Seit ihrer Isolierung wurde Zelllinie B durchgängig ohne Wirtspassage in axenisch, mikroaerophiler Kultur gehalten. Die Pathogenität wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst.

2.10.2 *Mus musculus*

Systematik von *Mus musculus*

Stamm: Chordata
 Klasse: Mammalia
 Ordnung: Rodentia

Überfamilie: Muroidae
 Familie: Muridae
 Unterfamilie: Murinae
 Gattung: *Mus* (Mäuse)
 Art: *Mus Musculus* (LINNAEUS, 1785)

2.10.3 *Escherichia coli* - Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21 (DE3) pAPlac ^Q	HsdS, gal(λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV-T7 gen1) [pAPlac ^Q]	Dr.O. Fayet, Toulouse
OneShotTop10 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

Plasmid	Größe (Kb)	Beschreibung	Referenz
pCR ⁺ 2.1-TOPO [®] Vector	3,9	siehe Produktbeschreibung	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX-6P-2	4,9	siehe Produktbeschreibung	GE Healthcare
pJC45	2,4	Amp ^r , colE1 ori, T7-Polymerase unter λ p _L -lacOperator, 10His, Faktor Xa, Terminator	Clos und Brandau 1994
pNC	6,0	Neo ^r , 5'/3'-Aktinbereiche und Lektinpromotor aus <i>E. histolytica</i>	Hamann <i>et al.</i> , 1995

2.12 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins Operon synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in TE-Puffer auf eine Konzentration von 100 μ M gelöst und daraus eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10 μ M hergestellt. Eine Ausnahme bildeten die Primer für die semiquantitative Real-Time PCR, die auf eine Konzentration von 5 μ M eingestellt wurden.

2.13 Zellkultur von *E. histolytica*

2.13.1 Kultivierung von *E. histolytica*

Zur Kultivierung unter mikroaerophilen, axenischen Bedingungen wurden die Trophozoiten in Kulturschalen (mit einem Volumen von 25, 75 bzw. 250 mL) mit komplettiertem TY-I-SS Medium bei 35°C kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage durch Schütteln in einer definierten Menge Medium gelöst und ein bestimmter Teil davon entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit in eine neue Flasche überführt und mit komplettiertem TY-I-SS Medium aufgefüllt. Der Rest der Zellen wurde nach dem Umsetzen verworfen.

2.13.2 Klonierung von *E. histolytica*

Zur Generierung einer genetisch homologen Kultur von Trophozoiten wurden die Zellen einer Kulturschale in 5 mL TY-Medium gelöst und 10 µL dieser Zellsuspension in eine Neugebauer Zählkammer pipettiert und 4 der Großquadrate ausgezählt. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurde folgende Formel angewandt:

Zellzahl aller 4 Großquadrate / 4 = \emptyset (Durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat)

$\emptyset \times 10000 = \text{Zellen pro mL}$

Zellen pro mL / 1000 = Zellen pro µL

Um eine Verdünnung mit einer Konzentration von einer Zelle pro µL zu erhalten wurde 1 µL der Zellsuspension in der zuvor berechneten Menge Medium verdünnt. 40 µL dieser Verdünnung wurden dann anschließend wiederum in 30 mL TY-Medium überführt und je 200 µL davon pro Well in eine 96-Well Platte pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 7 Tage im Anaerob-Topf bei 35°C inkubiert. Nach einer Woche wurde die 96-Well Platte aus dem Anaerob-Topf genommen und mikroskopisch analysiert. Sind Amöben angewachsen, wurden diese in eine Kulturschale (25 mL) überführt und weiter kultiviert.

2.13.3 Zellernte von *E. histolytica*

Zur Isolierung von genomischer DNA oder RNA wurden aus einer Kulturschale mit einschichtigem Zellrasen 10^6 Trophozoiten nach Auszählen mittels einer Neubauerzählkammer in eine neue 75 mL Kulturflasche überführt. Die Zellernte erfolgte 24 h nach dem Aussähen durch Lösen in 5 mL TY-Medium. Die Trophozoiten wurden für 4 min bei $1400 \times g$ sedimentiert und vor der Isolierung zweimal mit je 10 mL NaPBS gewaschen.

2.13.4 Transfektion von *E. histolytica*

Für die Generierung der in dieser Arbeit verwendeten Überexprimierer wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Hierbei wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Bildung temporärer Poren in der Zellmembran der Trophozoiten begünstigt, durch die dann wiederum Vektor-DNA in die Zelle gelangen kann. Wie in Abschnitt 2.13.3 beschrieben wurden ca. 1×10^7 Zellen aus einer Kulturflasche geerntet. Nach zweimaligem Waschen der Trophozoiten mit NaPBS erfolgte eine Waschung mit inkompletem Cytomix. Kurz vor der Elektroporation wurden 8 mL Cytomix durch die Zugabe von 2,5 mg/mL ATP und 3 mg/mL reduziertem Glutathion komplettiert und die Zellen in 3,4 mL kompletten Cytomix resuspendiert. 800 μ L Zellsuspension wurden zu 100 μ L Vektor-DNA Lösung mit einer Konzentration von 100 μ g gegeben und durch auf- und abpipettieren vermischt. Die Elektroporation fand bei 1200 V und 25 μ F zweimal in einem Abstand von 2 s statt. Die Zeitkonstante betrug je nach ionischer Stärke und dem daraus resultierenden Widerstand 0,4–0,6 ms. Die Zellen wurden anschließend in eine 75 mL Kulturflasche mit zuvor vorgewärmtem TY-Medium überführt und für 48h bei 35°C kultiviert. Zur Selektion der positiv transformierten Trophozoiten wurde in die Kulturschale das Neomycin-Analogon G418 in einer Konzentration von 10 μ g/mL gegeben.

2.14 Bakterienzellkultur

2.14.1 Anzucht von Bakterien

Für die Vermehrung von Vektor-DNA wurden verschiedene *Escherichia coli* Stämme verwendet (siehe 2.10.3). Diese wurden in LB-Medium unter aeroben Bedingungen bei

37°C in Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (180 rpm) angezüchtet. Für die Generierung einzelner Klone wurde ein Ausstrich auf einer LB-Agarplatte angefertigt.

2.14.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Fähigkeit DNA-Moleküle aufzunehmen, erlangen Bakterienzellen durch die Behandlung mit CaCl₂. *E.coli* paplaq Zellen wurden in 40 mL LB-Medium bei 37°C in einem Erlenmeyerkolben unter Zugabe von 40 µL Kanamycin (50 mg/mL) bis zu einer OD600 von 0,4 wachsen gelassen.

2.15 Isolierung von Nukleinsäuren

2.15.1 Isolierung genomischer DNA aus *E.coli*

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit Hilfe des Invitrogen EasyDNA Kit, gemäß dem Protokoll der Herstellerangaben. Die DNA wurde in TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

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

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des 5 Prime *Fast Plasmid Mini Kit*, gemäß dem Protokoll der Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

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

2.16.1 RNA-Isolierung mit TRIzol (Invitrogen)

Für die Isolierung der RNA wurde TRIzol, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die die Integrität der RNA erhält, während die Zellen und Zellbestandteile lysiert werden, verwendet. Das Trophozoitensediment wurde nach Zugabe von 1 mL TRIzol Reagenz durch Auf- und Abpipettieren aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 200 µL Chloroform durch mehrfaches Invertieren. Nach einer weiteren Inkubation von 3 min bei RT erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4 °C und 11500 x g. Von den drei

deutlich erkennbaren Phasen wurde die obere vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µL Isopropanol gefällt. Nach einem erneuten Waschschriff mit 1 mL 70 % EtOH wurde das RNA-Sediment für 5 min bei 56°C im Heizblock getrocknet und die RNA im Anschluss in 100 µL HPLC-Wasser durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gelöst. Zu Steigerung der Reinheit wurde die RNA zusätzlich über das *RNeasy-Kit* und anschließend dem DNase-Verdau gereinigt.

2.16.2 RNA-Reinigung und DNA-Verdau mit *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen)

Zu weiteren Reinigung der RNA erfolgte die Anwendung des *RNeasy-Mini-Kit*, unter Einhaltung der Herstellerangaben. Die in 100 µL gelöste RNA wurde durch Zugabe von 350 µL RLT-Puffer unter invertieren und 250 µL EtOH 100 % mit anschließendem Mischen mittels Auf- und Abpipettieren versetzt und auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation bei 11500 x *g* für 30 sec erfolgte die Reinigung der Säule durch Zugabe von 350 µL RW-1 Puffer und erneuter Zentrifugation. Es folgte ein DNA-Verdau auf der Säule mit dem *RNase-Free DNase Set* nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 40 µL HPLC-H₂O eluiert.

2.17 DNA-Analysen

2.17.1 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA- und RNA Proben wurden diese mittels photometrischer Messung bei 260 nm untersucht. Für eine optische Dichte von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/mL und für RNA eine Konzentration von 40 µg/mL angenommen. Zur Bestimmung der Reinheitswerte wurde zusätzlich das Verhältnis von OD_{260nm} zu OD_{280nm} bestimmt. Eine reine DNA-Lösung zeichnete sich dabei durch einen Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} von 1.8 und eine reine RNA-Lösung durch 2.0 aus (Sambrook *et al.*, 1989)

2.17.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA, für analytische und präparative Zwecke, wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Aufgrund der negativen Ladung der DNA kann

diese im elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wandergeschwindigkeit der DNA ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Je nach spezifischer Größe des DNA-Fragments wurde eine Agarosekonzentration von 0,8 – 2 % (w/v), in 1 x TBE-Puffer gelöst, eingesetzt. Zur Beladung der Proben wurden diese je mit 6 x Ladepuffer versetzt, zusätzlich als Größenvergleich ein DNA-Längenstandard mit aufgetragen und das Gel bei 120 V aufgetrennt. Durch die Zugabe des Farbstoffs Ethidiumbromid (0,1 µg/mL), das mit der DNA interkaliert, konnten die DNA-Fragmente im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden.

2.17.3 DNA-Extraktion und Präparation aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten wurden diese nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese unter schwachem UV-Licht und Benutzung eines Skalpell ausgeschnitten und gereinigt. Die Reinigung erfolgte unter Einsatz des *NucleoSpin Extract II Kit* von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Je nach Stärke der spezifischen Banden wurden diese in 15-50 µL TE-Puffer eluiert.

2.17.4 DNA Sequenzanalysen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen (*Sanger et al.*, 1977) wurden von der Firma Eurofins zur Bestimmung der Korrektheit der Sequenz der amplifizierten DNA-Fragmenten durchgeführt. Für die Überprüfung der Sequenz der in den TOPO-Vektor klonierten spezifischen Gene, dienten die Oligonukleotide M13F und M13R. Die Sequenzanalyse erfolgte über die Firma SeqLab mit der *Software Mac Vector*®.

2.18 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.18.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* wurde die Methode der Polymerasen-Kettenreaktion gewählt (*Huguchi et al.*, 1988). Als Matrize diente dabei isolierte genomische DNA aus *E. histolytica* und bereits klonierte DNA-Vektor Konstrukte. Mittels zweier gegenläufig gebundener Oligonukleotide wurde der

spezifische Bereich enzymatisch exponentiell amplifiziert. Die PCR besteht dabei aus drei zyklisch ablaufenden Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize (*Annealing*) und anschließender DNA-Synthese (*Elongation*).

Ein 50 µL-Reaktionsansatz sah dabei wie folgt aus:

Taq-Puffer (5x) (Promega)	10 µL
dNTP's (10mM)	5 µL
MgCl ₂ (25mM)	5 µL
Oligonukleotid Fwd (10 µM)	1 µL
Oligonukleotid Rev (10 µM)	1 µL
Taq-Polymerase (5 U/µL)	0,9 µL
Pfu-Polymerase (2,5 U/µL)	1 µL
DNA	1 µL
HPLC-H ₂ O	ad. 50 µL

Thermocycler-Programm:

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

Die für das *Annealing* gewählte Temperatur ist für jede Polymerase-Kettenreaktion abhängig von der Länge, Spezifität und dem GC-Gehalt der Oligonukleotide und variiert daher. Die Elongationszeit ergibt sich aus der Länge des zu synthetisierenden DNA-Fragments. Die *Taq*-Polymerase schafft dabei 500 bp in 30 sec. Die für die Klonierung in den TOPO-Vektor benötigten A-Überhänge fügt die Polymerase in der finalen Elongation an.

2.18.2 Restriktionsanalyse von DNA

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten sowie dem Überprüfen eines spezifischen Gen-Abschnittes auf seine Korrektheit, wurde die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, gemäß den Herstellerangaben, verdaut. Für analytische Zwecke wurden 2 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µL eingesetzt. Bei präparativen Ansätzen wurden bei einem Reaktionsvolumen von 50 µL 20-40 µg DNA mit 1-2 U Enzym/µg verdaut. Die Inkubation erfolgte dabei bei 37 °C für 15–30 min.

2.18.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von Fragmenten mit Adenosinüberhang in den Vektor pCR2.1 TOPO wurde das TOPO TA-*Cloning Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

Bei DNA-Fragmenten die spezifisch verdaut wurden erfolgte zunächst eine Aufreinigung mittels Extraktion aus Agarosegelen (siehe Abschnitt 2.17.3) und der anschließenden Ligation mit Hilfe der T4-Ligase von Fermentas über Nacht bei 14°C. Das Verhältnis von spezifisch verdaulichem Vektor zu DNA-Fragment betrug dabei 1:3 in einem Reaktionsansatz von 15 µL.

Vektor und Fragment (Verhältnis 1:3)	max. 10 µL
Ligationspuffer (10x)	1,5 µL
T4-Ligase (5 U/µL)	1 µL
ATP (25 mM)	2,5 µL
ad 15 µL mit H ₂ O	

Der Ansatz wurde nach Inkubation in OneshotTop10-Zellen transformiert.

2.19 RNA-Analysen

2.19.1 Erstrangsynthese (cDNA Synthese)

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des *SuperScriptIII-First-Strand-Synthesis System-Kit* (Invitrogen). Für das Umschreiben der mRNA aus einem Pool aus Gesamt-RNA wurde der Oligo(dT)-Primer (Invitrogen) eingesetzt, der spezifisch mit dem 3`-

Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA hybridisiert. In einem Reaktionsansatz von 20 μL wurden die folgenden Mengen eingesetzt:

RNA	1 μg
Synthesepuffer (5 x)	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	0,4 μL
H ₂ O	ad 20 μL

Die cDNA Synthese erfolgte 1h bei 42°C und die Lagerung des Reaktionsansatzes anschließend bei -20°C. Die so generierte cDNA wurde für quantitative *Real-Time*-PCR Analysen verwendet (siehe Abschnitt 2.19.2).

2.19.2 Quantitative *Real-Time* PCR

Zur Analyse der quantitativen Genexpression wurde die Methode der *Real-Time* PCR angewendet. Die Stärke des zu untersuchenden Zielgens (*gene of interest* (GOI)) wird dabei in Relation zu einem Referenzgen (*normalizer gene*), welches keiner Regulation unterliegt (*housekeeping gene*), gesetzt.

Unterschiedliche Ausgangsmengen an cDNA werden dabei durch das Referenzgen ausgeglichen. Als Referenzgen diente in dieser Arbeit α -Actin. Durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR *Green* 1, kann die Zunahme der Menge an DNA während der PCR gemessen werden. Das SYBR *Green* I ist ein Cyanin-Farbstoff und interkaliert mit der DNA. Durch Anregung eines Lasers bei 522 nm wird ein Signal imitiert, das dann wiederum durch einen Detektor gemessen werden kann. Die Zunahme des amplifizierten Produkts kann so in Echtzeit mitverfolgt werden. Falsch positive Signale durch *Primer*-Dimere und unspezifische Produkte wurden durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR detektiert und so ermittelt. Der Zeitpunkt, ab dem die Amplifizierung des Zielgens exponentiell erfolgt bezeichnet man als Schwellenwert (*threshold cycle*). Dieser ist als der Moment definiert, in dem das

Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Bei Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode wird zunächst die Differenz (Δ) der C_T -Werte von Zielgen und Normalisierung ermittelt:

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

Im Anschluss wird der erhaltene Δ -Wert ins Verhältnis zum Kalibrator (Kontrollprobe) gesetzt:

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

Die relative Expression eines Zielgens im Verhältnis zum Kalibrator ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$2^{-\frac{\Delta\Delta C_T}{T}}$$

Ein 20 μL Reaktionsansatz für die Quantitative Real-Time PCR sah wie folgt aus:

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

Für die Negativkontrolle wurde statt der cDNA 1 μL HPLC-H₂O dazu gegeben.

Das Cyclerprogramm für die PCR sah wie folgt aus:

Initiale Denaturierung	95 °C	-	1 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	-	15 s	
Annealing	58 °C	-	20 s	
Elongation	68 °C	-	20 s	

Zur Analyse möglicher Primer-Dimere und unspezifischer PCR-Produkte wurde im Anschluss eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Hierzu werden die Proben in 1 °C Schritten von 55 °C auf 95 °C erhitzt.

2.19.3 Überprüfung der RNA Integrität

Zur Bestimmung der Integrität der in dieser Arbeit verwendeten RNA, wurde die isolierte Gesamt-RNA mit dem Agilent RNA 6000 Pico Kit am Bioanalyzer, unter Einhaltung der Herstellerangaben, überprüft.

2.19.4 Herstellung von NGS-Bibliotheken aus Gesamt-RNA

Zum Vergleich der *in vitro* kultivierten *E. histolytica*-Klone B2 und B8 während der frühen Phase der Amöbenleberabszessbildung nach intrahepatischen Injektion der Trophozoiten, wurde RNA isoliert und vergleichende Transkriptom-Analysen vorgenommen. Im Anschluss an die Überprüfung der Integrität und Qualität der zu untersuchenden RNAs erfolgte ein DNase-Verdau zur Eliminierung möglicher DNA Kontaminationen mit Hilfe des TURBO DNA-free Kit (Ambion). Unter Verwendung des AGENCOURT RNA Clean XP Beads (Beckman Coulter) und dem Ribo-Zero Magnetic Gold Kit (Human/Mouse/Rat) (Epicenter) erfolgte anschließend die RNA-Depletion. Dieser Schritt führt zu einer 99 %igen Reduktion der zytoplasmatischen rRNA (28S, 18S, 5.8S, 5S) und ca. 99 % der mitochondrialen rRNA (12S, 16S). Im nächsten Schritt wurden die rRNA depletierten Proben mit dem RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen) gereinigt und mittels Nanodrop und Bioanalyzer auf Integrität und Qualität überprüft. Die rRNA-Kontamination durch die 18S rRNA muss unter 5 % liegen.

Zur Erstellung der NGS-Bibliotheken wurde mit dem ScriptSeq v2 RNA-Seq *Library Preparation Kit* (Epicenter) weiter gearbeitet. Im ersten Schritt erfolgt dabei die Fragmentierung der Proben und anschließender Anlagerung von Random Hexameren, die mit einer 5'-Markierungs-Sequenz versehen sind. Nach Entfernung der RNA erfolgt die Inkubation der cDNA mit Oligonukleotiden, die eine Markierungssequenz mit einem geblockten 3'-Ende besitzen. Im dritten Schritt wird die zweifach markierte cDNA gereinigt und über Oligonukleotide, mit Adapter-Sequenz, mittels PCR amplifiziert. Während der PCR wurden die Proben mit verschiedenen Indices (*Barcodes*) versehen und so eine spätere, gemeinsame Analyse (*Multiplexing*) in einem mRNA-Seq-Lauf

ermöglicht. Unter Verwendung des AGENCOURT AMPure PCR Purification Kit (Beckmann Coulter) erfolgte die Aufreinigung und folgende Überprüfung der Qualität und Quantität der DNA-Fragmente mit dem Agilent HS DNA Kit (Agilent) und dem Qubit DNA HS Kit (Life Technologies).

Die so erstellten NGS-Bibliotheken waren nun bereit zur Cluster-Amplifikation und Sequenzierung über die Illumina Plattform. Die Sequenzierung erfolgte am Illumina MiSeq unter Verwendung MiSeq Reagent Kit v3 mit freundlicher Unterstützung der AG Horstmann.

2.20 Proteinbiochemische Methoden

2.20.1 Rekombinante Expression

Für die rekombinante Expression bestimmter Gene von *E. histolytica*, wurden diese zunächst in pAPlacI^Q Zellen transformiert. Die Übernachtskultur wurde nach 12 h in 500 mL LB-Medium mit 500 µL Ampicillin (100 mg/mL) und 500 µL Kanamycin (50 mg/mL) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-1 wachsen gelassen. Nach Erreichen der entsprechenden Dichte wurden die Expression durch Zugabe von IPTG induziert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 12 h erfolgte die Zellernte bei 4 °C und 4000 x *g* für 15 min. Bis zum Aufschluss erfolgte die Lagerung der Zellsedimente bei -20 °C.

2.20.2 Reinigung der GST markierten rekombinant exprimierten Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde das Zielgen in den Expressionsvektor kloniert. Dieser zeichnet sich durch ein GST-Peptid aus, das ebenfalls mitkodiert und N-terminal am exprimierten Protein lokalisiert ist. Für den Aufschluss der Zellen wurde das Bakteriensediment in Puffer A ohne GuHCl gelöst und 3 x 1 min mit jeweils 1 min Pause zwischen den Sonifizierungsvorgängen auf Eis beschallt und anschließend für 30 min bei 4°C und 10000 x *g* zentrifugiert. Im Überstand befinden sich nun die löslichen Proteine. Zum Lösen der unlöslichen Proteine wurde das Sediment in Puffer A mit 1 M GuHCl gelöst, 10 min im Ultraschallbad behandelt und bei 10000 x *g* für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde im Anschluss mit Puffer A mit 4 M GuHCl wiederholt. Die drei Überstände wurden zum Überprüfen der einzelnen Fraktionen auf das gesuchte Proteine mittels Western-Blot Analyse (siehe Abschnitt 2.20.9) untersucht. Zur

Detektion wurde ein anti-GST-Peptid Antikörper benutzt, der spezifisch das GST-Peptid erkennt und bindet.

Konnte das gesuchte Protein in einer der Fraktionen detektiert werden, wurde mit dieser weiter gearbeitet. Vor der Verwendung der GST-Sepharose, wurde diese mit 30 mL Puffer, entsprechend dem Überstand in dessen Puffer das spezifische Protein detektiert werden konnte, über Nacht schwenkend bei 4°C äquibriert. Zur Aufreinigung im *Batch*-Verfahren wurden 2 mL GST-Sepharose zur Proteinfraction gegeben und 1 h bei RT schwach rührend inkubiert. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgten alle Waschschrirte unter dreimaliger Wiederholung. Zur Elution wurde das auf der Säule gebundene Protein für 3 h bei 4 °C schwenkend mit Protease versetzt. Dank einer spezifischen Schnittstelle zwischen Protein und GST-*tag* konnte das Protein von der Säule getrennt werden und bindet aufgrund eines eigenen GST-Peptids nach dem Verdau ebenfalls an der Säule. Die Lagerung der Eluate erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 1 % Glycerin.

2.20.3 Herstellung von Proteinextrakten aus *E.histolytica*

Zur Generierung der Amöbenextrakte wurde die „freeze and thaw“-Methode angewendet. Die Trophoziten wurden am Vortag ausgesät, nach 12 h geerntet und mit 10 mL kaltem NaPBS gewaschen. Zum Schutz der Proteine vor Verdau durch zelleigene Proteasen wurde zu den Amöben 30 µM E64, einem Cysteinprotease-Inhibitor, gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen durch fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und auftauen bei RT lysiert. Durch Zentrifugation (15 min/13000 x *g*/4° C) wurden die unlöslichen Fraktionen sedimentiert und von den löslichen Fraktionen getrennt. Das Zellsediment wurde anschließend zweimal mit je 1 mL NaPBS gewaschen und final in 200 µL NaPBS+1% TritonX100 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13000 x *g* wurde der Überstand mit den enthaltenen, membranständigen Proteinen abgenommen und fraktioniert.

Die aliquotierten Überstände wurden zum Schutz vor Proteolyse zusätzlich sofort in Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der mit E64 behandelten Proben erfolgte im Anschluss bei -20 °C.

2.20.4 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie dient zur Trennung von Proteinen anhand ihrer Größe und hydrodynamischen Radien. Die Trennung erfolgt über eine Matrix (stationäre Phase). Große Moleküle werden zuerst eluiert, während kleine Moleküle durch die Poren der Matrix wandern und so zeitverzögert eluieren. Die Gelfiltration erfolgt über eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade* Säule mit einem Säulenvolumen von 120 mL. Für die FPLC wurde das ÄKTAPrime System unter Nutzung eines zuvor filtrierten und entgasten Puffers verwendet. Das maximale Probenvolumen beträgt 2 mL. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation der Probe für 5 min bei 4 °C und 13000 x *g* abgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit betrug jeweils 0,5 mL/min. Das Eluat wurde in 2 mL Fraktionen aufgefangen. Zur Bestimmung der molekularen Masse und des Oligomerisierungszustandes wurde zuvor ein definierter Größenstandard, in dem selben Probenpuffer, laufen gelassen. Als Molekulargewichtsstandards dienten Ferritin (450 kDa), Aldolase (160 kDa), Conalbumin (76 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuklease A (14 kDa).

2.20.5 Anionenaustauscherchromatographie

Bei der Anionenaustauscherchromatographie binden Proteine durch eine elektrostatische Wechselwirkung an einer positiv geladenen Matrix. Der pH-Wert, die Salzkonzentration des Puffers und die Bindungseffizienz der Probe sind dabei von entscheidender Bedeutung. Für eine Aufreinigung mittels Anionenaustauscherchromatographie sollte der pH-Wert der Probe im negativen Bereich liegen. Die Elution der Proteine erfolgte nach dem Waschen der Säule durch Einsatz eines kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0-1 M NaCl). Je nach Oberflächenladung eines bestimmten Proteins, binden diese unterschiedlich stark an die Matrix und werden so bei verschiedenen Salzkonzentrationen von der Säule eluiert und voneinander abgetrennt. Für die Beladung der HiTrep Anionenaustauschersäule wurde eine P1-Pumpe mit einer Laufgeschwindigkeit von 1-2 mL/min genutzt. Die Aufreinigung erfolgte anschließend an einer ÄKTA-Prime FPLC.

2.20.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteingemischen wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli 1970). Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld hängt von ihrer Gesamtladung, dem Molekulargewicht und ihrer Form ab. Das anionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) sorgt für das Aufbrechen der Quartär-, Tertiär-, und Sekundärstruktur der Proteine. Die Zugabe von DTT im 2 x Ladepuffer reduziert Disulfidbrücken. Das Probengemisch wurde zusätzlich für 5 min bei 95 °C erhitzt und der Prozess der Denaturierung so beschleunigt. Die Proteine liegen nun in ihrer Primärstruktur vor. Das SDS kann sich gleichmäßig anlagern und sorgt für eine negative Ladung der Proteine die proportional zu ihrer Größe ist. Die Auftrennung der Proteine-SDS-Komplexe erfolgte so ausschließlich nach ihrem Stokes-Radius und damit dem Molekulargewicht. Die Auftrennung erfolgte nach Probenbehandlung durch SDS-Polyacrylamidgele. Die Auftrennung der Proteine im Gel wurde durch die Menge an Acrylamid und daraus resultierende Porengröße reguliert. In Abhängigkeit der Proteingröße wurde zuerst ein 12%iges SDS-Trenngel nach Laemmli gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Acrylamidpolymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. Für kleine Proteine (<25 kDa) wurden Tricin-Gele verwendet um eine bessere Auftrennung im niedermolekularen Bereich gewährleisten zu können. Hierzu wurde ein 16%iges Trenngel nach Schaeffer und von Jagow (1987) gegossen und mit einem 4%igem Sammelgel überschichtet.

Lösungen	Tricin-Gele		SDS-Gele	
	Trenngel 16%	Sammelgel 4%	Trenngel 16%	Sammelgel 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	0,65
Trenngelpuffer pH 8.8 (mL)	-	-	2,82	-
Sammelgelpuffer pH 6.8 (mL)	-	-	-	1,25
H ₂ O (mL)	1	6,45	3,9	3,05
APS (25% w/v) (µL)	25,6	24	75	25
TEMED (µL)	7,5	7,5	15	5

2.20.7 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Färbung der Gele wurden diese für 1h in Coomassie-Lösung gefärbt und mit Entfärbelösung inkubiert, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Das Gel wurde dann anschließend in Wasser aufbewahrt. Die Färbung der Proteine basiert auf der Eigenschaft von Coomassie-Brilliantblau als Triphenylmethanfarbstoff mit basischen Aminosäuren (Arg, Tyr, Lys, His) der Proteine interagieren zu können (de Moreno 1986).

2.20.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte über den BCA-Test der Firma Pierce nach Herstellerangaben.

2.20.9 Western-Blot Immunodetektion

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurde die Methode des Western-Blots verwendet. Dabei werden Proteine aus einem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Für diese Arbeit wurde die Methode des Tank-Blot Verfahrens angewendet. Nachdem das Gel wie in Abschnitt beschrieben laufen gelassen wurde, erfolgte der

Blotaufbau wie folgt: Fasermatte, 3 Whatmanpapiere, Gel, Membran, 3 Whatmanpapiere, Fasermatte. Um einen luftblasenfreien Zusammenbau zu garantieren wurde der Blot vor Auflage der zweiten Fasermatte mit einer Stabpipette vorsichtig gewalzt. Der Aufbau erfolgte von der Kathodenseite zur Anodenseite. Die Kassette mit dem Blot-Sandwich wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer überführt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 400 mA unter ständigem Rühren des Puffers.

Die Detektion der Proteine erfolgte durch Anwendung spezifischer Antikörper. Zum Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Membran für 30 min in einer Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBS/0,05 % Tween 20) inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung auf die Membran gegeben und dieses bei 4°C für 12 h schwenkend inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für je 10 min TBS gewaschen und erneut für 30 min mit Blockierlösung behandelt um freie Bindungsstellen zu sättigen. Die Membran wurde danach für 1 h mit dem HRP konjugierten Sekundärantikörper, gelöst in Blockierlösung, für 1 h bei RT behandelt und erneut dreimal je 10 min mit TBS gewaschen.

2.20.10 Thermal Shift Assay

Zur Bestimmung möglicher Bindungspartner eines Proteins wurde ein Thermal Shift Assay durchgeführt. Dies geschieht mittels Stabilitätsmessung des Proteins anhand seiner thermischen Entfaltung in Anwesenheit verschiedener Metallionen. Zur Analyse der Entfaltung des Proteins wird das Fluorophor SYPRO Orange verwendet. Das Fluorophor wird in wässriger Lösung gequenchet. Mit zunehmender Temperatur kommt es zur Entfaltung des Proteins, wodurch hydrophobe Bereiche freigelegt werden, an die das SYPRO Orange binden kann und so Fluoreszenz emittiert wird. Mit steigender Proteindenaturierung kommt es zur Erhöhung der Fluoreszenz λ Ex 492 nm und Emission λ Em 610 nm. Die Ansätze werden im 96 Well Format schrittweise von 20 °C auf 90 °C im Real-Time PCR System erhitzt und die Stabilität des Proteins unter Einfluss von Eisen, Magnesium, Mangan, Nickel, Kupfer und Calcium mit einer Zielkonzentration von 3 mM bestimmt. Die Daten wurden in einer Excel Kalkulationstabelle der Abteilung Virologie am BNITM ausgewertet.

Ein 25 μL Reaktionsansatz für die Quantitative *Real-Time* PCR sah wie folgt aus:

Protein (0,5 mg/mL)	5 μL
Elutionspuffer (5 x)	5 μL
Metallion (25 x)	1 μL
SYPRO Orange (1:80)	2 μL
HPLC-H ₂ O	12 μL

2.20.11 Kristallisierung von Proteinen

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist die Generierung von Proteinkristallen von entscheidender Bedeutung. Hierzu macht man sich die Eigenschaft von Proteinen zu nutze eine geordnete kristalline dreidimensionale Form anzunehmen. Die wichtigsten Voraussetzungen für den Übergang der flüssigen in die feste Phase ist die Proteinkonzentration und die Konzentration des Präzipitantes (Abbildung 4).

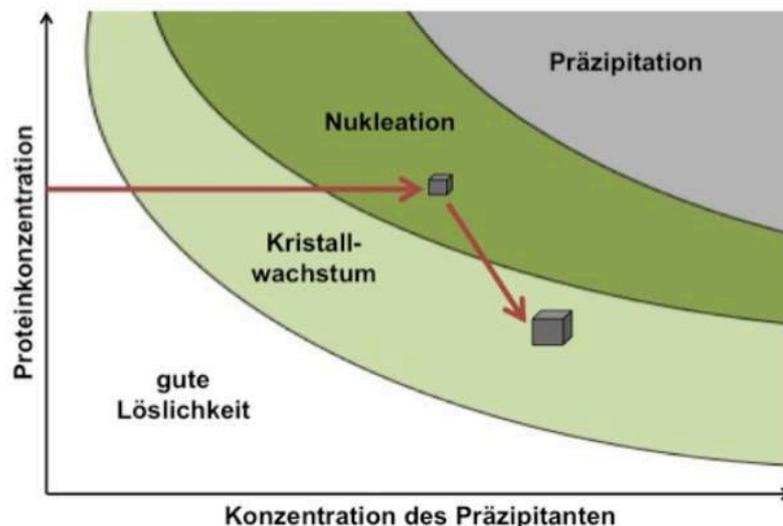


Abbildung 4: Phasendiagramm der Proteinkristallisation

Im Phasendiagramm sind die verschiedenen Phasen gezeigt, in denen sich das Protein abhängig von der eigenen und der Präzipitantenkonzentration befinden kann. In der Präzipitationsphase ist das Protein instabil und fällt aus. Ein amorpher Niederschlag ist im Tropfen sichtbar. Nach Erreichen der geeigneten Konzentration an Protein und Präzipitant kommt es in der labilen Zone zur Nukleation. Durch Verringerung der Proteinkonzentration kommt es in der metastabilen Phase zum Kristallwachstum. (Abbildung Dissertation Lehmann 2014)

Entscheidend für die Kristallisation ist die Löslichkeitsgrenze des Proteins. Erst in einer übersättigten Lösung kommt es durch Keimbildung oder auch Nukleation genannt, zur Kristallentstehung. Im metastabilen Bereich kommt es im Folgenden zum Kristallwachstum in alle drei Dimensionen. Eine übersättigte Lösung jedoch führt nicht immer zur Bildung von Kristallen. Parameter wie der pH-Wert, die Temperatur oder das Vorhandensein von Salzen und Polymeren haben einen entscheidenden Einfluss auf die Kristallisation. Das Auftreten von Präzipitant weist auf denaturiertes Protein hin. Das Ziel der Proteinkristallisation ist es nun die Parameter so anzupassen, dass es zur Keimbildung und Kristallwachstum kommt. In dieser Arbeit wurde dazu die Methode der Dampfdiffusion im 96-Well Format angewendet. Das Protein wurde 1:1 mit einer Reservoirolösung vermischt und in eine muldenartige Vertiefung auf einem Steg pipettiert. Aufgrund der verminderten Konzentration an Fällungsmittel im Tropfen kommt es durch Dampfdiffusion von Wasser aus dem Tropfen in das Reservoir zum Ausgleich der Fällungsmittelkonzentration. Durch den Anstieg der Protein- und Präzipitantkonzentration kommt es im Tropfen im Idealfall zum Erreichen des labilen Übersättigungsbereiches, in dem die Nukleation stattfindet. Durch das Absinken der Proteinkonzentration kommt es zum Erreichen der metastabilen Phase in der das Kristallwachstum stattfinden kann. Das Verfeinern der Kristallisationsbedingungen fand nach Auswertung der Kristallisations-Screenings im 24-Well Format statt. Für die Unterscheidung zwischen Protein- und Salzkristallen wurden Polarisationsfilter und Blau- verwendet. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Kristalle mittels SDS-PAGE.

2.21 Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Generierung polyklonaler Antikörper wurden jeweils 4 Balb/c Mäusen 50 µg eines spezifischen Proteins gespritzt. Die erste Immunisierung erfolgte unter Zugabe von komplettem Freund's-Adjuvans (Sigma), einer Wasser-in-Öl-Emulsion die abgetötetes *Mycobacterium tuberculosis* zur Verstärkung der Immunantwort enthält, *intra peritoneal* injiziert. Eine zweite und dritte Immunisierung mit jeweils 50 µg Protein erfolgte, ebenfalls *intra peritoneal* injiziert, nach jeweils 2 Wochen unter Zugabe von inkomplettem Freund's-Adjuvans. Nach sechswöchiger Inkubation wurde den Tieren mittels einer Herzpunktion Blut entnommen. Diese Versuchsteile fanden freundlicherweise unter Aufsicht von PD Dr. med. vet. H. Lotter statt.

Das durch Herzpunktion gewonnene Blut wurde bei 4 °C über Nacht zur vollständigen Gerinnung inkubiert und im Anschluss 5 min bei 400 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Serum, in Form des Überstandes, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Abtrennung eventueller Reste wurde das Serum erneut bei 2300 x *g* zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Die so gewonnenen polyklonalen Antikörper wurden zum Nachweis und Lokalisation in Western-Blot-Analysen und bei der Immunfluoreszenzfärbung von Trophozoiten verwendet.

2.22 Immunfluoreszenzanalyse

2.22.1 Immunfluoreszenzfärbung von *E.histolytica*

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden am Vortag wie in Abschnitt 2.13.3 Trophozoiten ausgesät und nach 24 h geerntet. Nach einem Waschschriff mit 1 x NaPBS wurde das Trophozoiten-Sediment vorsichtig in 1 mL 3 % PFA-NaPBS resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert.

Die nun fixierten Zellen wurden geteilt, kurz zentrifugiert (2,5 min/200 x *g*/RT) und der Überstand verworfen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde ein Teil der Zellen mit Saponin behandelt, um so dem Antikörper Zugang zum Intrazellularraum zu verschaffen. Die Zellen wurden in 500 µL frisch angesetztem Saponin (0,05 % Saponin in in NaPBS) für 5 min inkubiert, während der andere Teil lediglich mit 500 µL NaPBS bei RT behandelt wurde.

Beide Proben wurden anschließenden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Blockierung freier Aldehydgruppen erfolgte durch Inkubation der fixierten Zellen für 15 min in einer 50 mM Ammoniumchloridlösung. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und mit 1 x NaPBS gewaschen. Nach dem erneuten Sedimentieren wurde das Zellsediment in 500 µL 2 % FCS-Lösung resuspendiert und so freie Antikörper-Bindungsstellen blockiert. Dies geschieht für 10 min bei RT im Thermomixer. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen erneut mit 500 µL NaPBS gewaschen. Anschließend wurde auf das Sediment der primäre Antikörper gegeben.

Als primärer Antikörper dient in diesem Fall der selbst generierte Antikörper aus BalbC Mäusen in einer Verdünnung von 1:100. Der Antikörper wurde mit NaPBS verdünnt und für 1 h dunkel im Thermomixer bei RT inkubiert. Am Anschluss folgt eine Zentrifugation

sowie dreimaliges waschen mit NaPBS. Als zweites wird der fluoreszenzmarkierte Antikörper *goat* anti-mouse ALEXA Fluor 488 (grün) 1:400 verdünnt und zur Färbung des Zellkerns Hoechst in einer Konzentration von 1:1000 ebenfalls dazu gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei RT, abgedunkelt im Thermomixer mit anschließender Zentrifugation und freimaligem Waschen durch Zugabe von NaPBS. Für die Detektion wurden die Zellen in 200 μ L NaPBS aufgenommen und dunkel bei 4°C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleichende Transkriptom-Analysen

3.1.1 Vergleichende Transkriptom-Analysen des pathogenen Klons B2^p mit dem apathogenen Klon B8^{np}

Zur Identifizierung potentieller Pathogenitätsfaktoren stehen verschiedene klonale Zelllinien des Isolates HM1:IMSS zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Pathogenität (definiert als Fähigkeit ALAs zu bilden) unterscheiden. Mittels Transkriptom-Analyse durch mRNA Sequenzierung des pathogenen Klons B2^p mit dem nicht-pathogenen Klon A1^{np} konnten in einer vorhergehenden Untersuchung 76 Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden (*fold change* von ≥ 3 , *padj* < 0.05) und somit möglicherweise in der ALA-Bildung involviert sein (siehe Tabelle 1). Zur Identifizierung weiterer möglicher Pathogenitätsfaktoren erfolgte die Analyse axenisch kultivierter Trophozoiten des pathogenen Klons B2^p mit dem nicht-pathogenen Klon B8^{np}. Überraschenderweise zeigten sich dabei lediglich 19 Gene, die differentiell exprimiert wurden zwischen beiden Klonen. 12 Gene konnten identifiziert werden die in B8^{np} höher exprimiert sind als in B2^p (siehe Tabelle 2).

Tabelle 1. Gene differentiell höher exprimiert in Klon B8^{np} im Vergleich zu Klon B2^p (threshold ≥ 3.0 , *padj* ≤ 0.05)

	Gen ID	Expressionslevel		<i>fold change</i>	<i>padj</i>	Produkt
		Klon B8 ^{np}	Klon B2 ^p			
1	EHI_062960	64,90	7,85	8,26	0,00806	hypothetisches Protein
2	EHI_183400	37,64	566	6,64	0,02770	Galaktose inhibierende 35 kDa Lektin Untereinheit
3	EHI_048140	771,02	160,91	4,79	0,00114	hypothetisches Protein
4	EHI_058920	1548,15	360,65	4,29	7,462E-08	hypothetisches Protein
5	EHI_026360	137,56	33,05	4,16	0,00114	Phosphoserinaminotransferase
6	EHI_037160	102,17	26,67	3,83	0,01207	hypothetisches Protein
7	EHI_039020	356,95	101,96	3,50	0,03229	Aktobindin
8	EHI_088020	821,37	234,45	3,50	0,28544	Alkoholdehydrogenase
9	EHI_151930	521,04	156,15	3,33	0,00017	hypothetisches Protein
10	EHI_160670	252,40	76,60	3,29	0,00514	Alkoholdehydrogenase 3
11	EHI_180390	216,17	69,98	3,09	0,00611	AIG1 Protein
12	EHI_056490	290,45	98,02	2,96	0,00514	hypothetisches Protein

Padj: Adjusted *p*-value

Für die meisten Gene die in B8^{np} erhöht exprimiert gefunden wurden, lag der *fold change* zwischen 3-5. Den höchsten *fold change* zeigte mit einem Wert von 8.26 das Gen EHI_062960, sowie mit einem Wert von 6.64 das Gen EHI_183400 (Galaktose inhibierende Lektin 35 kDa Untereinheit). Bei Betrachtung der Expressionsprofile zeigte

sich in den gefundenen 12 in B8^{np} höher exprimierten Kandidaten eine starke Variation der Expressionsniveaus (Expressionslevel ca. 5 – 1500).

Die *fold change* Werte der in B2^p differentiell hochregulierten Gene lag höher als die der in B8^{np} hochregulierten Gene. Mit einem 45 fachen Expressionsrate zeigt das Gen EHI_127670 (hypothetisches Protein) den größten Expressionsanstieg beim Vergleich zwischen dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} und dem pathogenen Klon B2^p. Mit einem 14.31 fachen Expressionsanstieg folgt das Gen EHI_073680 (Leucin reiches Protein).

Tabelle 2. Gene differentiell höher exprimiert in Klon B2^{np} im Vergleich zu Klon B8^p (*threshold* ≥ 3.0, *padj* ≤ 0.05)

	Gen ID	Expressionslevel		<i>fold change</i>	<i>padj</i>	Produkt
		Klon B2 ^{np}	Klon B8 ^p			
1	EHI_127670	806,03	17,69657648	45,54	0,00017	hypothetisches Protein
2	EHI_073680	149,05	19,46774451	14,31	8,914E-17	Leucin reiches Protein
3	EHI_144490	1086,69	94,76770315	11,46	5,624E-22	hypothetisches Protein
4	EHI_062080	6,71	40,72199698	6,07	0,02179	hypothetisches Protein
5	EHI_191730	96,40	27,58393181	3,49	0,01942	hypothetisches Protein
6	EHI_144610	661,91	201,7370164	3,28	0,00017	Methioningammalyase
7	EHI_057550	556,94	175,7481139	3,16	0,00046	Methioningammalyase

Padj: Adjusted *p-value*

12 der 19 differentiell exprimierten Gene gehören zu den hypothetischen Proteinen, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Bei den restlichen handelte es sich um eine Phosphoaminotransferase, Alkoholdehydrogenase, Methioningammalyase, Aktobindin, AIG 1 Familien Protein und einem Galaktose inhibierendem Protein. Eine Charakterisierung erfolgte bisher jedoch lediglich von der Methioningammalyase und der Galaktose inhibierenden 35 kDa großen Untereinheit.

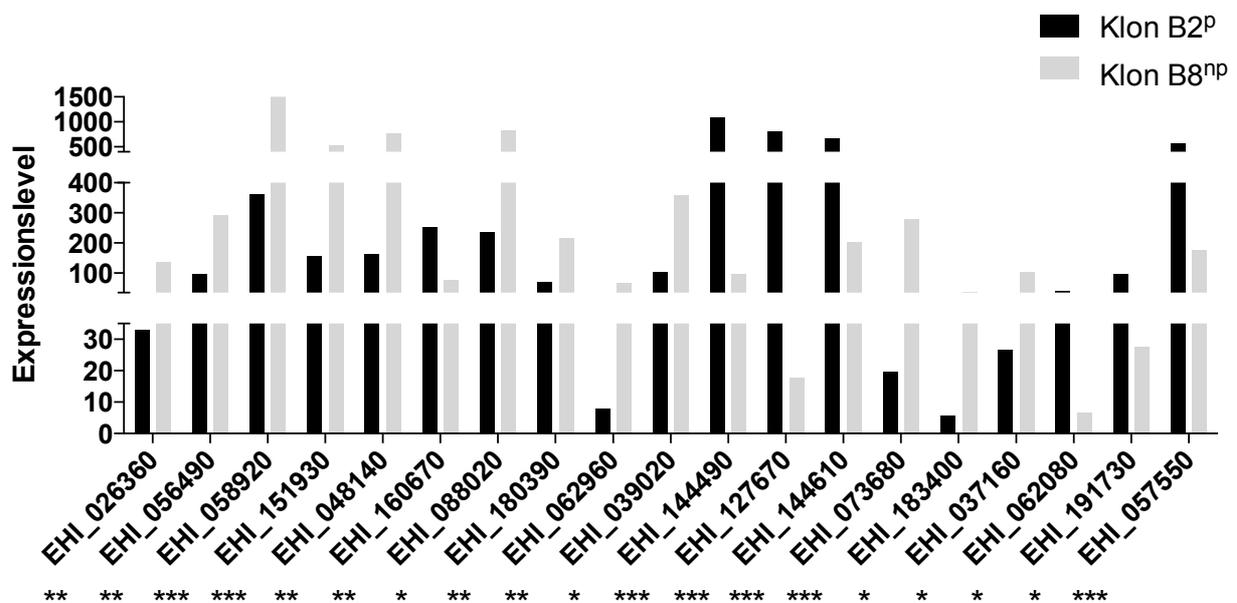


Abbildung 5: Expressionsprofile der zwischen dem pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} signifikant differentiell exprimierten Genen

Die Expressionsprofile der *in vitro* kultivierten Trophozoiten der *E. histolytica* Klone B2^p und B8^{np} wurden mittels mRNA-Seq analysiert. Die Signifikanz der Expressionsprofile gliedert sich wie folgt: ****p*_{adj} ≤ 0,001; ***p*_{adj} ≤ 0,01; **p*_{adj} ≤ 0,05.

3.1.3 Analyse der differentiell exprimierten Gene zwischen dem pathogenen Klon B2^p und den apathogenen Klonen A1^{np} und B8^{np}

Wurden bisher lediglich differentiell exprimierte Proteine zwischen dem pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon A1^{np} (Dissertation Helena Fehling, 2015) sowie dem pathogenen Klon B2 und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} bestimmt, sollten nun Überschneidungen der potentiellen Pathogenitätsfaktoren untersucht werden.

Der Vergleich der 19 zwischen B2^p und B8^{np} höher exprimierten Genen im Vergleich mit den 76 differentiell exprimierten Genen, die beim Vergleich von A1^{np} mit B2^p gefunden wurden, zeigte eine Übereinstimmung von lediglich 6 Genen (siehe Tabelle 3).

Dabei handelt es sich um die Gene EHI_127670, EHI_144490 und EHI_144610, die im pathogenen Klon B2^p hoch und in den nicht-pathogenen Klonen B8^{np} und A1^{np} herunterreguliert sind. Die Gene EHI_039020, EHI_026360 und EHI_056490 wiederum konnten in den nicht-pathogenen Klonen A1^{np} und B8^{np} im Vergleich zum pathogenen Klon B2^p als hochreguliert gefunden werden.

Tabelle 3: Gene differentiell höher exprimiert zwischen dem Klon B2^p im Vergleich mit den Klonen Klon B8^{np} und A1^{np} (*threshold* ≥ 3.0 , *padj* ≤ 0.05)

	Gen ID	Expressionslevel		<i>fold change</i>	<i>padj</i>	Produkt
		Klon B2 ^{np}	Klon A1 ^p			
1	EHI_127670	2314,73	12,01	192,59	0,000297752	hypothetisches Protein
2	EHI_144490	3579,49	19,75	181,19	8,61268E-45	hypothetisches Protein
3	EHI_144610	2146,19	505,62	4,24	0,002752605	Methioningammalyase
4	EHI_039020	448,98	2024,47	4,50	2,75898E-5	Aktobindin
5	EHI_026360	215,46	1270,94	5,89	5,81269E-5	Phosphoserinaminotransferase
6	EHI_056490	508,88	2566,49	5,04	0,000116197	hypothetisches Protein
	Gen ID	Expressionslevel		<i>fold change</i>	<i>padj</i>	Produkt
		Klon B2 ^{np}	Klon B8 ^p			
1	EHI_127670	806,03	17,70	45,54	0,00017	hypothetisches Protein
2	EHI_144490	1086,69	94,77	11,46	5,624E-22	hypothetisches Protein
3	EHI_144610	661,91	201,74	3,28	0,00017	Methioningammalyase
4	EHI_039020	101,96	356,95	3,50	0,03229	Aktobindin
5	EHI_026360	33,05	137,56	4,16	0,00114	Phosphoserinaminotransferase
6	EHI_056490	98,02	290,45	2,96	0,00514	hypothetisches Protein

Padj: Adjusted *p-value*

3.1.4 Generierung der Überexpressionskonstrukte

Um den Einfluss der Überexpression potentieller Pathogenitätsfaktoren auf die ALA-Bildung im Tiermodell zu untersuchen wurden die einzelnen Gene in die Neokassette (pNC) kloniert. Der Überexpressionsvektor pNC beruht auf dem Plasmid pEhNEO/CAT (Hamann et al., 1995). Der Vektor kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase, die die als Selektionsmarker dient und unter Kontrolle eines Aktin-Promotors steht.

Das für die Überexpression in den Vektor klonierte Gen steht unter einem Lektin-Promotor. Als Kontrolle in allen weiteren Versuchen dient der Vektor pNC ohne zusätzlich kloniertes Gen. Die in dieser Arbeit durch die Transkriptionsanalyse zwischen dem pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} identifizierten, potentiellen Pathogenitätsfaktoren (siehe Tabelle 1 und 3), konnten alle in den Überexpressionsvektor pNC kloniert werden.

Nach der erfolgreichen Transfektion der einzelnen Überexpressionskonstrukte, in Trophozoiten des jeweils schwächer exprimierenden Klons, wurden diese kloniert. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass es sich um eine homogene Zellkultur handelt, mit der weiter gearbeitet werden kann.

Pro Transfektante wurden 4-8 Klone unter Selektionsdruck weiter kultiviert und bei Erreichen einer stabilen Kultur mittels *Real-Time* PCR-Analyse auf den Grad der Überexpression hin untersucht (Tabelle 4). Als Referenzgen diente β -aktin. Die Überexpression der einzelnen Transfektanten wurde im Vergleich zur jeweiligen pNC (Kontrolle)-Transfektante bestimmt.

Für die 14 Gene konnte, wie in Tabelle 4 gezeigt, erfolgreich die Überexpression mit einem *fold change* ≥ 2.5 nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Relative Expression von B2^p und B8^{np} Transfektanten, die Gene überexprimieren, die normalerweise höher in Klon B8^{np} bzw Klon B2^p höher exprimiert sind

Klon B2 Transfektante	Name	Relative Expression nach qPCR Analyse
pNC (Kontrolle)		1
pNC 062960	hypothetisches Protein	50,185
pNC 048140	hypothetisches Protein	66,59
pNC 058920	hypothetisches Protein	4,33
pNC 026360	Phosphoserinaminotransferase	124,20
pNC 039020	Aktobindin	111,08
pNC 088020	Alkoholdehydrogenase	25,2
pNC 151930	hypothetisches Protein	26,54
pNC 160670	Alkoholdehydrogenase	133,17
pNC 180390	AIG1	315,89
pNC 056490	hypothetisches Protein	234,52
Klon B8 Transfektante	Name	Relative Expression nach qPCR Analyse
pNC (Kontrolle)		1
pNC 127670	hypothetisches Protein	41,54
pNC 073680	Leucin reiches Protein	4,365
pNC 144490	hypothetisches Protein	68,52
pNC 144610	Methioningammalyase	3,08

3.1.5 Einfluss differentiell exprimierter Gene auf die Pathogenität im Mausmodell

Im folgenden sollten nun die Gene näher untersucht werden, die zwischen den Klonen B2^p und B8^{np} als differentiell exprimiert identifiziert wurden konnten. Zur Untersuchung des Einflusses auf die ALA-Bildung (Amöbenleberabszess) und somit Pathogenität im Mausmodell wurde C57BL6/J Mäusen je 2×10^5 Trophoziten der jeweiligen Transfektante intrahepatisch injiziert und die Abszessgröße an Tag 7 nach Injektion bestimmt. Die Tierversuche wurden dabei freundlicherweise von Frau Dr. Helena Fehling durchgeführt. Als Kontrolle diente der jeweilige Klon, lediglich mit dem Leervektor, im folgenden als pNC bezeichnet, transfiziert. Ein Einfluss der Überexpression kann gezeigt werden, wenn das Verhalten in der Pathogenität umgekehrt zur Kontrolle zu beobachten ist. Das bedeutet einen Verlust der Pathogenität bei B2^p und eine gewonnene Pathogenität für die Überexprimierer in B8^{np}. Für die potentiellen Pathogenitätsfaktoren der in Klon B2^p überexprimierten Gene konnten drei Kandidaten identifiziert werden, die einen Einfluss auf die ALA-Bildung aufweisen. Dabei handelt es sich um die Gene EHI_160670, EHI_088020 und EHI_058920. Bei den Genen EHI_088020 und EHI_160670 handelt es sich jeweils um Alkoholdehydrogenasen. Das Gen EHI_058920 kodiert für ein hypothetisches Protein, dem bisher keine biologische Funktion zugeordnet werden kann.

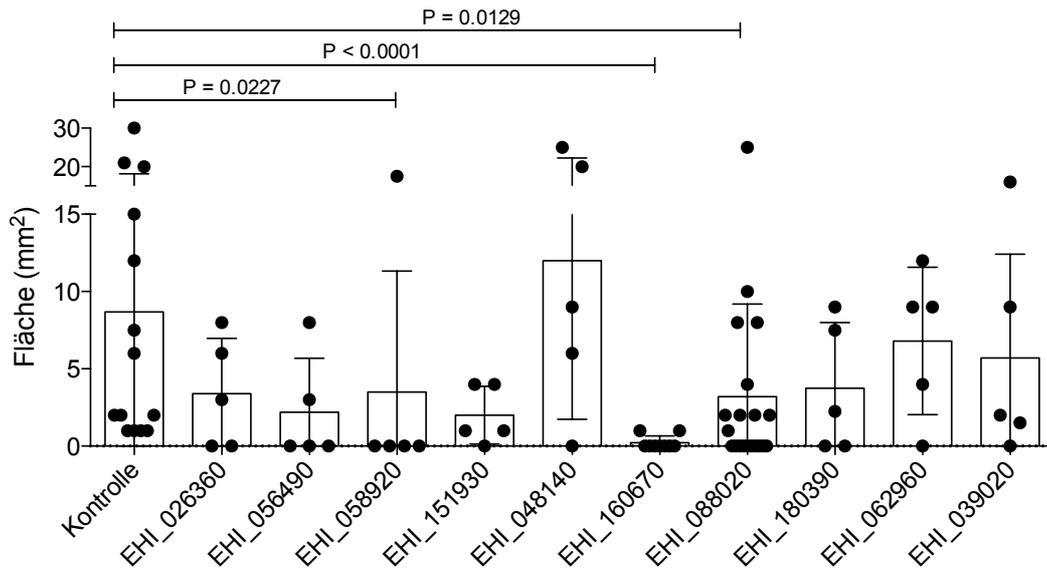


Abbildung 6: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit Klon B2^p-Transfektanten

Die Überexpressionskonstrukte der Gene, die differentiell im Klon B8^{np} hochreguliert sind, wurden in den Klon B2^p transfiziert. Die Fähigkeit der entsprechenden Transfektanten in Mäusen 7 Tage nach intrahepatischer Infektion ALAs zu generieren wurde analysiert. Als Kontrolle dienten B2^p-Transfektanten, die mit dem Leervektor pNC transfiziert waren. Die Signifikanzberechnung erfolgt über den *Mann-Whitney U* Test.

Zusätzlich konnten für 4 der 7 in Tabelle 2 gezeigten Gene, die differentiell höher in B2^p als in B8^{np} exprimiert gefunden wurden, Überexprimierer generiert werden und diese auf ihren Einfluss auf die ALA-Bildung im Tiermodell hin überprüft. Dazu wurden mindestens 4 C57BL6/J Mäusen je 2×10^5 Trophozoiten der jeweiligen Transfektante intrahepatisch injiziert und die Abszessgröße an Tag 7 nach Infektion bestimmt. Als Kontrolle diente hier der mit dem Leervektor pNC transfizierte Klon B8^{np}. Ein Einfluss auf die Pathogenität zeigt sich dadurch, dass der nicht-pathogene Klon B8^{np} durch die Überexpression pathogen wird. Für das Gen EHI_127670, ebenfalls kodierend für ein Mitglied der hypothetischen Proteine, konnte zwar kein signifikanter Einfluss auf die Pathogenität gezeigt werden, jedoch ist in Abbildung 7 deutlich eine Tendenz zu beobachten. Während in der Kontrolle keine ALA gebildet wurden, werden in 6 von 9 Tieren die mit EHI_127670-Transfektanten infiziert werden, ALAs nachgewiesen. Diese bietet einen klaren Hinweis auf den Einfluss von EHI_127670 auf die Virulenz im Klon B8^{np}.

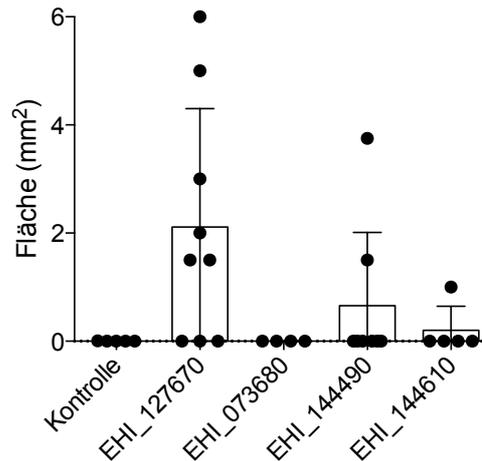


Abbildung 7: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit Klon B8^{np}-Transfektanten

Die Überexpressionskonstrukte der Gene, die differentiell im Klon B2^p hochreguliert sind, wurden in den Klon B8^{np} transfiziert und auf ALA-Bildung 7 Tage nach Injektion im Mausmodell untersucht. Die Fähigkeit der entsprechenden Transfektanten in Mäusen 7 Tage nach intrahepatischer Infektion ALAs zu generieren wurde analysiert. Als Kontrolle dienten B8^{np}-Transfektanten, die mit dem Leervektor pNC transfiziert waren.

3.2 Transkriptomanalyse mittels mRNA-Sequenzierung nach Überexpression in Trophozoiten von *E. histolytica*

Für die Gene EHI_160670 und EHI_088020 konnte ein Einfluss auf die Pathogenität durch Überexpression in Klon B2^p gezeigt werden (Abbildung 6). Um diesen Einfluss im Tiermodell näher zu charakterisieren, sollte die Auswirkung auf die gesamte Genexpression durch mRNA-Seq in den Trophozoiten untersucht werden. Die Bestimmung der Transkriptomdaten der einzelnen Transfektanten erfolgte dabei durch Auswertung von mindestens drei unabhängig voneinander generierten biologischen Proben. Die Gesamt RNA wurde dazu aus den Trophozoiten isoliert und ihre Integrität und Quantität im Bioanalyser überprüft. Als Vergleichswert für die Änderung der Genexpression durch Überexpression diente der jeweilige Klon, jedoch lediglich mit dem Leervektor pNC transfiziert.

In einer ersten Untersuchungen wurde das Transkriptom der EHI_088020-Transfektante im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante ermittelt. Mittels qPCR konnte gezeigt werden, dass die ADH EHI_088020-Transfektante eine 25.2 fache Überexpression des ADH EHI_088020 Gens aufweist (Tabelle 4).

Die Auswertung der Transkriptomdaten zeigte, dass sowohl die ADH EHI_160670 mit einem *fold change* von 17.47 und die ADH EHI_088020 mit einem *fold change* von 13.07 im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante höher exprimiert wurden. 3 weitere Gene konnten identifiziert werden, deren Expression ebenfalls gesteigert war (*fold change* 3-4).

Die Gene EHI_022490 und EHI_176590 zählen zur Gruppe der AIG Moleküle, während das Gen EHI_062960 zu den hypothetischen Molekülen gehört.

Tabelle 5: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der ADH EHI_088020-Transfektante (I) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , padj ≤ 0.05)

	Gen	Expressionslevel		<i>fold change</i>	padj	Produkt
		K	I			
1	EHI_160670	58,324099	1019,1936	17,47465781	0,000200262	Alkoholdehydrogenase
2	EHI_088020	312,18380	4080,5117	13,07086319	9,42337E-34	Alkoholdehydrogenase
3	EHI_062960	9,9247769	36,599083	3,687647976	0,020477322	hypothetisches Protein
4	EHI_022490	14,940294	52,279691	3,499241039	0,003306224	AIG Protein
5	EHI_176590	28,454423	96,360145	3,386473276	0,004563352	AIG 1 Protein

Padj: Adjusted p-value

Neben der ADH EHI_088020 konnte ebenfalls ein Einfluss der ADH EHI_160670 auf die Pathogenität im Tiermodell gezeigt werden (Abbildung 6). Um den Einfluss der Stärke der Überexpression auf die gesamte Genexpression zu untersuchen, wurden zwei Klone der ADH EHI_160670 mittels mRNA-Seq analysiert.

Mittels qPCR konnte für die ADH EHI_160670-Transfektante_1 eine 133.75 fache und für die ADH EHI_160670-Transfektante_2 eine 62.75 fache Überexpression gezeigt werden. Nach Analyse der Transkriptomprofile der ADH EHI_160670-Transfektante_2 konnten neben der ADH EHI_088020 und der ADH EHI_160670 vier weitere Gene gesteigert exprimiert nachgewiesen werden (Tabelle 6). Das Gen EHI_118220 kodiert für die vakuoläre ATP Synthase Untereinheit B. Mit einer 12.16 fachen Expressionssteigerung, im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante, zeigte es die zweitstärkste Expression im Transkriptionsprofil der ADH EHI_160670-Transfektante_2. Darüberhinaus fanden sich das Gen EHI_114920, das für die 60S ribosomale Untereinheit L35a kodiert, sowie die hypothetischen Proteine EHI_087210 und EHI_200090 (CXXC-reiches Protein).

Tabelle 6: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der ADH EHI_160670-Transfektante_2 (II) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , padj ≤ 0.05)

	Gene ID	Expression level		fold change	padj	Produkt
		K	II			
1	EHI_160670	83,333479	5278,3279	63,33982435	1,11372E-24	Alkoholdehydrogenase
2	EHI_118220	4,5736172	55,635554	12,16445337	5,41928E-06	vakuoläre ATP Synthase Untereinheit B, putativ
3	EHI_114920	24,731799	276,99356	11,19989545	2,33437E-10	60S ribosomales Protein L35a, putativ
4	EHI_087210	1,9283617	18,171584	9,423327391	0,01595581	hypothetisches Protein
5	EHI_088020	445,79613	3635,9100	8,155992769	3,19266E-14	Alkoholdehydrogenase
6	EHI_200090	83,530789	277,31091	3,319864627	0,019321804	CXXC-reiches Protein

Padj: Adjusted p-value

Zur Analyse des Einflusses der Stärke der Überexpression auf die Transkriptomdaten wurde zusätzlich zu der ADH EHI_160670-Transfektante_2 das Transkriptomprofil der ADH EHI_160670-Transfektante_1 analysiert.

Im Vergleich zur ADH EHI_160670-Transfektante_2 konnten neben der ADH_160670 und ADH_088020 35 Gene als differentiell hochreguliert in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 identifiziert werden (Tabelle 7). 20 dieser 36 Gene kodieren für hypothetische Proteine.

Drei Gene konnten identifiziert werden, die im Vesikeltransport des Trophozoiten von *E. histolytica* eine Rolle spielen. Die Coatamer Untereinheit delta wird durch das Gen EHI_169210 kodiert und bildet translatiert eine Untereinheit der Transportivesikel. Das Gen EHI_009940 kodiert für die kleine Untereinheit des Clathrin Adaptor Komplexes. Das dritte Gen in dieser Gruppe ist EHI_096210 und kodiert für ein Vesikelmembranhüllprotein.

4 der in der Transkriptomanalyse der ADH EHI_160670-Transfektante_1 als differentiell hochreguliert identifizierten Gene kodieren für Proteine, die eine Rolle in der Signaltransduktion, bzw. dem Transport über die Zellmembran spielen.

Ein Gen (EHI_186810) kodiert für ein Protein aus der Familie der *Major facilitator* Membranproteine, das in der Membran lokalisiert ist. Das durch das Gen EHI_042900 kodierte Protein Theoredoxin dient als Regulator biochemischer Signaltransduktion, während das Gen EHI_174220 für den *Second Messenger* Calmodulin kodiert und das Gen EHI_022490 für ein AIG Molekül.

Drei der in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 identifizierten Gene kodieren für ribosomale Proteine. Das 60S ribosomale Protein L35a, kodiert durch das Gen EHI_114920, das Initiator und Elongator tRNA's bindet, das 40S ribosomale Protein S23 kodiert durch das Gen EHI_020310 als poly A RNA bindende Untereinheit und die 40S Untereinheit S13, die durch das Gen EHI_112880 kodiert wird und tRNA's bindet.

Das durch das Gen EHI_158570 kodierte Protein Aktobindin und das durch das Gen EHI_168640 kodierte Protein Cofilin, gehören zur Klasse der Aktin bindende Molekül und spielen eine Rolle in der Aktinbindung und Akkumulation von Aktin Dimeren.

Die Gene EHI_029220 und EHI_194540 kodieren für Proteine, die eine Rolle in der Adhäsion und Induktion von Wirtsmembranschäden eine Rolle Spielen.

Darüberhinaus finden sich das Gen EHI_119490, welches für die Hydrolase TatD, als wichtiges Molekül bei der DNA Reparatur, kodiert.

Tabelle 7: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 (III) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , $\text{padj} \leq 0.05$)

	Gene ID	Expressionslevel		fold change	padj	Produkt
		K	III			
1	EHI_160670	100,51534	6420,1622	63,87245923	3,13409E-52	Alkoholdehydrogenase
2	EHI_114920	29,921116	554,86969	18,54441794	2,15087E-21	60S ribosomales Protein L35a, putativ
3	EHI_092270	2,5611517	24,568676	9,59282322	0,006756706	hypothetisches Protein
4	EHI_169210	5,6090557	48,282980	8,608040902	0,000244102	Coatomer Untereinheit delta, putativ
5	EHI_186810	2,7872152	23,500027	8,431364368	0,02883156	major facilitator Superfamilie Protein
6	EHI_159700	3,4602108	24,850806	7,181876228	0,039117601	CXXC-reiches Protein
7	EHI_088020	537,66186	3790,1347	7,049290685	1,43752E-13	Alkoholdehydrogenase
8	EHI_200090	100,95495	648,04865	6,41918626	1,30771E-07	CXXC-reiches Protein
9	EHI_166860	10,957909	68,087175	6,213518924	0,000576818	hypothetisches Protein
10	EHI_163860	4,1198408	25,127551	6,099155893	0,031613617	hypothetisches Protein
11	EHI_042900	20,045245	113,04491	5,639487497	0,00025328	Thioredoxin, putativ
12	EHI_015010	10,573184	58,661353	5,54812536	0,006338522	hypothetisches Protein
13	EHI_005960	12,582172	66,322503	5,271148667	0,003086759	hypothetisches Protein
14	EHI_129370	17,761352	86,631935	4,877552934	0,005419437	hypothetisches Protein
15	EHI_029220	8,6369771	41,307390	4,78262123	0,033970692	Peptidase S54 (rhomboid) Protein
16	EHI_009940	7,956995	131,47527	4,702768245	0,000259081	Clathrin Adaptor Komplex, kleine Kette, putativ
17	EHI_020310	18,834547	87,790299	4,661131306	0,015533294	40S ribosomales Protein S23, putativ
18	EHI_058530	29,587466	135,47689	4,578860883	3,23596E-05	hypothetisches Protein
19	EHI_120950	14,340452	64,655111	4,508582337	0,002528287	hypothetisches Protein
20	EHI_079270	10,709127	43,284897	4,041869732	0,02883156	hypothetisches Protein
21	EHI_119490	9,3871313	37,089667	3,951118399	0,039863845	Hydrolase TatD Protein
22	EHI_004400	11,946519	46,433282	3,88676222	0,023393679	hypothetisches Protein
23	EHI_062960	17,056916	65,497673	3,839948018	0,018465351	hypothetisches Protein
24	EHI_096410	44,481909	168,11935	3,779499593	0,00222193	hypothetisches Protein
25	EHI_112880	193,40812	720,22936	3,723883773	1,51536E-05	40S ribosomales Protein S13, putativ
26	EHI_040820	39,439827	143,80584	3,64620887	0,008342102	hypothetisches Protein
27	EHI_125750	15,984330	57,244163	3,58126762	0,026332676	hypothetisches Protein
28	EHI_022490	25,744480	89,869617	3,490830479	0,041200324	AIG Protein
29	EHI_158570	126,56871	435,16761	3,438192433	0,000573697	Aktobindin, putativ
30	EHI_174220	52,499685	180,11744	3,430829023	0,002442448	hypothetisches Protein

31	EHI_107050	270,07394	921,74713	3,412943574	0,000357219	hypothetisches Protein
32	EHI_010020	417,27681	1404,1174	3,364954308	0,000412802	Calmodulin, putativ
33	EHI_096210	41,779605	138,48935	3,314759718	0,009077042	Coated vesicle membrane protein, putative
34	EHI_048730	36,154261	116,81753	3,231086143	0,02883156	hypothetisches Protein
35	EHI_194540	1865,9026	5819,8909	3,119075386	0,002760761	Poren-formendes Peptid Amöbapor B Vorstufe
36	EHI_011400	30,280968	93,537964	3,089001777	0,026508508	hypothetisches Protein
37	EHI_186840	46,448805	141,39424	3,044087897	0,006756706	Aktin bindendes Protein, Cofilin/Topomyosin

Padj: Adjusted p-value

Die in Abschnitt 3.2.2 beschriebene generierte Mutante der ADH EHI_088020-Transfektante sollte ebenfalls auf ihren Einfluss auf Transkriptomebene untersucht werden.

Neben den beiden Genen der ADHs EHI_160670 und EHI_088020, fanden sich 4 weitere auf Transkriptomebene differentiell exprimierte Gene (Tabelle 8).

Die Gene EHI_163500, EHI_163860 und EHI_068620 kodieren für Proteine, die zu der Gruppe der hypothetischen Proteinen gehören.

Das Gen EHI_112880, dessen putative Funktion bereits bekannt ist, kodiert für ein Protein der 40S ribosomalen Untereinheit und konnte bereits in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 als hochreguliert identifiziert werden.

Tabelle 8: Gene die differentiell höher exprimiert sind in der Mutante ADH EHI_088020Mut-Transfektante (M) im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) im Klon B2 (threshold ≥ 3.0 , padj ≤ 0.05)

	Gen ID	Expressionslevel		fold change	padj	Produkt
		Klon K	M			
1	EHI_163500	1,8210277	37,856390	20,78847525	0,000461695	hypothetisches Protein
2	EHI_160670	103,61171	1306,7317	12,61181425	2,71282E-14	Alkoholdehydrogenase
3	EHI_088020	554,20136	6264,4409	11,30354655	2,91059E-20	Alkoholdehydrogenase
4	EHI_163860	4,2450658	43,517187	10,25123952	0,025544689	hypothetisches Protein
5	EHI_112880	199,23071	725,64053	3,642212194	0,025544689	40S ribosomales Protein S13, putativ
6	EHI_068620	18,319544	66,091455	3,607701987	0,043734363	hypothetisches Protein

Padj: Adjusted p-value

3.3 Genomanalysen der Alkoholdehydrogenasen EHI_160670 und EHI_088020

3.3.1 Sequenzanalyse von EHI_160670 und EHI_088020

Nach Analyse der zwischen B8^{np} und B2^p differentiell exprimierten Gene (siehe Tab 1 und 2), wurde eine Sequenzanalyse der Alkoholdehydrogenase EHI_160670 durchgeführt. Überraschenderweise zeigte sich dabei, dass die beiden ADH's EHI_160670 und EHI_088020 aus *E. histolytica* eine 100 % ige Identität aufweisen, sich

in ihrer Länge jedoch um 480 bp unterscheiden. Das Gen EHI_160670 ist dabei mit einer Länge von 669 bp am Anfang des Chromosoms DS571485 lokalisiert (Abbildung 8 A), während die ADH EHI_088020 mit einer Länge von 1149 bp in der Mitte des Chromosoms DS571307 zu finden ist (Abbildung 8 B). Durch Untersuchung der Lage von EHI_160670 zeigte sich, dass die ersten 33 bp vor dem annotierten Gen, mit der ADH_088020, am Anfang des Chromosoms DS571485 identisch sind.

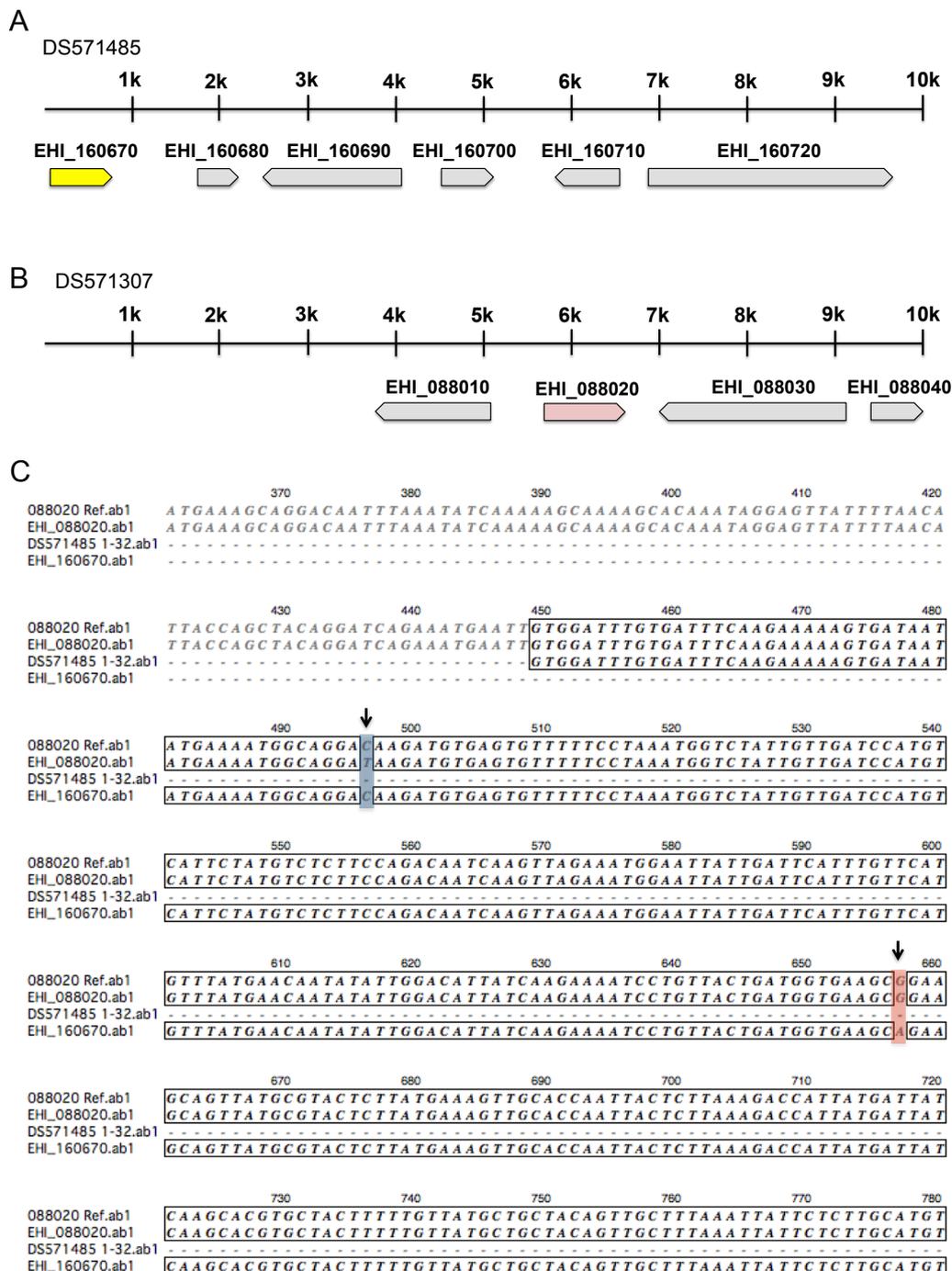


Abbildung 8: Lokalisation der ADHs EHI_088020 und EHI_160670 im Genom von *E. histolytica* Sequenzanalyse

(A) Das Gen EHI_160670, gelb hinterlegt, ist mit einer Länge von 669 bp am Anfang des *Contigs* DS571485 lokalisiert. (B) Das Gen EHI_088020 mit einer Länge von 1149 bp ist von Position 5583 bis 6731 auf dem *Contig* DS571307 lokalisiert. (C) Das Alignment nach Sequenzierung zeigt, dass die ADH EHI_160670 eine stille Mutation an Position 657 (rot hinterlegt) aufweist. Für die ADH EHI_088020 konnte in allen Klonen eine Punktmutation festgestellt werden, die zu einem verfrühten Stopp führt (blau hinterlegt). Als Referenz dient die in amoebadb.org hinterlegte Sequenz der ADH EHI_088020.

Durch Sequenzanalyse, des vor dem Chromosom DS571485 liegendem Bereich, konnte gezeigt werden, dass das Gen EHI_160670 bisher falsch annotiert wurde und in seiner vollen Länge der Sequenz der ADH_088020 entspricht. Überraschenderweise zeigte sich dabei jedoch, dass es in der Sequenz der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} des Isolates HM-1:IMSS einen Basenaustausch an der Position 496 gibt, der zu einem verfrühten Stoppcodon führt. Da das Stoppcodon vor dem aktiven Zentrum lokalisiert ist, lässt dies darauf schließen, dass das Gen EHI_160670 das einzig aktive der beiden ADH Gene in *E. histolytica* ist. Zusätzlich zeigte sich im Sequenzvergleich ein Austausch im Gen EHI_160670 an Position 657, der jedoch nicht zu einem Basenaustausch führt. Dieser lässt sich ebenfalls in allen Sequenzen der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} des Isolates HM-1:IMSS nachweisen.

3.3.2 Identifizierung homologer Alkoholdehydrogenasen aus *E. histolytica*

Auf Grundlage der Sequenz der ADH EHI_088020 konnten im weiteren drei Alkoholdehydrogenasen in *E. histolytica* gefunden werden, die mit ihrer Sequenz hohe Ähnlichkeit zu der zwischen B2^p und B8^{np} differentiell exprimierten ADH aufweisen. Diese sind das Gen EHI_125990 mit 56 %, EHI_198760 mit 76 % und das Gen EHI_192470 mit 79 % Sequenzidentität. Allerdings lag für diese Gene in der vergleichenden Transkriptomanalyse zwischen dem pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} keine differentielle Expression vor.



Abbildung 9: Sequenzalignment verschiedener ADHs von *E. histolytica*

Für das Alignment wurden Alkoholdehydrogenasen aus *E. histolytica* ausgewählt, die die größte Sequenzübereinstimmung zur ADH EHI_088020 aufweisen. Dabei zeigt die ADH EHI_125950 eine Sequenzübereinstimmung von 56 %, die ADH EHI_198760 76 % und die ADH EHI_192470 79 %. Hoch konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau hinterlegt. Strukturell ähnliche Aminosäuren sind hellgrau hinterlegt. Die laut Sequenzvorhersage für die Metallbindung entscheidenden Aminosäuren sind rot hinterlegt dargestellt. Die mit Pfeil gekennzeichneten, rot hinterlegten Aminosäuren wurden zusätzlich im Gen EHI_088020 zu Alanin mutiert um deren Einfluss auf die Pathogenität im Mausmodell zu überprüfen. Die blau gekennzeichneten Aminosäuren sind in der Cofaktorbindung involviert.

3.3.3 Einfluss von Alkoholdehydrogenasen auf die ALA-Bildung von *E. histolytica*

Mit Hilfe von EHI_088020- und EHI_160670-Transfektanten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression dieser Gene zu einem nicht-pathogenen Phänotyp führt. Nach deren Überexpression in dem pathogenen Klon B2^p, war dieser nicht mehr in der Lage im Tiermodell Leberabszesse zu generieren. Daher sollte untersucht werden, ob homologe ADHs auch zu einer Reduktion der Abszessgröße im Tiermodell führen. Dazu wurden die Gene der ADHs EHI_192470, EHI_198760 und EHI_125950 in die Neocassette kloniert und erfolgreich überexprimiert generiert. Diese wurden anschließend im Mausmodell auf ihren Einfluss auf die ALA-Bildung hin überprüft. Als Kontrolle diente wie bereits zuvor die Leervektor pNC transfizierte B2^p-Transfektante. Für die ADH EHI_192470 mit einer Sequenzidentität von 79% zur ADH EHI_088020, konnte kein Einfluss auf die Pathogenität beobachtet werden. Auch für die ADH EHI_198760 mit einer Ähnlichkeit von 70% ist kein signifikanter Einfluss feststellbar. Überraschenderweise jedoch zeigte die ADH EHI_125950 mit der geringsten Ähnlichkeit von 56% einen signifikanten Einfluss auf die Pathogenität. Dieses Ergebnis ist überraschend, da ein Einfluss eher bei den ADHs mit der höchsten Übereinstimmung zur ADH EHI_088020 erwartet worden wäre.

Zusätzlich zu den ADH-Transfektanten wurde ebenfalls eine Mutante der ADH EHI_088020 im Tiermodell untersucht, bei der zuvor die Metall-bindenden Aminosäuren D (Asparaginsäure) an Position 199 und H (Histidin) an Position 203 (Abbildung 9, rot hinterlegt mit Pfeilen markiert) zu Alanin mutiert wurden. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, scheint die Mutation den zuvor beobachteten Effekt der ADH EHI_088020 auf die Reduktion der Abszessgröße im Mausmodell nicht aufzuheben. Dieser Einfluss konnte bis dato nicht als signifikant gezeigt werden.

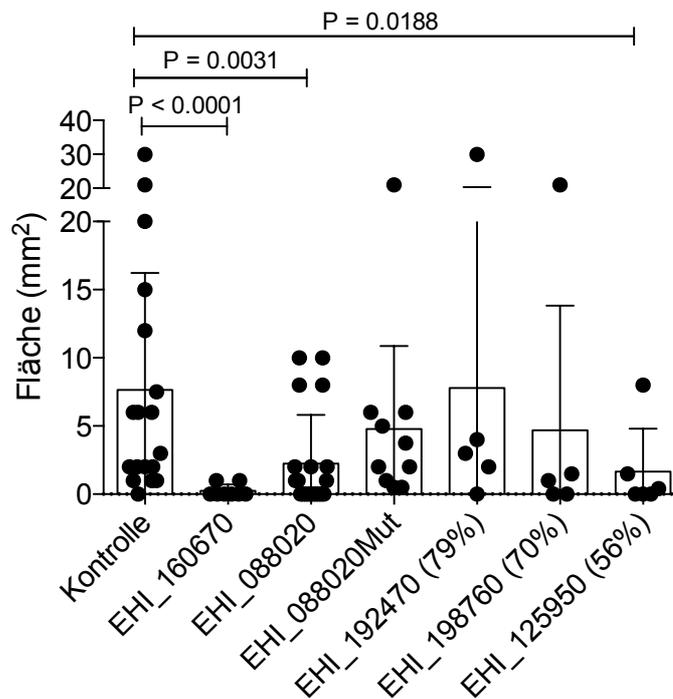


Abbildung 10: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit B2^p ADH-Transfektanten

Die Überexpressionskonstrukte der Gene EHI_125959, EHI_198760 und EHI_192470, die eine Sequenzähnlichkeit zur ADH EHI_088020 aufweisen, sowie eine Mutante der ADH EHI_088020 wurden in den Klon B2^p transfiziert. Die Fähigkeit der entsprechenden Transfektanten in Mäusen 7 Tage nach intrahepatischer Infektion ALAs zu generieren wurde analysiert. Als Kontrolle dienten B2^p-Transfektanten, die mit dem Leervektor pNC transfiziert waren. Die Signifikanzberechnung erfolgt über den *Mann-Whitney U* Test.

3.4 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

3.4.1 Expression und Reinigung der Alkoholdehydrogenase EHI_088020 von *E. histolytica*

Die rekombinante Expression der ADH EHI_088020 erfolgte in paplaQ-Zellen wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben nach Klonierung in den pGEX-6P-2 GST-Expressionsvektor. Zu Beginn erfolgte eine Optimierung der Expressionsbedingungen. Hierfür wurden die rekombinanten Bakterien bei 37 °C bis zu einer OD von 0.6 kultiviert, induziert und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. In einem parallel durchgeführten Expressionsansatz wurde nach Induktion die Bakterienkultur über Nacht bei 17 °C kultiviert. Durch SDS-PAGE und Western-Blot Analyse konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass das Protein löslich in den Bakterien exprimiert wird.

Ließ sich in den Fraktionen die mit 1 M und 5 M Harnstoff behandelt wurden nach Expressionen kein Signal detektieren, zeigt die lösliche Fraktion ohne Harnstoff nach Aufreinigung ein deutliches Signal bei 69 kDa, was der Größe der exprimierten ADH_088020 plus dem fusionierten GST-tag (Gluthion-S-Transferase) mit 26 kDa entspricht. Bei der Kultivierung über Nacht bei 17 °C zeigt sich ein weitaus stärkeres Signal als bei der Kultivierung bei 37 °C für 4 h.

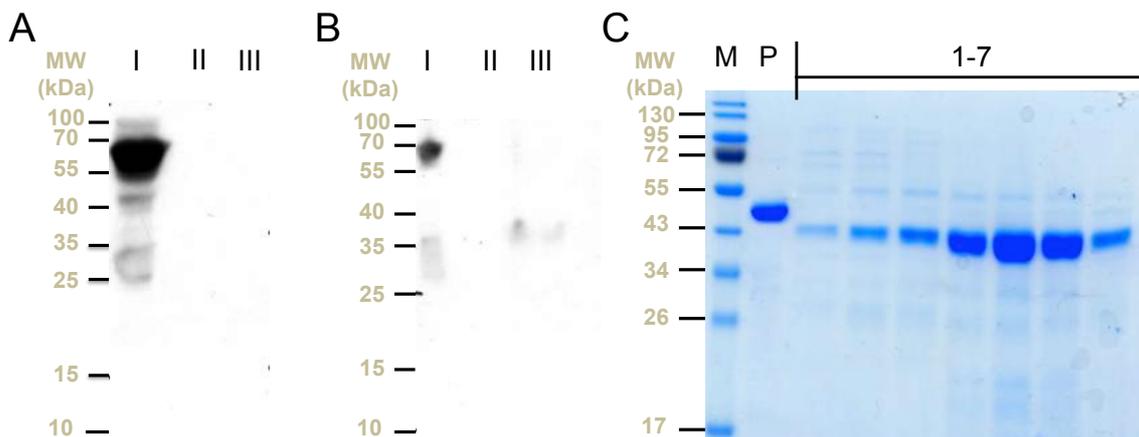


Abbildung 11: Rekombinante Expression der ADH EHI_088020 und Abspaltung des GST-tags

Für die rekombinante Expression der ADH EHI_088020 aus *E. histolytica* wurden jeweils 1 L Expressionskultur angesetzt und nach Induktion für 4h bei 37 °C (B) oder über Nacht bei 17 °C (A) inkubiert um das Expressionsoptimum zu ermitteln. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert und durch Sonifizieren in Puffer A lysiert. Zur Gewinnung der löslichen Proteine (I) wurde der Extrakt zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Um das eventuell unlösliche vorliegende Protein zu extrahieren folgte eine Aufreinigung in Puffer B (II) und C (III). Die Proben wurden nach der Reinigung über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt und eine Western-Blot durchgeführt, bei dem der GST-tag mit α -Maus-GST-Antikörpern detektiert wurde (A und B). Die Aufreinigung der löslichen Fraktion I folgte im Anschluss über eine GST-Sepharose (Inkubation 1h bei RT). Das durch den GST-tag an die Matrix gebundenen Protein wurde durch Zugabe von PreScission Protease für 4h bei 4°C abgeschnitten, wobei die Protease ebenfalls mit GST fusioniert ist, somit auch an die Sepharose bindet und so vom Eluat abgetrennt werden kann. Die Elution erfolgte im Anschluss in jeweils 2mL Fraktionen. Von diesen wurden je 10 μ L (1-7) mittels SDS-PAGE (12 %ig) aufgetrennt und durch Coomassiefärbung analysiert (C). Zusätzlich wurde 1 μ L PreScission Protease (P) als Kontrolle aufgetragen.

Alle weiteren Expressionen wurden daher bei 17 °C durchgeführt. Für folgende Versuche, wie dem Generieren polyklonaler Antikörper und der Kristallisation, wurde die Expression in einem Maßstab von 5 L durchgeführt und das Protein mittels Affinitätschromatographie und Größenausschlußchromatographie aufgereinigt. Für die Aufreinigung von Proteinen ist die Wahl des richtigen tags von entscheidender Bedeutung. Die Aufreinigung der ADH EHI_088020 erfolgte durch Verwendung eines GST-tags. Dieser bindet spezifisch an die GST-Sepharose. Die Abspaltung des tags

erfolgte durch Einsatz der Pre-Scission Protease für 4 h bei 4°C. Die Protease besitzt selber einen GST-tag und bindet nach Spaltung spezifisch an die GST-Sepharose. Zur Kontrolle der Effizienz wurden die Eluate nach GST-Abspaltung mittels SDS-PAGE analysiert. Als Kontrolle wurde die Pre-Scission Protease aufgetragen. Wie in Abbildung 11 C zu sehen ist, konnte die erfolgreiche Spaltung der ADH_088020 gezeigt werden. Deutlich zu sehen ist ebenfalls das Abtrennen der Pre-Scission Protease nach Verdau des GST-tags in den Eluatfraktionen. Für weitere Analysen wie der Kristallisation oder der Antikörpergewinnung jedoch ist die Reinheit von entscheidender Bedeutung. Daher wurden die Eluatfraktionen einer 5 L Expression zunächst auf 2 mL eingengt und mittels Säulenchromatographie über die Superdex 200-Säule gereinigt. Zur Analyse des Molekulargewichts der aufgereinigten ADH wurde zusätzlich ein definierter Standard im Elutionspuffer auf der Säule laufen gelassen. In Abbildung 12 ist dieser hellgrau im Chromatogramm durch 5 Linien hinterlegt. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte über eine SDS-PAGE und anschließender Coomassie Färbung. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnte eine deutliche UV-Absorption im Bereich von 79-84 mL registriert werden. In der Analyse zeigt sich, dass diese mit einer Größe von 43 kDa der untersuchten ADH EHI_088020 von *E. histolytica* entspricht. Der Vergleich des detektierten Proteins mit dem Größenstandard deutet darauf hin, dass das Protein mit einer Größe von 84 kDa als Dimer vorliegt.

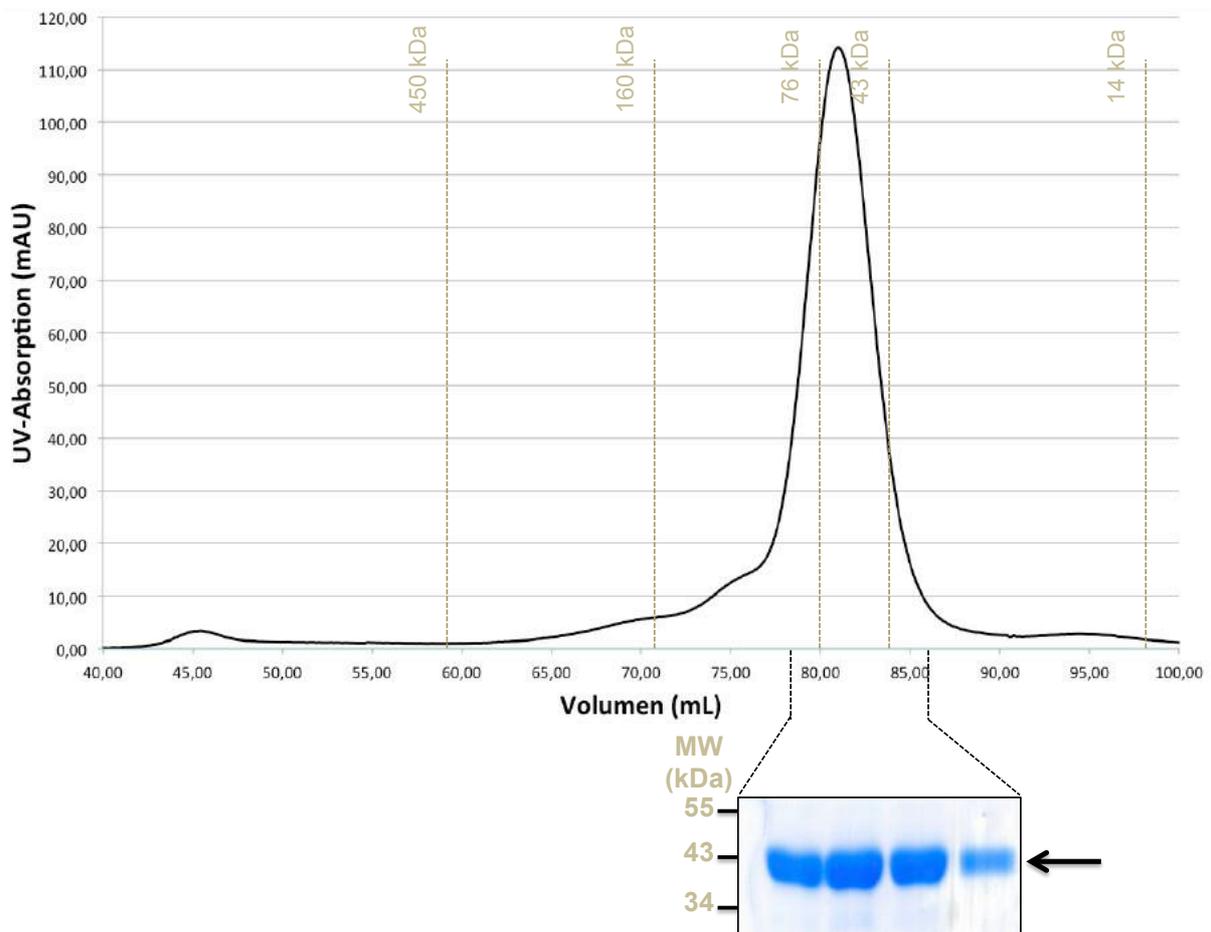


Abbildung 12: Größenausschlusschromatographie der ADH EHI_088020

Für die Größenausschlusschromatographie wurde das Eluat einer 5 L Expressionskultur auf 2 mL konzentriert, 5 min bei 13000 x *g* zentrifugiert und in GST-Elutionspuffer bei 4°C aufgetrennt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert und sind unterhalb des Chromatogramms gezeigt. Die ADH EHI_088020 ist durch einen Pfeil markiert. Zur Bestimmung der Größe wurde eine Kalibrierung der Säule durchgeführt. Diese ist im Hintergrund grau hinterlegt angezeigt.

Zur Abtrennung weiterer Verunreinigungen wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Zunächst wurde das Protein nach Abspaltung des GST-tags mit Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Tris verdünnt, um die NaCl Konzentration im Puffer zu senken. Eine geringe Salzkonzentration bildet dabei die Grundlage der polaren Wechselwirkung zwischen dem Protein und der HiTrap Q FF Säulenmatrix. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen NaCl Gradienten. Die Analyse der einzelnen Fraktionen nach Elution erfolgt mittels SDS-PAGE. Es zeigte sich dabei jedoch, dass die ADH_088020 nicht an das HiTrap Q FF Säulenmatrix gebunden hat. Mit einem pI von 6,79 liegt die berechnete Ladung des Proteins zu Nahe am isoelektrischen Punkt, an dem durch seine Neutralität die Interaktion des Proteins mit der Matrix verhindert wird. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist befindet sich das Protein im Durchfluss sowie

den ersten 3 Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie. Nur ein geringer Anteil der Verunreinigungen konnte so abgetrennt werden. Im Anschluss wurden die Fraktionen erneut auf 2 mL eingengt und für weitere Analysen mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt.

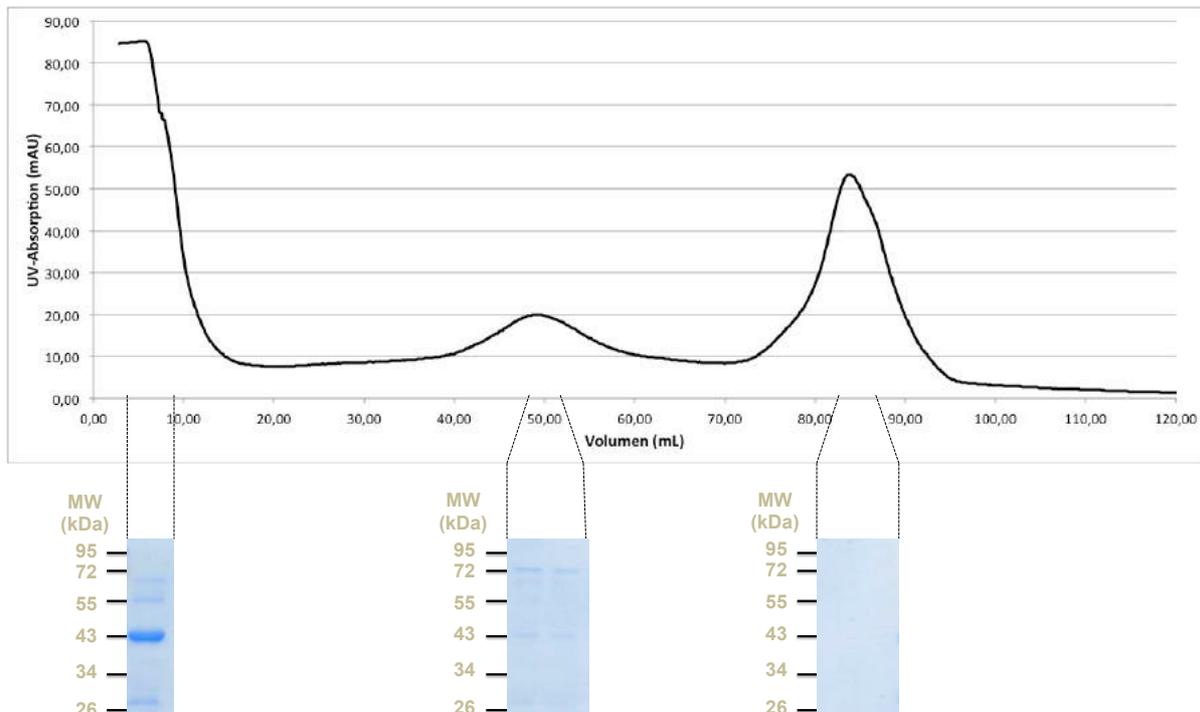


Abbildung 13: Anionenaustauschchromatographie von EHI_088020

Zur Reduktion der Salzkonzentration im GST Elutionspuffer wurde die Proteinlösung nach Abtrennung des GST-tags mit 50mM Tris pH 7.5 Puffer verdünnt. Zusätzlich erfolgte die Äquilibration der HiTrap QFF Säule mit GST Elutionspuffer unter Nutzung einer P1 Pumpe (1-2mL/min). Alle folgenden Schritte wurden am ÄKTA-Prime System durchgeführt. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen gespült und der Durchfluss aufgefangen. Zur folgenden Elution der gebundenen Proteine wurde ein kontinuierlicher NaCl Gradient durchgeführt mittels Zugabe des Elutionspuffers mit 1 M NaCl von 0-100%. Die Fraktionen des Chromatogramms wurden mittels 12%iger SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert und sind unterhalb dargestellt.

3.4.2 Generierung polyklonaler Antikörper gegen die Alkoholdehydrogenase EHI_088020 von *E. histolytica*

Nachdem die Expression der ADH EHI_088020 erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte das rekombinante Protein zur Generierung polyklonaler Antikörper genutzt werden. Dazu wurde wie in Abschnitt 2.21 beschrieben eine dreifache *intra peritoneale* Immunisierung von 4 Balb/c Mäusen mit je 50 µg gereinigtem rekombinanten Protein im Abstand von je 2 Wochen vorgenommen. Nach sechswöchiger Inkubation wurde den Tieren mittels Herzpunktion Blut entnommen und das Serum gewonnen. In einem ersten Versuch wurden die Antikörper auf ihre Spezifität via Western-Blot Analyse im

Lysat sowie der Membranfraktion der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} untersucht. Dazu wurde wie in Abschnitt 2.20.3 beschrieben zunächst das Amöbenlysate aus der NaPBS löslichen Fraktion, sowie die Proteine der Triton-X-100 löslichen Membranfraktion isoliert und deren Proteinkonzentration bestimmt.

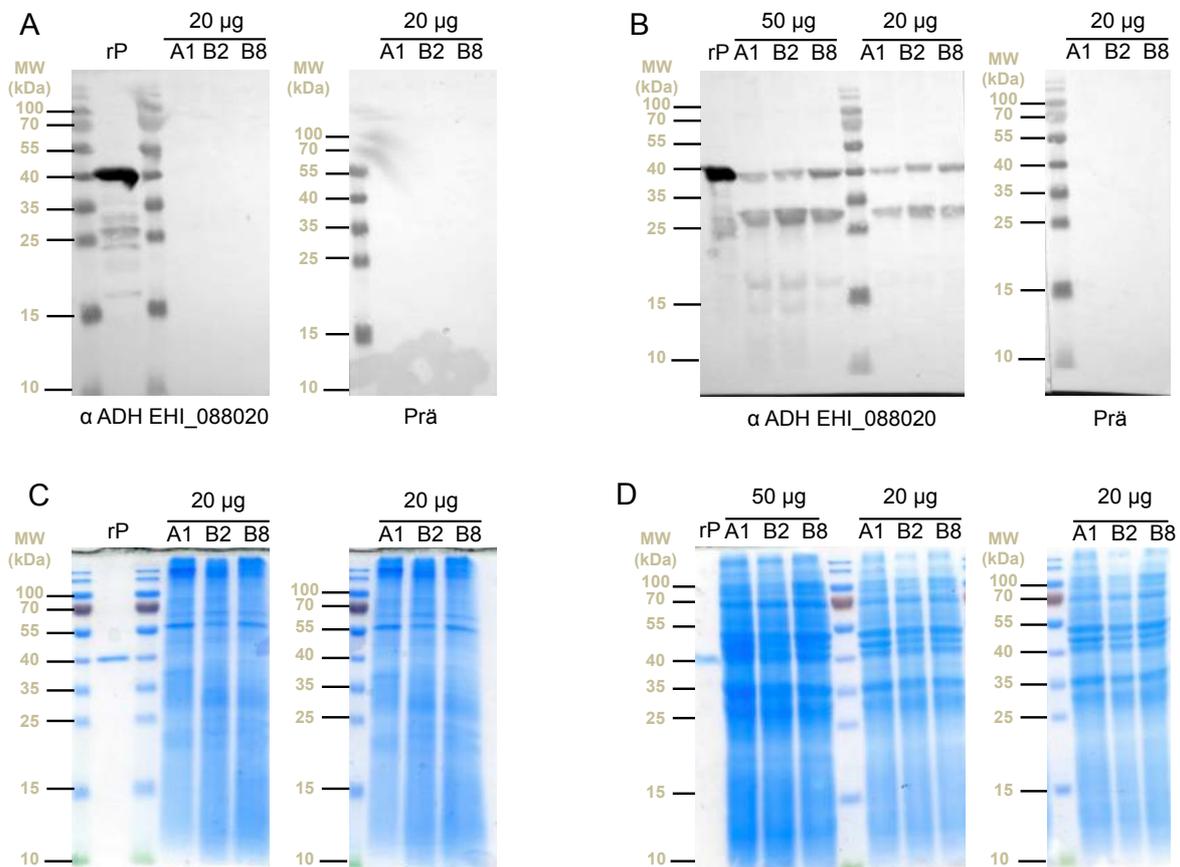


Abbildung 14: Western-Blot Analyse des polyklonalen Antikörpers von EHI_088020 in den Amöbenlysaten der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np}

Durch eine dreifache *intra peritoneale* Immunisierung von 4 Balb/c Mäusen mit je 50 µg gereinigtem Protein der ADH EHI_088020 im Abstand von je 2 Wochen wurde nach sechswöchiger Inkubation mittels Herzpunktion das Blut entnommen und das Serum gewonnen. Die in dem Serum enthaltenen Antikörper wurden auf ihre Spezifität mittels Western-Blot Analyse auf zuvor gewonnene Amöbenlysate der Membranfraktion (A) und der cytosolischen Fraktion (B) der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} hin überprüft. Als Größenkontrolle diente 0.5 µg des rekombinanten Proteins (rP). Die Zugabe des rekombinanten α ADH EHI_088020 Antikörpers erfolgte in einer Konzentration von 1:1200. Als zweiter Antikörper wurde der α-Maus-HRP Antikörper in einer Konzentration von 1:7500 eingesetzt. Als Negativkontrolle diente Mäuserum (Prä) in einer Verdünnung von 1:1200. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Extrakte über eine 12 %ige SDS-PAGE und folgender Coomassie-Färbung als Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 14 C und D zu sehen ist, wurde als Ladekontrolle zu jedem Western-Blot jeweils eine SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass die im Western-Blot eingesetzten Mengen an Lysat

beider Fraktionen für die drei Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} homogen und somit untereinander vergleichbar sind.

In Abbildung 14 B ist eine deutliche Bande auf Höhe von ca 43 kDa detektiert worden, die der Größe der ADH EHI_088020 entspricht. Es handelt sich dabei um die cytosolischen Fraktionen der Amöbenlysate von A1^{np}, B2^p und B8^{np}. Die Bande auf Höhe von 26 kDa konnte keiner bekannten ADH zugeordnet werden.

Als Positivkontrolle dient das rekombinant aufgereinigte Protein (rP) in einer Konzentration von 0.5 µg.

Der Western-Blot (Abbildung 14A) zeigt keine Detektion der ADH EHI_088020 in den Lysaten der Membranfraktion von A1^{np}, B2^p und B8^{np}.

Ein Antikörper gegen die ADH EHI_088020 im Prä-Immunsereum konnte nicht detektiert werden (Abbildung 14 Prä).

3.5 Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase EHI_088020 aus *E. histolytica*

3.5.1 Lokalisationsstudien der Alkoholdehydrogenase EHI_088020 von *E. histolytica* in Trophozoiten der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Lokalisierung der ADH EHI_088020 in *E. histolytica*, mit Hilfe des zuvor wie in Abschnitt 2.21 beschrieben generierten polyklonalen Antikörpers, wurden Trophozoiten der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Zusätzlich erfolgte die Lokalisation der ADH in Trophozoiten der EHI_088020-, EHI_088020Mut-, EHI_160670 und pNC-(Kontrolle)-Transfektanten. Als primärer Antikörper wurde α -ADH-EHI_088020 und als sekundärer Antikörper ein α -mouse-Antikörper verwendet. Der sekundäre Antikörper ist wiederum mit dem Fluoreszenzfarbstoff ALEXA Fluor® 488 gekoppelt. Die Fixierung der Trophozoiten, die Permeabilisierung der Membran mit Saponin und die Behandlung mit den Antikörpern erfolgte wie in Abschnitt 2.22.1 beschrieben. Durch die Interaktion von Saponin mit dem Cholesterin der Zellmembran entstehen Poren, durch die die Antikörper ins Zellinnere gelangen können. Die Fluoreszenzbilder wurden bei einer 1000 fachen Vergrößerung aufgenommen.

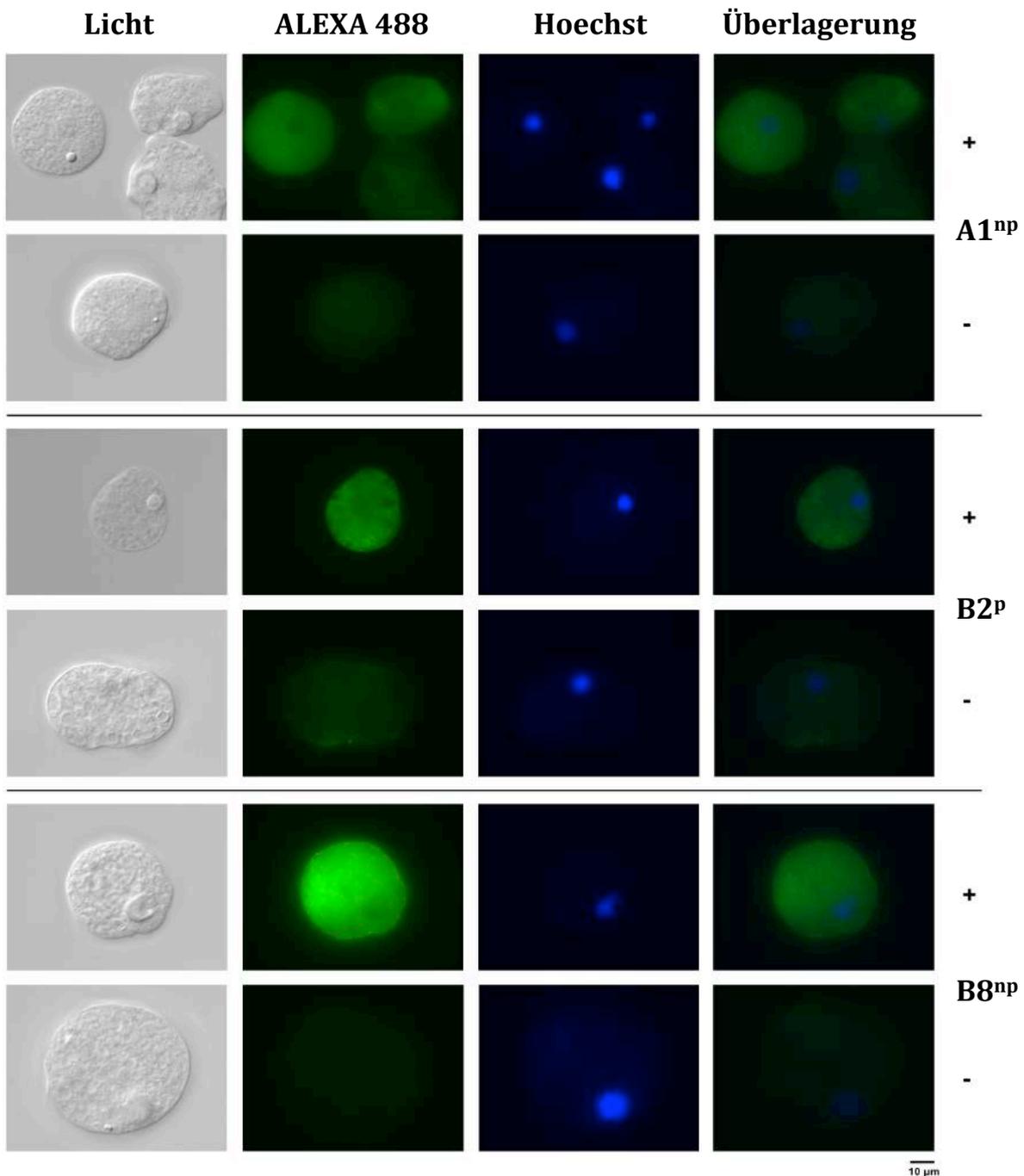


Abbildung 15: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in den Klonen A1^{np}, B2^p und B8^{np}

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten Trophozoiten der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np}. Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Lokalisation wurden die fixierten Trophozoiten mit Saponin behandelt. Beispielhaft ist jeweils eine Zelle dargestellt. In der ersten Spalte ist das Durchlichtbild der jeweiligen Zelle gezeigt, in Spalte 2 das Bild aus dem FITC-Kanal, in Spalte 3 das Bild aus dem DAPI-Kanal und in Spalte 4 die Überlagerung der Bilder aus Spalte 2 und 3. Als primärer Antikörper dient α -EHI_088020 (1:400) und als sekundärer Antikörper α -mouse-ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, konnte die ADH EHI_088020 in allen drei Klonen im Cytoplasma lokalisiert werden. Der Vergleich zwischen den einzelnen Klonen deutet darauf hin, dass Klon B8^{np} eine höhere Konzentration an ADH besitzt.

Ob diese lediglich auf die ADH EHI_088020 zurückzuführen ist lässt sich dabei jedoch nicht sagen, da die Ähnlichkeit der in Abbildung 9 gezeigten Alkoholdehydrogenasen so hoch ist, dass Kreuzreaktionen der ADH EHI_088020 Antikörper mit anderen ADHs nicht ausgeschlossen werden kann.

Um die cytosolische Lokalisation in A1^{np}, B2^p und B8^{np} zu bestätigen, wurden wie in Abbildung 16 gezeigt mehrere Fluoreszenzaufnahmen unterschiedlicher Trophozoiten der einzelnen Klone gemacht und untereinander verglichen. Die in Abbildung 15 gezeigte cytosolische Lokalisation konnte in allen untersuchten Trophozoiten bestätigt werden (Abbildung 16).

Die Untersuchung der nicht mit Saponin behandelten Trophozoiten hingegen zeigte keine Lokalisation der ADH in der Membran.

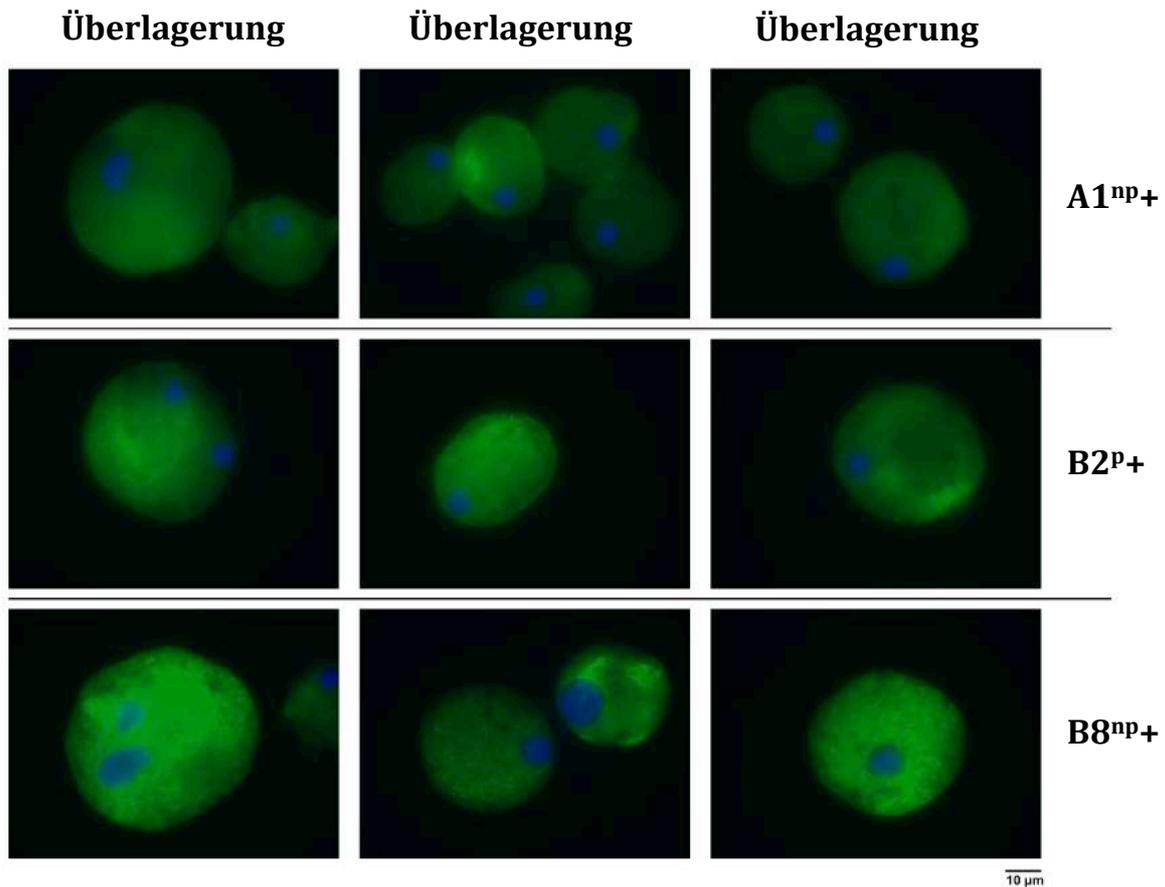


Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in den Klonen A1^{np}, B2^p und B8^{np}

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten Trophozoiten der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np}. Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Lokalisation wurden die fixierten Trophozoiten mit Saponin behandelt. Beispielfhaft sind jeweils drei Zellen aus den DAPI und FITC-Kanal überlagert dargestellt. Als primärer Antikörper diente α -EHI_088020 (1:400) und als sekundärer Antikörper α -mouse-ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

Zur weiteren Analyse wurde eine Lokalisation ebenfalls bei den Trophozoiten der EHI_088020-, EHI_088020Mut-, EHI_160670-, und pNC-(Kontrolle)-Transfektanten durchgeführt. Um einen Einfluss der pNC auf die Lokalisation und/oder Menge an translatiertem Protein auszuschließen, wurde zunächst die Transfektante untersucht, die lediglich mit dem Vektor pNC transfiziert wurde, im Vergleich zum Klon B2^p. Im direkten Vergleich ist in Abbildung 17 zu sehen, dass in den Trophozoiten beider Transfektanten die ADH EHI_088020 im Cytoplasma lokalisiert. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnte nun die pNC-Transfektante als Kontrolle dienen und mit der Lokalisation der ADH in den Transfektanten pNC-EHI_088020, pNC-EHI_160670 und pNC-EHI_088020Mut verglichen werden.

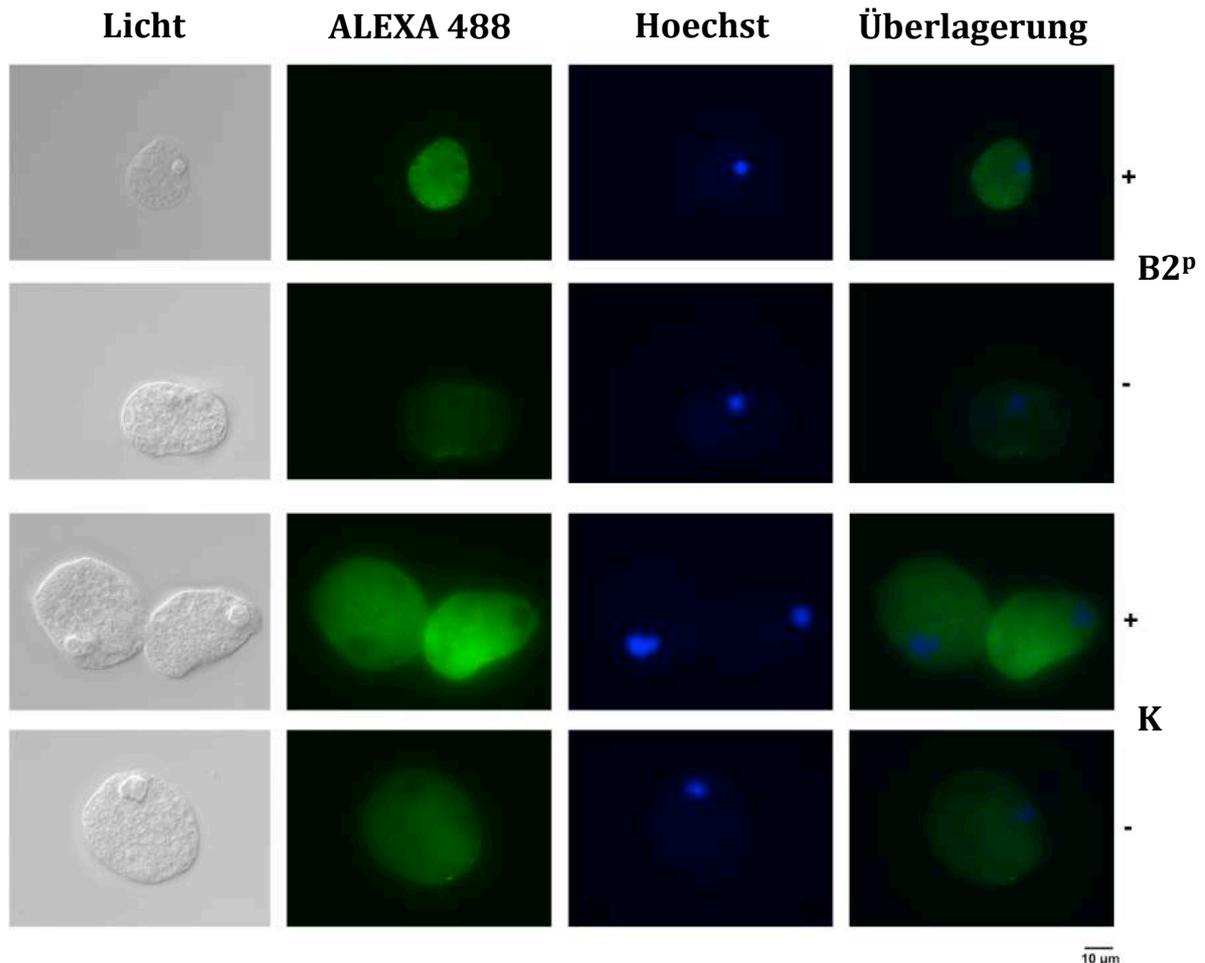


Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in dem Klon B2^p und der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K)

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten Trophozoiten der Klone B2^p und der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) mit dem Leervektor pNC. Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Lokalisation wurden die fixierten Trophozoiten mit Saponin behandelt. Beispielhaft ist jeweils eine Zelle dargestellt. In der ersten Spalte ist das Durchlichtbild der jeweiligen Zelle gezeigt, in Spalte 2 das Bild aus dem FITC-Kanal, in Spalte 3 das Bild aus dem DAPI-Kanal und in Spalte 4 die Überlagerung der Bilder aus Spalte 2 und 3. Als primärer Antikörper diente α -EHI_088020 (1:400) und als sekundärer Antikörper α -mouse-ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

Als nächstes erfolgte der Vergleich der pNC-EHI_088020-Transfektante mit der pNC-(Kontrolle)-Transfektante. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, ist die ADH bei beiden im Cytoplasma lokalisiert. Die Fluoreszenz ist bei beiden Transfektanten gleich stark.

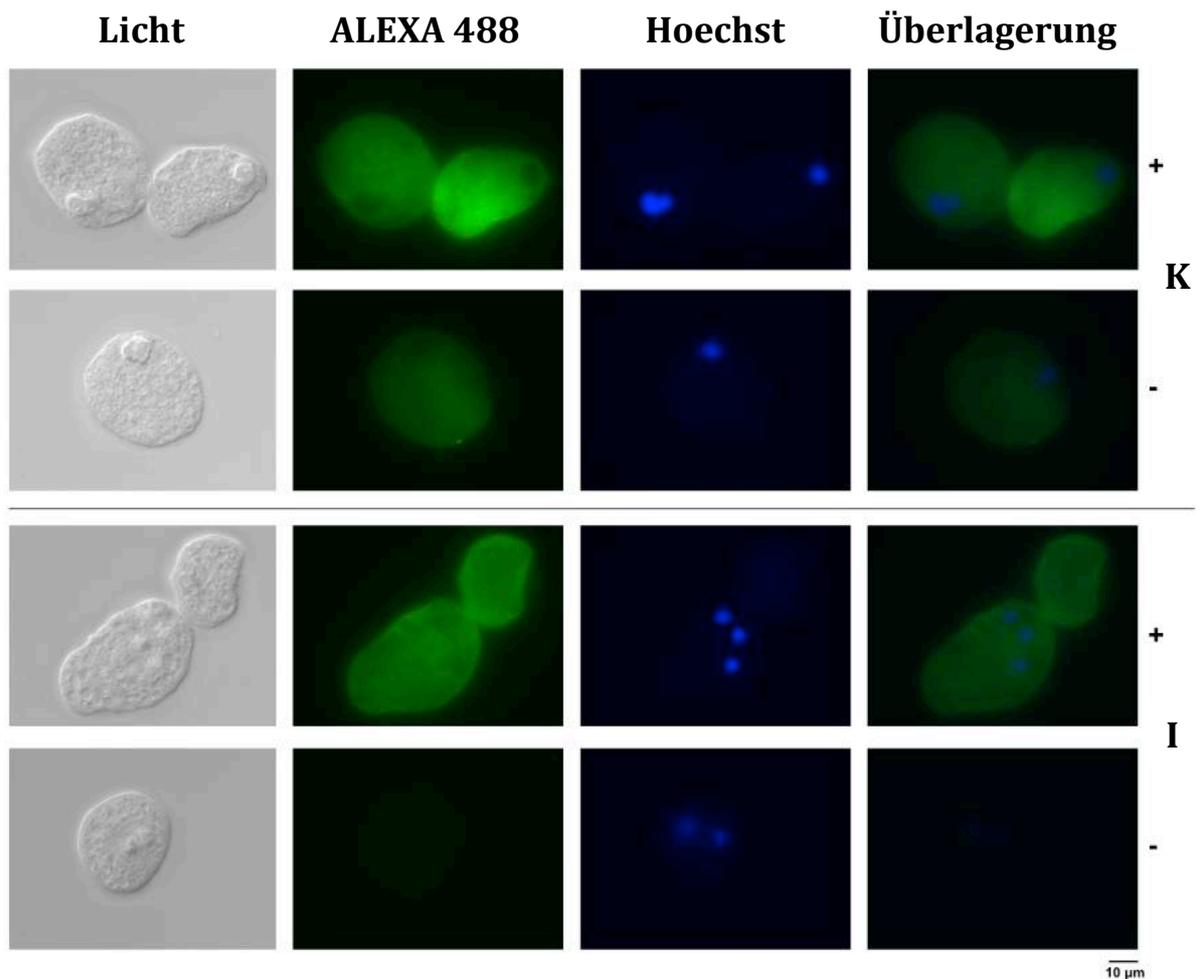


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) und der pNC-EHI_088020-Transfektante (I)

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten Trophozoiten der pNC (Kontrolle)-Transfektante (K) und der pNC-EHI_088020-Transfektante (I). Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Lokalisation wurden die fixierten Trophozoiten mit Saponin behandelt. Beispielhaft ist jeweils eine Zelle dargestellt. In der ersten Spalte ist das Durchlichtbild der jeweiligen Zelle gezeigt, in Spalte 2 das Bild aus dem FITC-Kanal, in Spalte 3 das Bild aus dem DAPI-Kanal und in Spalte 4 die Überlagerung der Bilder aus Spalte 2 und 3. Als primärer Antikörper diente α -EHI_088020 (1:400) und als sekundärer Antikörper α -mouse-ALEXA Fluor[®] 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

Der in Abbildung 18 gezeigte Vergleich der pNC-EHI_160670-Transfektante zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante zeigt eine cytosolische Lokalisation in den Trophozoiten. Die Expression der ADH scheint keinen direkten Einfluss auf die Intensität im Cytosol zu haben.

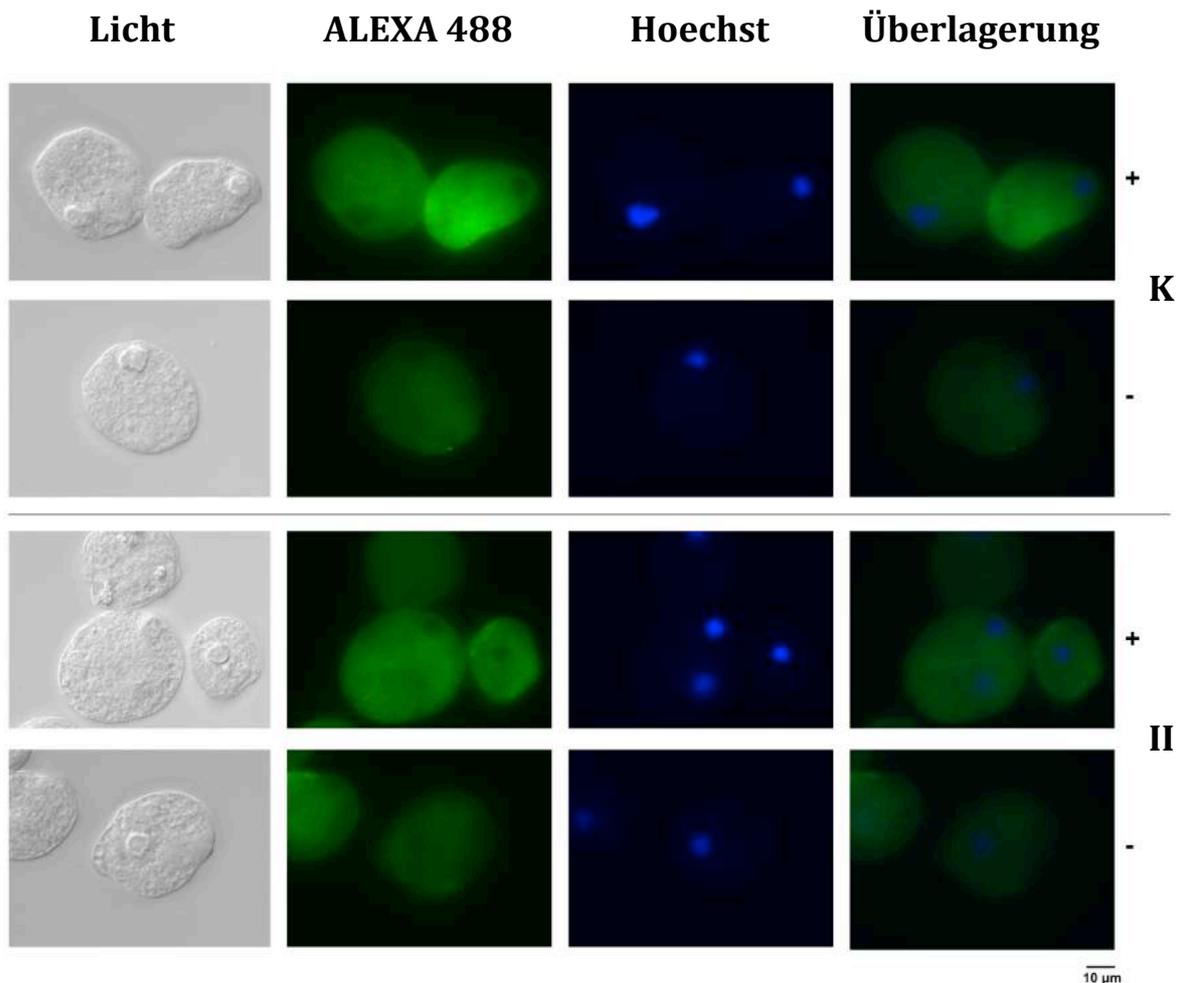


Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in der pNC-EHI_160670-Transfektante (II) und pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K)

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten Trophozoiten der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) und der pNC-EHI_160670-Transfektante (II). Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Lokalisation wurden die fixierten Trophozoiten mit Saponin behandelt. Beispielhaft ist jeweils eine Zelle dargestellt. In der ersten Spalte ist das Durchlichtbild der jeweiligen Zelle gezeigt, in Spalte 2 das Bild aus dem FITC-Kanal, in Spalte 3 das Bild aus dem DAPI-Kanal und in Spalte 4 die Überlagerung der Bilder aus Spalte 2 und 3. Als primärer Antikörper diente α -EHI_088020 (1:400) und als sekundärer Antikörper α -mouse-ALEXA Fluor® 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

Eine cytosolische Lokalisation konnte bei der pNC-EHI_088020Mut-Transfektante und pNC-(Kontrolle)-Transfektante übereinstimmend gezeigt werden. Die Analyse der nicht mit Saponin behandelten Trophozoiten der pNC-EHI_088020Mut-Transfektante lässt auf zwei unterschiedliche Lokalisationen schließen. Während bei 90% der untersuchten Trophozoiten keine Färbung der Membran feststellbar war, zeigten 10% eine Lokalisierung an der Oberfläche der Trophozoiten. Diese Lokalisation konnte für die nicht mit Saponin behandelten Trophozoiten der pNC-EHI_088020- und pNC-EHI_160670-Transfektante nicht gezeigt werden. Es deutet darauf hin, dass bei der pNC-

EHI_088020Mut-Transfektante die ADH ebenfalls an der Membran der Amöben lokalisiert ist.

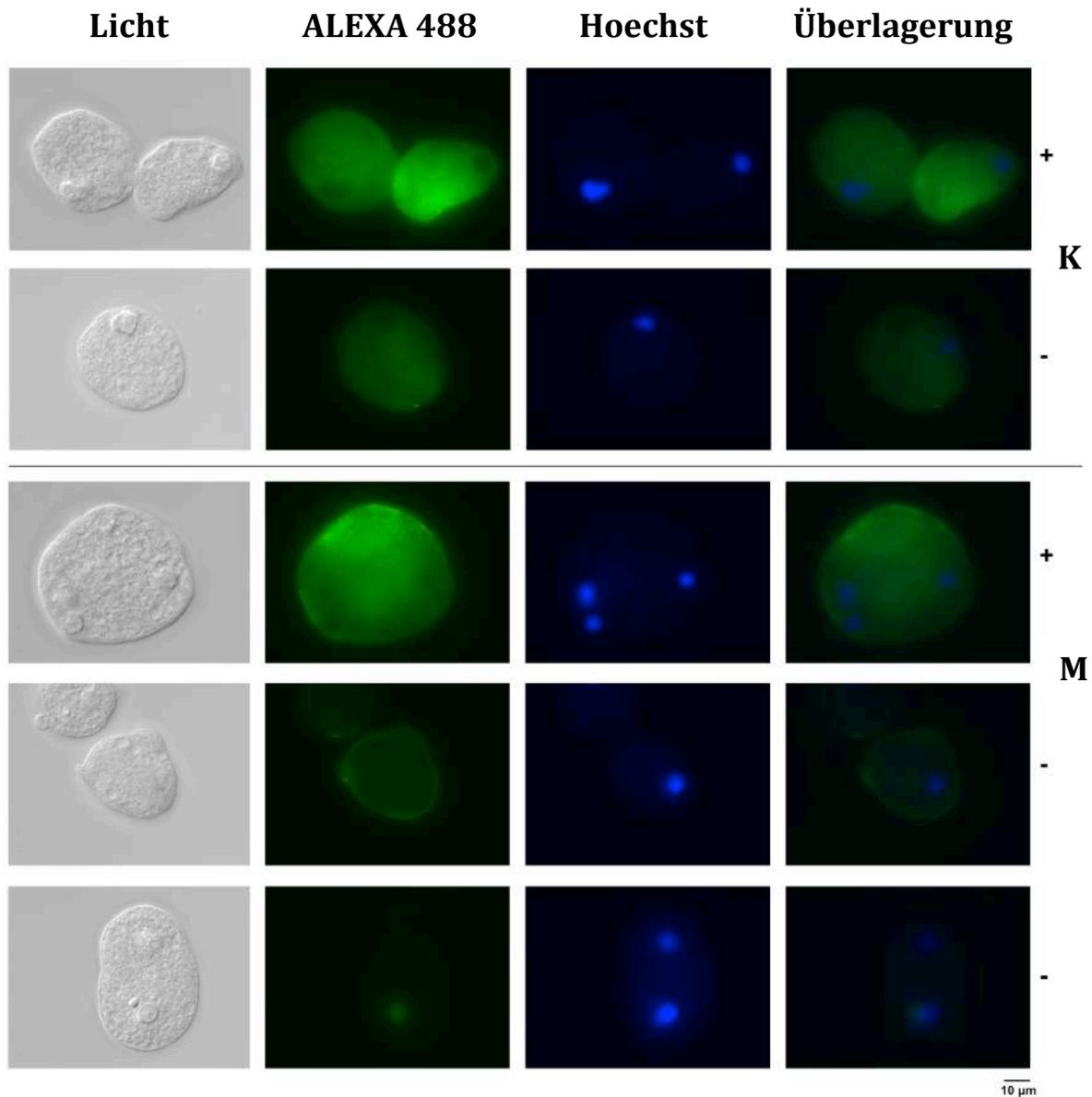


Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Analyse der ADH_088020 von *Entamoeba histolytica* in der pNC-(Kontrolle)-Tranfektante (K) und pNC-EHI_088020Mut-Transfektante (M)

Dargestellt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen von fixierten Trophozoiten der pNC-(Kontrolle)-Transfektante (K) und der pNC-EHI_088020Mut-Transfektante (M). Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Lokalisation wurden die fixierten Trophozoiten mit Saponin behandelt. Beispielhaft ist jeweils eine Zelle dargestellt. In der ersten Spalte ist das Durchlichtbild der jeweiligen Zelle gezeigt, in Spalte 2 das Bild aus dem FITC-Kanal, in Spalte 3 das Bild aus dem DAPI-Kanal und in Spalte 4 die Überlagerung der Bilder aus Spalte 2 und 3. Als primärer Antikörper diente α -EHI_088020 (1:400) und als sekundärer Antikörper α -mouse-ALEXA Fluor® 488 (1:400). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (1:400) angefärbt.

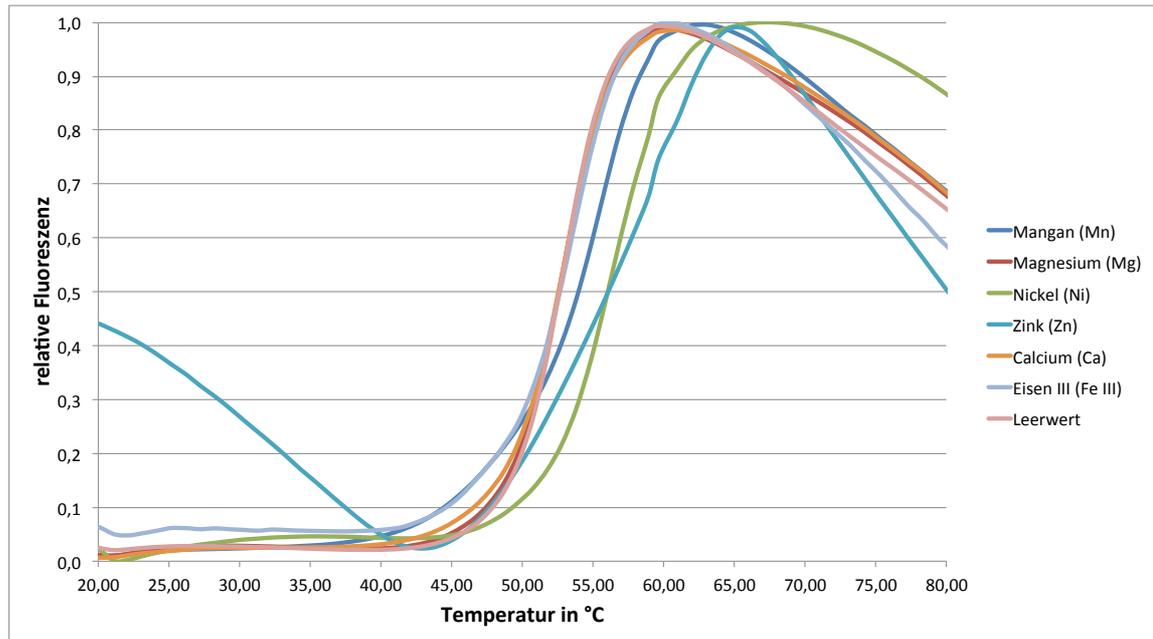
3.4.2 *Thermal Shift Assay*

Die Aktivität eines Proteins kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Neben Bedingungen wie dem pH-Wert oder der Temperatur kann das Vorhandensein eines möglichen Bindungspartners einen wichtigen Einfluss auf Aktivität eines Proteins haben. Die Identifizierung solcher Bindungspartner spielt ebenfalls bei der Proteinkristallisation eine entscheidende Rolle. Das Kristallisationsverhalten kann beispielsweise durch Bindung eines Metallions stabilisiert und die Packung des Kristallgitters positiv beeinflusst werden.

Zur Identifizierung eines möglichen Bindungspartners der ADH EHI_088020 von *E. histolytica* wurde ein *Thermal Shift Assay* mit dem rekombinanten Protein der ADH EHI_088020 durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Methode, bei der ein Protein nach Zugabe möglicher Bindungspartner schrittweise erhitzt und die Thermostabilität fluoreszenzbasiert analysiert wird.

Die Identifizierung eines potentiellen Bindungspartners der ADH EHI_088020 erfolgte in einem ersten Screening mit 6 verschiedenen Metallionen in einer Konzentration von 2 mM. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, zeigte Nickel dabei den größten Einfluss auf die Thermostabilität im Vergleich zu Kontrolle. Ein *Shift* von 5.77 °C lässt sich nach schrittweisem Erhitzen auf 82 °C bei einer Fluoreszenz von 0.5 feststellen.

A



B

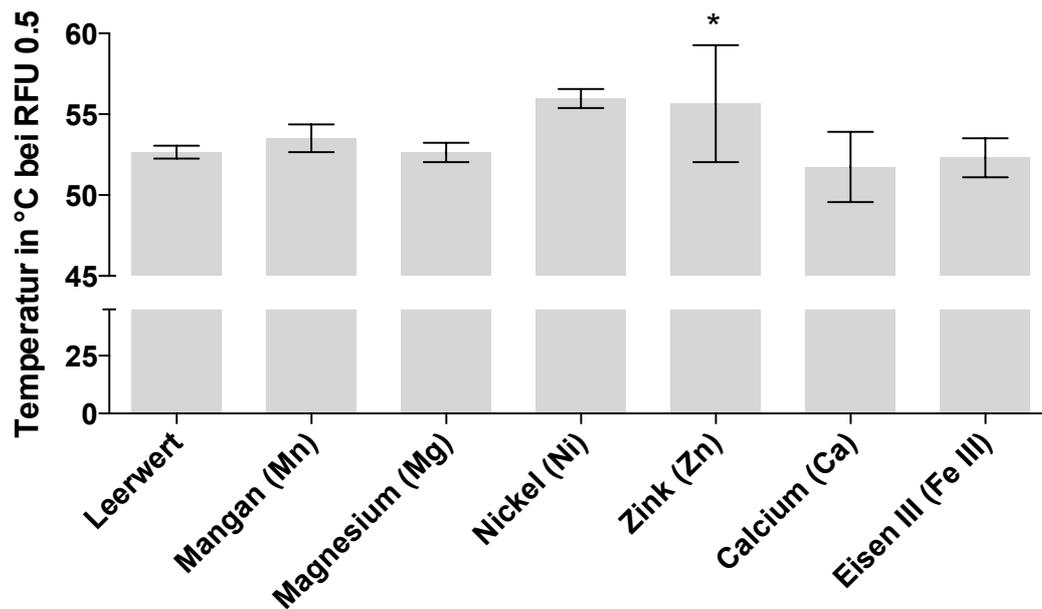


Abbildung 21: Thermal Shift Assay zur Untersuchung verschiedener Metallionen auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020

(A) Zur Bestimmung des Konzentrationsoptimums verschiedener Metallionen auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020, wurden die Metalle in einer Konzentration von 2 mM in den Assay eingesetzt. Als Richtwert der Temperaturverschiebung diente die Schmelzkurve des Proteins ohne Zusatz von Metallionen. Die relative Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit zur Temperatur bestimmt. (B) Zusätzlich wurde die Signifikanz der Temperatur in Abhängigkeit bei einer relativen Fluoreszenz von 0,5 bestimmt und miteinander verglichen. Die Signifikanzberechnung erfolgt über den τ -Test. Die Signifikanz der Temperaturänderung gliedert sich wie folgt: *** $p_{adj} \leq 0,001$; ** $p_{adj} \leq 0,01$; * $p_{adj} \leq 0,05$.

Auf Grundlage dieses Ergebnisses wurde der *Thermal Shift Assay* erneut wie in Abschnitt 2.20.10 beschrieben durchgeführt. Diesmal jedoch wurde Nickel in verschiedenen Konzentrationen zu dem Assay gegeben um das Konzentrationsoptimum zu bestimmen. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, zeigte eine Nickelkonzentration von 0.5 mM den größten Einfluss auf die Thermostabilität der ADH. Ein Temperatur Shift von 5.3 °C lässt sich im Vergleich zur Kontrolle ohne Metallionen beobachten. Die Anwesenheit von Nickel in dieser Konzentration scheint somit einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins zu haben, wodurch es zu einer Stabilisierung in der Konfirmation unter Einfluss von Hitze kommt. Die Messung wurde als Triplikat durchgeführt. Für die Nickelkonzentration von 0,2, 0,5, 1, 2, 2,5, 4 und 5 mM konnte ein Einfluss auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020 gezeigt werden. Das Optimum liegt dabei in einem Bereich zwischen 0,2 und 1 mM Nickel.

Zusätzlich wurde ein Screening verschiedener Zinkkonzentrationen durchgeführt, die jedoch keinen Einfluss auf die Thermostabilität des Proteins zeigten.

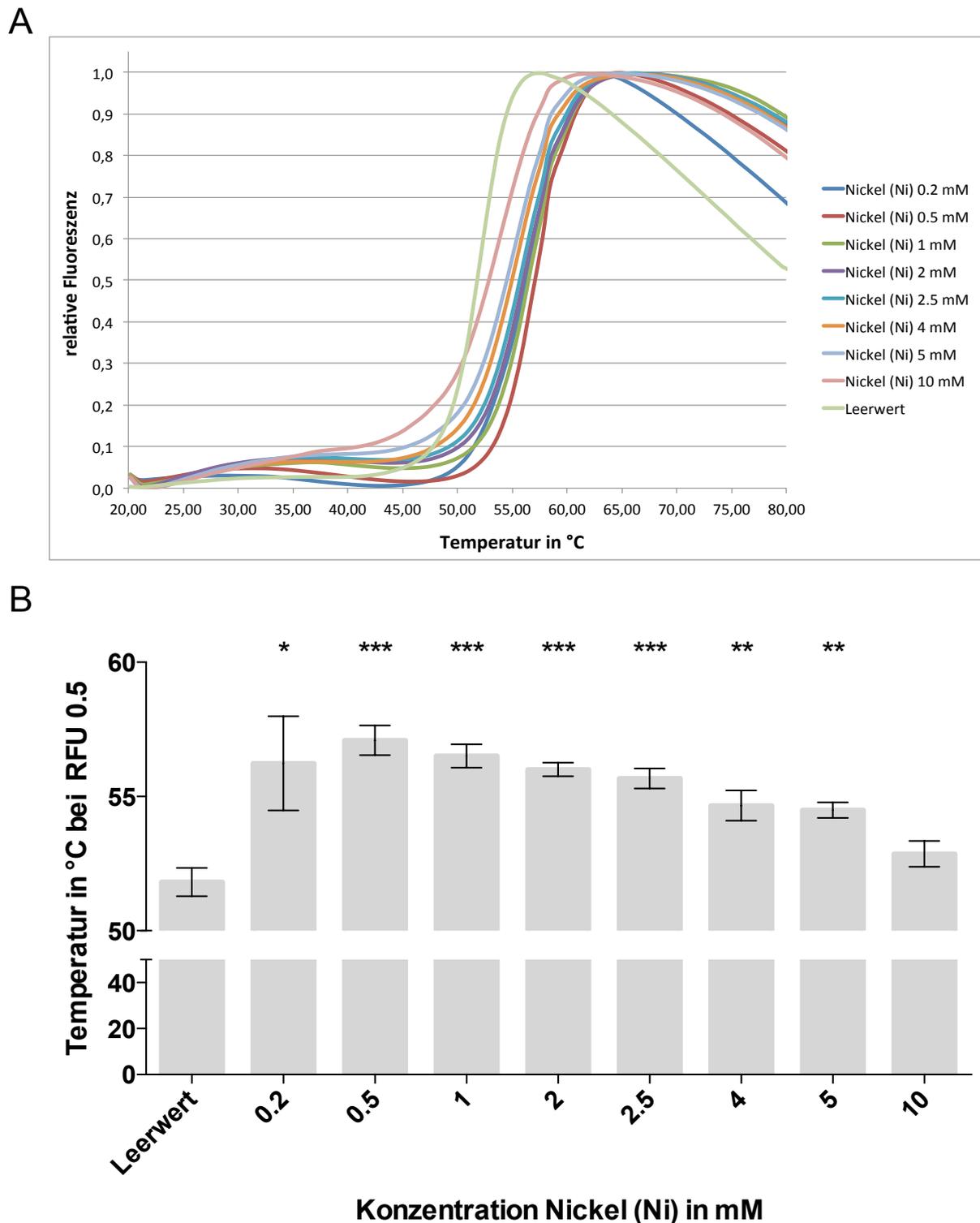


Abbildung 22: Thermal Shift Assay des konzentrationsabhängigen Einflusses von Nickel auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020

(A) Zur Bestimmung des Konzentrationsoptimums von Nickel auf die Thermostabilität der ADH EHI_088020 wurde das Metall in acht Konzentrationsstufen von 0,2 mM – 10 mM zum Assay dazugegeben. Als Richtwert der Temperaturverschiebung diente die Schmelzkurve des Proteins ohne Zusatz von Metallionen. Die relative Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit zur Temperatur bestimmt. (B) Zusätzlich wurde die Signifikanz der Temperatur in Abhängigkeit bei einer relativen Fluoreszenz von 0,5 bestimmt und miteinander verglichen. Die Signifikanzberechnung erfolgt über den τ -Test. Die Signifikanz der Temperaturänderung gliedert sich wie folgt: *** $p_{adj} \leq 0,001$; ** $p_{adj} \leq 0,01$; * $p_{adj} \leq 0,05$.

Auf Basis dieses Ergebnisses wurde ein erster Versuch vorgenommen die Aktivität des rekombinant exprimierten Proteins unter Anwesenheit von Nickel in einer Konzentration von 0,5 mM zu zeigen. Bisher konnte jedoch keine Aktivität gemessen werden. Weitere Messungen unter geänderten Bedingungen und erweitertem Substratspektrum sind geplant.

3.5.3 Kristallisation zur Röntgenstrukturanalyse der ADH EHI_088020 von *E. histolytica*

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur der ADH EHI_088020 von *E. histolytica*, wurde das gereinigte Protein für die Kristallisation eingesetzt. Durch Verwendung der *Sitting Drop* Methode im 96 Well Format wurde ein Screen der möglichen Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Durch Dampfdiffusion kommt es zu einem Konzentrationsausgleich zwischen der Reservoirolösung und dem Tropfen. Zur Entstehung eines ausreichend großen Einheitskristalles wird zunächst eine gesättigte Proteinlösung benötigt. Durch die Verringerung des Anteils an löslichem Protein kommt es zur Keimbildung in der labilen Zone, dem ein amorpher Niederschlag voraus gehen kann. Nach Entstehung der Keime kommt es in der metastabilen Zone anschließend zum Kristallwachstum.

Durch Verwendung des JB Screen Plus HTS Kit von Jena (Bioscience GmbH) konnten für mehrere Bedingungen Proteinkristalle mit nadelförmiger Struktur generiert werden. Zur weiteren Optimierung der Kristallstruktur wurde mit der Bedingung A5 weiter gearbeitet, bestehend aus 0,2 M Magnesiumformat und 20 % (w/v) PEG 3350 (siehe Abbildung 23 A). Auf Grundlage dieser Bedingung wurde ein *Refinement* der einzelnen Komponenten der Reservoirolösung durchgeführt und optimierte Kristalle bei einer Bedingung von 0,26 M Magnesiumformat und 21,5 % (w/v) PEG 3350 erzielt. Die durch das Refinement generierten, orthorhombischen Kristalle zeigten Abmaße von 0,18 x 1 x 0,18 mm und wurden für weitere Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse verwendet (Abbildung 23 B).

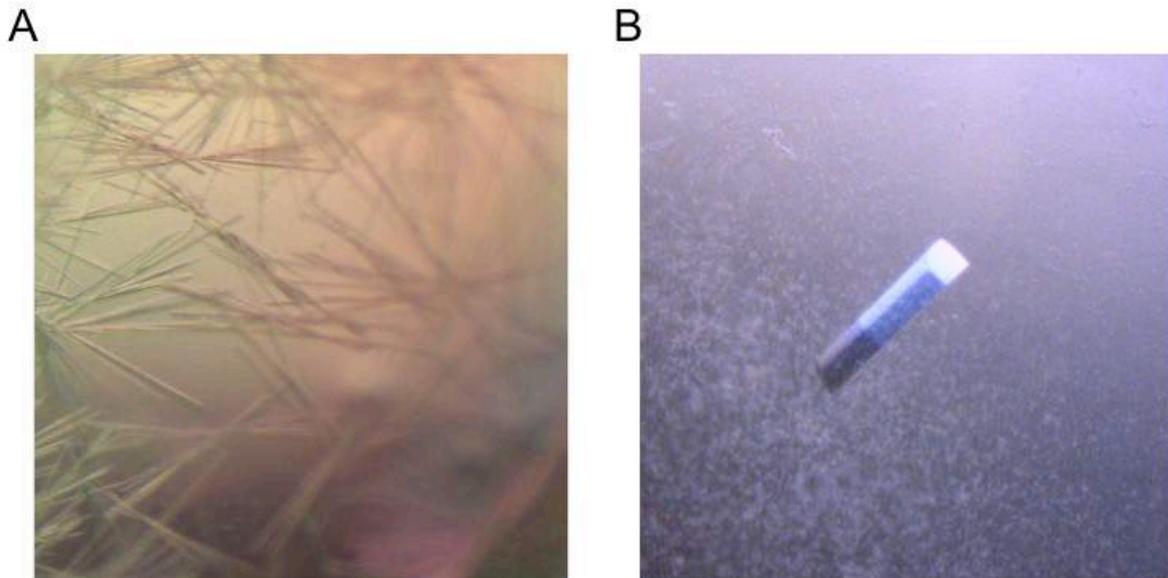


Abbildung 23: Kristalle der ADH EHI_088020 von *E. histolytica*

(A) Erste Kristalle wurden nach 24 h Inkubation unter Verwendung einer Reservoirlösung von 0,2 M Magnesiumformat und 20 % PEG 3350 des JB Screen Plus HTS Kit von Jena (Bioscience GmbH) generiert. (B) Kristalle der ADH EHI_088020 von *E. histolytica* mit den Maßen 0,18 x 1 x 0,18 mm konnten unter Einsatz einer optimierten Reservoirlösung bestehend aus 0,26 M Magnesiumformat und 21,5 % (w/v) PEG 3350 generiert.

Die ersten Versuche zur Röntgenstrukturanalyse der ADH EHI_088020 von *E. histolytica* unter Nutzung der in Abbildung 23 gezeigten Kristalle wurde freundlicher Weise von Dr. Sophia Reindl, Dr. Maria Lehman, Tobias Holm und Dominik Vogel am DESY, Beam Line B13, PETRA III, Hamburg gemacht. Mit einer Auflösung von 4.5 Å ist jedoch die Qualität bisher nicht gut genug, um die Struktur eindeutig lösen zu können. Weitere *Refinements* der Kristallisationsansätze werden daher durchgeführt.

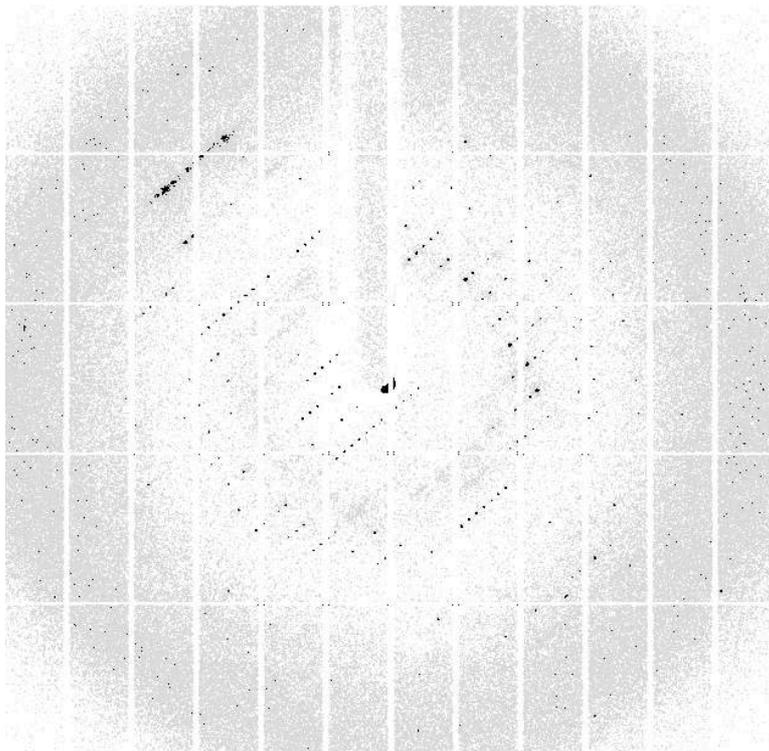


Abbildung 24: Streubild der ADH EHI_088020 von *E. histolytica*
Die Aufnahme des Streubildes der Kristalle der ADH EHI_088020 erfolgte am DESY, Beam Line B13, PETRA III in Hamburg. Eine Auflösung von 4.5 Å konnte erreicht werden.

4. Diskussion

Der parasitische Protozoon *E. histolytica* sorgt als Auslöser der Amöbenruhr und des Amöbenleberabszesses besonders in Entwicklungsländern für schwere Probleme im öffentlichen Gesundheitswesen. Mit 50 Mio. Infizierten weltweit und 40-100000 Todesfällen jährlich stellt *E. histolytica* den dritt wichtigsten humanpathogenen Parasiten dar (WHO, 1998). Verläuft eine Infektion bei 90 % symptomfrei ab, entwickelt sich bei 10 % eine invasiv intestinale Amöbiasis, deren Symptome von Bauchschmerzen bis blutigem Durchfall reichen können und als extra intestinale Verlaufsform sogar Abszesse in Organen wie der Leber, Lunge oder Niere verursachen (Buchard und Tannich, 2004). Obwohl die Krankheit hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten angesiedelt ist, konnte sie in allen Breitengraden gefunden werden (Brandt und Tamayo, 1970). Überraschenderweise werden inzwischen gehäuft auch Infektionen in nicht endemischen Gebieten wie Australien oder Japan nachgewiesen (Stark *et al.*, 2008). Trotz intensiver Forschung konnte der genaue Mechanismus, der zu Entstehung der Pathogenität des Erregers führt, bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Die bisherige Annahme, dass ausschließlich Proteine wie das Galaktose/*N*-Acetyl-D-Galaktosamin, Amoebapores oder Cysteinpeptidasen für die Virulenz des Parasiten entscheidend sind, konnten aufgrund diverser Studien zwischen pathogenen Isolaten wie HM-1:IMSS und nicht-pathogenen Isolaten wie *E. dispar* oder *E. histolytica* RAHMANN nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint es, dass der Pathogenität von *E. histolytica* ein komplexer Mechanismus zugrunde liegt.

4.1 Vergleichende Transkriptionsanalysen

Da der Mechanismus, der zur Pathogenität von *E. histolytica* führt, bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte, wird weiterhin fieberhaft an dessen Entschlüsselung geforscht. Ein gängiges Mittel zur Identifizierung solcher Pathogenitätsfaktoren stellt der Vergleich von pathogenen mit nicht pathogenen Isolaten dar. In ersten Untersuchungen auf Transkriptionsebene konnten bereits vielversprechende Kandidaten präsentiert werden. Überraschenderweise jedoch kommt es beim Vergleich dieser Kandidaten unterschiedlicher Forschungsgruppen kaum zu nennenswerten Überschneidungen (MacFarlane und Singh, 2006; Davis *et al.*, 2007). Der Grund dafür

liegt quasi auf der Hand. Bisher bestand lediglich die Möglichkeit des Vergleiches von Zelllinien, die keinen gemeinsamen genetischen Ursprung haben. Analysen des nicht-pathogenen Isolates RAHMANN beispielsweise zeigen Defekte in dessen Erythrophagozytose-Fähigkeit auf (Davis *et al.*, 2006). Ein erstes Indiz dafür, dass ein Vergleich aufgrund der genetischen Varianz zu keinem glaubhaften Ergebnis führen kann, Schlüssel-moleküle der Pathogenität definieren zu können. Biller und Kollegen gelang 2010 der entscheidende Sie isolierten zwei syngene Zelllinien aus dem pathogenen Isolat HM-1:IMSS, die sich jedoch erstaunlicherweise in ihrer Pathogenität unterscheiden. Zelllinie A ist nicht mehr in der Lage ALAs im Tiermodell zu generieren, während Zelllinie B pathogen ist (Biller *et al.*, 2010; Biller *et al.*, 2009).

Um sicherzustellen, dass in folgenden Untersuchungen mit einer homogenen Zellpopulation gearbeitet wird, wurden die Zelllinien A und B kloniert und diese Klone auf ihre Pathogenität im Tiermodell hin untersucht. Während alle Klone der Zelllinie A nicht-pathogen waren, zeigte sich in der Pathogenität der einzelnen Klone von Zelllinie B eine hohe Streuung. Neben Klonen wie B2^p, die hoch pathogen waren, konnten ebenfalls Klone wie B8^{np} gefunden werden, die keine Pathogenität mehr aufwiesen (Dissertation Matthiesen, 2012).

Zur Analyse potentieller Pathogenitätsfaktoren wurde in allen weiteren Studien mit dem nicht-pathogenen Klon A1^{np}, dem pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} gearbeitet.

In einer ersten Transkriptomstudie zwischen dem nicht-pathogenen Klon A1^{np} und dem pathogenen Klon B2^p konnten bereits 76 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die als mögliche Pathogenitätsfaktoren in Frage kommen (Dissertation Fehling, 2015).

In dieser Arbeit sollte nun eine vergleichende Transkriptomanalyse des pathogenen Klon B2^p und dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} durchgeführt werden. Dabei konnten 19 Gene als differentiell exprimiert identifiziert werden. Hierbei waren 12 Gene in B8^{np} höher exprimiert als in B2^p und 7 Gene in B2^p höher als in B8^{np} exprimiert.

Bei den in dieser Arbeit identifizierten Genen handelt es sich um 10 Gene, die zu den hypothetischen Proteinen zählen. Diesen konnte bisher keine biologische Funktion zugeordnet werden, was sie zu einem besonders interessanten Ziel der Untersuchung macht. Die Menge an gefundenen hypothetischen Proteinen jedoch ist keine Überraschung, da zuvor bereits gezeigt werden konnte, dass 32 % der 8201

vorhergesagten Gene von *E. histolytica* für Proteine unbekannter Funktion kodieren (Loftus *et al.*, 2005).

4.2 Einfluss der Überexpression differentiell exprimierter Gene auf die Pathogenität im Klon B2^p

Bei der Transkriptomanalyse zwischen dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} und dem pathogenen Klon B2^p konnten 12 Gene höher exprimiert in der Zelllinie B8^{np} gefunden werden. Für 10 dieser Gene konnten erfolgreich Überexprimierer generiert und diese im Tiermodell auf ihren Einfluss in der Leberabszessbildung hin untersucht werden.

4.2.1 Einfluss der Phosphoserinaminotransferase auf die Pathogenität

Phosphoserinaminotransferasen gehören zur Gruppe IV der Aminotransferasen (Hester *et al.*, 1999). Sie bilden Homodimere mit einer Größe von 86 kDa (Schneider *et al.*, 2000). Ihr Cofaktor ist Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) (Mehta *et al.*, 1993). Entfernt man den Cofaktor, so ist keine Aktivität der PSAT mehr zu beobachten (Schneider *et al.*, 2000).

Phosphoserinaminotrasferasen katalysieren den zweiten Schritt in der L-Serin Synthese. L-Serin wiederum dient als Baustein in diversen Stoffwechselwegen und ist essentiell für die Generierung von Aminosäuren wie Glycin, L-Cystein und L-Methionin.

E. histolytica besitzt eine Vielzahl an Stoffwechselwegen für stickstoffhaltige Aminosäuren. Die Serinbiosynthese als Teil des Phosphorylierungsstoffwechsels greift so beispielsweise in die Regulation der Cysteinsynthese ein und hat einen Einfluss auf das Überleben des Parasiten und der Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress (Nozaki *et al.*, 1999). In der Transkriptionsanalyse konnte eine vierfach erhöhte Transkriptmenge im nicht-pathogenen Klon B8^{np} im Vergleich zum pathogenen Klon B2^p detektiert werden.

Allerdings führte die Überexpression der EhPSAT im Klon B2^p nicht zur Verkleinerung der Abszesse.

Dies war auch eigentlich nicht zu erwarten, da eine gesteigerte Produktion an L-Serin durch die erhöhte Menge an EhPSAT theoretisch zu einer vermehrten Produktion von L-Cystein führen müssen, was wiederum die Fitness der Amöben sogar verbessern müsste.

4.2.2 Einfluss von Aktobindin auf die Pathogenität

Das Aktincytoskelett eukaryotischer Zellen ist ein dynamisches Netzwerk und beteiligt an diversen biologischen Vorgängen wie Bewegung, Zellanheftung oder intrazellulärem Transport.

Um schnell auf Änderungen durch externe oder interne Einflüsse reagieren zu können hat die Zelle ein Repertoire an Molekülen, die auf das Cytoskelett einwirken können (dos Remedios *et al.*, 2003).

Das Aktinmonomer bindende Protein Aktobindin wurde 1986 in *Decantamoeba Castellani* entdeckt (Lambooy und Korn, 1986). Es handelt sich dabei um ein Homodimer mit einer Größe von 25 kDa. Es bindet G-Aktin Monomere und reduziert so die Menge an freiem Monomeren, die nicht mehr zur Polymerisation zur Verfügung stehen (Lambooy und Korn, 1988).

Inzwischen konnte Aktobindin in Lamellopodien und Filopodien lokalisiert werden (Bubb *et al.*, 1998). Die Bindung des ATP-G-Aktins erfolgt über β -Thymosin Wiederholungen (Hertzog *et al.*, 2002).

Der Vergleich zwischen dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} und dem pathogenen Klon B2^p zeigte eine 3.5 fach erhöhte Transkriptmenge des Aktobindins im Klon B8^{np}.

Die differentiell hochregulierte Transkriptmenge des Aktobindins widerspricht jedoch unseren Beobachtungen, dass der nicht-pathogene Klon B8^{np} im direkten Vergleich mit dem pathogenen Klon B2^p eine erhöhte Motilität aufweist (Meyer *et al.*, 2016 eingereicht). Die Funktion von Aktobindin G-Aktin Monomere zu binden hätte zu einer verringerten Motilität im Klon B8^{np} führen müssen.

Das Vorhandensein von Aktobindin scheint daher nicht mit der Motilität der Trophozoiten zu korrelieren.

Die Überexpression von EHI_039020 im pathogenen Klon B2^p führte daher wenig überraschend zu keiner Verringerung der Abszessgröße im Tiermodell. Eine regulierende Wirkung von Aktobindin auf die Pathogenität kann daher ebenfalls ausgeschlossen werden.

Der Grund für die differentielle Regulierung von Aktobindin EHI_039020 im Transkriptomvergleich zwischen B2^p und B8^{np} bleibt weiter unklar.

4.2.3 Einfluss der AIG's auf die Pathogenität

Eines der Molekülklassen, die in alle vergleichenden Transkriptomanalysen immer wieder auftauchen, ist die Familie der AIG's. Diese als *avirulence induced genes* bezeichneten Moleküle wurden bisher noch kaum untersucht. Biller und Kollegen konnten 2010 anhand einer BLAST Analyse zeigen, dass es sich in *E. histolytica* um eine Familie, bestehend aus 47 Mitgliedern handelt (Biller *et al.*, 2010).

Die Mitglieder der AIG1 Familie aus *E. histolytica* zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu GTPasen von immunassoziierten Proteinen, die zwischen Wirbeltieren und Bedecktsamern hoch konserviert sind (Nitta *et al.*, 2007). Die Moleküle besitzen eine durchschnittliche Größe von 20-45 kDa und zeigen 3 GTP Bindungsmotive.

Leider konnte die physiologische Relevanz dieser kleinen GTPasen bisher nicht geklärt werden und macht sie so zu einem besonders interessanten Ziel als mögliche Pathogenitätsfaktoren.

Die einzigen bisherigen Hinweise auf deren Funktion liefern Homologe aus Pflanzen. AIG's konnten dort erstmals aus *Arabidopsis* isoliert werden. Diese konnten nach Parasitenbefall als reguliert identifiziert und deren Einfluss auf die Abwehr von Pathogenen so gezeigt werden (Reuber und Ausubel, 1996).

Das Auffinden eines im nicht-pathogenen Klon B8^{np} signifikant hochregulierten AIG Gens überrascht, da diese in vorherigen Studien fast ausschließlich in pathogenen Zelllinien hoch reguliert identifiziert werden konnten (Biller *et al.*, 2010).

Allerdings konnte bei der Überexpression von AIG EHI_180390 in B2^p auch keine Verkleinerung der Abszessgröße beobachtet werden.

4.2.4 Einfluss der hypothetischen Proteine auf die Pathogenität

Im Vergleich der Transkriptomdaten der Klone B2^p und B8^{np} konnten 6 hypothetische Proteine als differentiell hochreguliert im nicht-pathogenen Klon B8^{np} identifiziert werden. Für das Gen EHI_037160 konnte durch eine Domänenvorhersage eine Zink-Finger Domäne gezeigt werden, die typisch für cysteinreiche Proteine ist.

In Säugetieren bildet diese Klasse von Molekülen die größte Familie an regulatorischen Proteinen. Sie können DNA binden und so die Transkription spezifischer Zielgene regulieren (Iuchi, 2001). Inzwischen konnten jedoch auch Moleküle identifiziert werden,

die über ihre Zink-Finger Domäne regulatorisch einzelsträngige RNA binden können (Wai *et al.*, 2016).

Obwohl bereits 1993 ein Protein mit einer Zink-Finger Domäne aus *E. histolytica* identifiziert werden konnte, blieb eine weitere Charakterisierung und mögliche Bedeutung für den Lebenszyklus des Parasiten aus (Stanley und Li, 1992).

Die Vermutung liegt jedoch Nahe, dass das hypothetische Protein EHI_037160 einen regulatorischen Einfluss auf DNA oder RNA Ebene im Trophozoiten hat.

Leider ließ sich das Gen in dieser Arbeit nicht überexprimieren. Weitere Versuche eine stabile Transfektante zu generieren sind daher geplant, um deren Einfluss auf die Pathogenität zu untersuchen.

Für die restlichen Gene, die für hypothetische Proteine kodieren, gelang es erfolgreich überexprimierende Transfektanten zu generieren und deren Einfluss auf die Pathogenität im Mausmodell hin zu überprüfen.

Für das Gen EHI_151930 konnte eine HAD Domäne vorhergesagt werden, wie sie typisch ist bei Mitgliedern der HAD Superfamilie. Dazu gehören beispielsweise Phosphatasen, ATPasen oder Dehalogenasen.

Diverse ATPasen konnten in *E. histolytica* beschrieben werden und haben beispielsweise einen Einfluss auf die Calcium Homöostase oder den Stofftransport im Trophozoiten (Martinez-Higuera *et al.*, 2013).

Die Überexpression der drei hypothetischen Gene EHI_151930, EHI_062960 und EHI_056490 in Klon B² zeigten keine Reduktion der Abszessgröße.

Die Überexpression des Gens EHI_048140, zeigt erstaunlicherweise sogar eine Zunahme der Abszessgröße. Der Grund für die gesteigerte Pathogenität jedoch lässt sich nicht erklären.

Für das Gen EHI_058920 konnte eine vierfach erhöhte Transkriptmenge im nicht-pathogenen Klon B8^{np} im Vergleich zum pathogenen Klon B2^p detektiert werden.

Die Überexpression des Gen EHI_058920 führt zu einer Verkleinerung der Abszesse. Da die biologische Funktion des Proteins unbekannt ist, können leider keine Gründe für den Einfluss auf die Pathogenität gefunden werden. Zur weiteren Analyse soll der Einfluss der Überexpression auf Transkriptomebene im pathogenen Klon B2^p durch mRNA Seq bestimmt werden.

4.2.5 Einfluss der ADHs EHI_088020 und EHI_160670 auf die Pathogenität

Die Einteilung der Alkoholdehydrogenase erfolgt in 3 Klassen, anhand ihrer jeweiligen Aminosäuresequenz (Vallee und Bazzone, 1983; Reid und Fewson, 1994).

Beim Transkriptionsvergleich zwischen den Klonen B2^p und B8^{np} konnten die beiden Gene der Alkoholdehydrogenasen EHI_160670 und EHI_088020 als differentiell hochreguliert im nicht-pathogenen Klon B8^{np} identifiziert werden. Durch Sequenzanalysen konnte festgestellt werden, dass die Aminosäuresequenz beider ADHs identisch ist und es sich bei einem der beiden Gene um ein Genduplikat handeln muss, das bisher falsch im Genom von *E. histolytica* annotiert wurde. Mit ihrer Länge von ca. 382 Aminosäuren zählen diese ADHs von *E. histolytica* zur Gruppe III der Alkoholdehydrogenasen, die sich durch eine Metallabhängigkeit auszeichnen und bakteriellen Ursprungs sind (Elleuche *et al.*, 2013).

Sehr wahrscheinlich sind sie in das Genom von *E. histolytica* über lateralen Gentransfer gelangt (Nixon *et al.*, 2007).

Die für die ADHs kodierenden Gene EHI_160670 und EHI_088020 konnten erfolgreich im pathogenen Klon B2^p überexprimiert werden. Für beide Transfektanten konnte eine signifikante Reduktion der Abszessgröße im Tiermodell beobachtet werden.

Der genaue Grund für die Reduktion der Abszessgröße ist bisher unklar. Bekannt ist, dass die Trophozoiten über den Lebersinusoid in die Hepatozyten gelangen. Nach dem Eindringen in das Gewebe werden diese durch rekrutierte Immunzellen immobilisiert und in der frühen Phase der Leberabszessbildung kommt es durch IFN γ -produzierenden NKT Zellen, insbesondere bei weiblichen Individuen, zur Kontrolle des Abszesses (Lotter *et al.*, 2009; Lotter *et al.* 2013). Der Trophozoit wird lysiert und es entsteht ein sogenannter inflammatorischer Foki (Rigothier *et al.*, 2002).

Die Vermutung liegt nun nahe, dass das Vorhandensein, der in dieser Arbeit untersuchten Alkoholdehydrogenasen, die Immunantwort des Wirtes moduliert. Die ADHs scheinen auf der Oberfläche lokalisiert zu sein (Biller *et al.*, 2013) oder können nach Lyse des Trophozoiten aus dem Cytosol freigesetzt werden.

Kupferzellen sind residente Makrophagen in der Leber. Sie kommen daher als erste in Kontakt mit den Trophozoiten nach Eindringen in die Hepatozyten. Diese schütten wiederum inflammatorische Cytokine wie IL-6, IL-1 β und TNF α , sowie Chemokine (CCL2) aus. Diese führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten, NKT Zellen, NK Zellen und HSCs (Caligiuri *et al.*, 2015). Das pro-inflammatorische

Zytokinprofil polarisiert über CCL2- rekrutierte Monozyten, insbesondere bei männlichen Individuen, zu inflammatorischen TNF α - sowie NO- produzierenden Macrophagen, die die Abszessentstehung intensivieren (Helk *et al.*, 2013). In der Folge könnte dies zu einer verminderten Kollagensynthese führen (Friedman, 1999).

Die vermehrte Aktivierung von HSCs und Kupfferzellen durch die ADH EHI_088020 könnte durch eine Verstärkung der Produktion an extrazellulärer Matrix (Kollagen oder Fibrinogen) den inflammatorischen Prozess konterregulieren und zu einer schnelleren Ausheilung des Abszesses beitragen. Untersuchungen von Hyon-Seung und Kollegen konnten zeigen, dass die ADH3 in der Mäuseleber ebenfalls zur Klasse III der Alkoholdehydrogenasen gehört und für den Retinol-Stoffwechsel in Hepatozyten von Bedeutung ist. Die ADH3 führt hier zu einer Aktivierung von HSCs (*hepatic stellate cells* - hepatische Sternzellen) und verstärkter Produktion extrazellulärer Matrix (Yi *et al.*, 2014).

Eine immunmodulatorische Wirkung der ADH EHI_088020 aus *E. histolytica* setzt eine Präsentation dieser voraus. Auf die Frage wie es zur Präsentation der ADH EHI_088020 kommen könnte, obwohl diese als cytosolisch lokalisiert wurde, wird in Abschnitt 4.8.2 näher erläutert. In der Proteomstudie der Trophozoiten von *E. histolytica* konnten Biller und Kollegen 2013k zeigen, dass die ADH EHI_125959, die eine 59 % ige Identität zur ADH EHI_088020 aufweist und ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Leberabszessgröße durch Überexpression im pathogenen Klon B2^p zeigt, ebenfalls als membranassoziiert nachgewiesen werden kann. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die ADH EHI_088020 und die ADH EHI_125950 einen modulatorischen Einfluss auf die Immunantwort im Wirt haben könnten.

Der genaue Weg der Aktivierung jedoch bleibt unklar und müsste durch weitere Experimente untersucht werden.

4.3 Einfluss der Überexpression auf die Pathogenität im nicht-pathogenen Klon B8^{np}

4.3.1 Einfluss der Methioningammalyase auf die Pathogenität

Die beiden Gene EHI_144610 und EHI_057550 kodieren für eine Methioningammalyase (EhMGL). Bei Analyse beider Gene stellte sich heraus, dass deren Sequenz komplett gleich ist. Die Vermutung liegt daher nahe, dass es sich bei einem der beiden um ein Genduplikat handelt.

Die Methioningammalyase EHI_144610 wurde bereits intensiv in Amöben untersucht. Methioningammalysen katalysieren den Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren zu α -Ketonsäuren, Ammonium und Thiolen (Anderson und Loftus, 2005). In *E. histolytica* spielen sie eine besonders wichtige Rolle in der Degradation der toxischen schwefelhaltigen Aminosäuren und im Energiestoffwechsel durch die Synthese von Pyruvat. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die in *E. histolytica* gefundenen Methioningammalysen durch lateralen Gentransfer von den Archea ins Genom integriert worden sind und so das Stoffwechselrepertoire des Parasiten erhöht haben. Interessanterweise sind Methioningammalysen in vielen Bakterien, Pflanzen und Protozoen zu finden, jedoch nicht in Säugetieren, wodurch sie einen interessanten Angriffspunkt für Therapeutika liefern.

Es konnten zwei Isoformen für das Enzym im Genom von *E. histolytica* gefunden werden (Tokoro *et al.*, 2003). EHI_144610 kodiert dabei für die EhMGL1, während das Gen EHI_142250 für die EhMGL2 kodiert. Beide Isoformen wurden bereits erfolgreich kristallisiert und die dreidimensionale Struktur gelöst (Sato *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2008).

Die Tatsache, dass lediglich eine der beiden Isoformen einen 3,2-fach erhöhte Transkriptmenge im pathogenen Klon B2^p im Vergleich zum nicht-pathogenen Klon B8^{np} aufweist, ist rätselhaft. Bei Kontrolle der Transkriptomdaten konnte die zweite Isoform als nicht reguliert gefunden werden. Dies widerspricht dem bisherigen Erkenntnis, dass beide Isoformen zu gleichen Teilen in der Zelle vorkommen.

Während EhMGL1 eine zentrale Rolle in der Kontrolle der schwefelhaltigen Aminosäuren einnimmt, scheint EhMGL2 erst dann aktiv zu werden, wenn das Gleichgewicht im Trophozoiten von *E. histolytica* außer Kontrolle gerät. Dieses können beispielsweise steigende Konzentrationen von Methionin oder Cysteinovorläufern sein durch die gesteigerte Aufnahme von Bakterien oder Wirtszellen.

Eine hochregulierte Menge an EhMGL1 könnte durch seine Aktivität zu einer verbesserten Kontrolle intrazellulärer schwefelhaltiger Aminosäuren im Trophozoiten führen und so dessen Fitness verbessern.

Die Überexpression der EhMGL1 führt im nicht-pathogenen Klon B8^{np} zu keiner gesteigerten Abszessbildung.

Eine Korrelation der Transkriptmenge von EhMGL1 mit der Pathogenität kann daher ausgeschlossen werden.

4.3.2 Einfluss des leucinreichen Proteins EHI_073680 auf die Pathogenität

Mit einer 14-fach erhöhten Transkriptmenge im pathogenen Klon B2^p ist das leucinreiche Gen EHI_073680 am stärksten reguliert im Vergleich zwischen B2^p und B8^{np}.

Leucinreiche Proteine lassen sich in Superfamilien einteilen, wobei diese Einteilung seit Jahren erweitert und verfeinert wird. Diese Proteine sind in Protein-Protein Interaktionen involviert und haben ebenfalls einen Einfluss auf die Signaltransduktion. Mit einer durchschnittlichen Länge von 24 Aminosäuren ist die Entstehung der leucinreichen Motive bisher noch umstritten. Sie könnten durch einen Vorläufer entstanden sein, der dupliziert wurde und sich dann im Laufe der Evolution zu Superfamilien weiter entwickelte. Eine andere Theorie besagt, dass die Duplizierung in jeder Proteinfamilie einzeln erfolgte und ihre Ähnlichkeit darauf zurückzuführen ist, dass durch Struktureinschränkungen individuelle, aber ähnliche Sequenzen entstanden sind (Kobe und Deisenhofer, 1994).

Die Protein-Protein Interaktion durch leucinreiche Proteine, wie beispielsweise BspA, konnte erfolgreich für eine Vielzahl von Parasiten gezeigt werden.

Homologe zu BspA konnten auch in *E. histolytica* gefunden werden (Davis *et al.*, 2006). Über dessen Aufgabe im Lebenszyklus von *E. histolytica* ist jedoch bisher nichts bekannt. Bekannt ist, dass ein strukturell zu BspA ähnliches leucinreiches Oberflächenprotein von *Trichomonas vaginalis* die Kolonisierung durch Bindung an Fibrinogen ermöglicht (Sharma *et al.*, 1998; Hirt *et al.*, 2002).

Obwohl keine Transmembrandomäne für das durch EHI_073680 kodierte Protein gefunden werden konnte, ist eine Assoziation mit der Membran durch posttranslationale Modifikation nicht ausgeschlossen. Eine ähnliche Aufgabe des leucinreichen Proteins EHI_073680 in der Protein-Protein Interaktion, ähnlich dem BspA von *Trichomonas vaginalis*, könnte durchaus möglich sein.

Interessanterweise konnte für das Spektrum an leucinreichen Proteinen ebenfalls diverse Moleküle beschrieben werden, die cytosolisch lokalisiert sind und einen großen Einfluss auf den Zellzyklus haben.

Daher und Kollegen konnten 2007 ein leucinreiches Bindungsprotein im Cytosol von *Plasmodium falciparum* charakterisieren, das eine hohe Ähnlichkeit zu der Phosphatase Typ 1 hat und welches in der Hefe für die Zellteilung von Bedeutung ist (Ohkura und Yanagida, 1991; Daher *et al.*, 2007).

Eine mögliche, ähnliche Funktion des durch das Gen EHI_073680 kodierte leucinreiche Protein, ist besonders im Hinblick auf die Pathogenität interessant, da eine gesteigerte Teilungsrate durchaus mit einer gesteigerten Pathogenität assoziiert werden könnte.

Jedoch konnten wir in unseren Untersuchungen beim Vergleich des nicht-pathogenen Klons B8^{np} mit dem pathogenen Klon B2^p keine gesteigerte Teilungsrate beobachten (Meyer et al., 2016 eingereicht).

Ein Einfluss auf die Zellteilung kann daher ausgeschlossen werden.

Die Überexpression des leucinreichen Gens EHI_073680 führte im nicht-pathogenen Klon B8^{np} zu keiner gesteigerten Pathogenität.

4.3.3 Einfluss der Überexpression hypothetischer Proteine auf die Pathogenität

Im pathogenen Klon B2^p konnten 4 Gene im Vergleich zum nicht-pathogenen Klon B8^{np} als hochreguliert identifiziert werden, die für hypothetische Proteine kodieren. Für zwei dieser Gene gelang es, überexprimierende Transfektanten im nicht-pathogenen Klon B8^{np} zu generieren. Eine Überexpression für das Gen EHI_191730 war nicht möglich.

Obwohl die Klonierung des Gens EHI_062080 in die pNC nicht möglich war, konnte über eine Sequenzanalyse eine Membrandomäne, sowie eine ATP-Bindungsdomäne identifiziert werden, wie sie typisch ist für Mitglieder der ABC Transporter. Diese können durch Hydrolyse von ATP Komponenten der Membran verlagern. ABC-Transporter in *E. histolytica* konnten beispielsweise bereits für die Aufnahme von Eisen gezeigt werden (Hernandez-Cuevas *et al.*, 2014).

Eine eigentliche Aufgabe von EHI_062080 ist bisher nicht geklärt. Die Herstellung einer überexprimierenden Transfektante ist daher weiter von großem Interesse.

Abhyanker und Kollegen konnten für das hypothetische Protein EHI_144490 eine Sigma 54 ATPase Domäne zeigen, die in Bakterien mit der RNA Polymerase interagiert und zusätzlich eine SEPTIN Domäne besitzt (Abhyanker *et al.*, 2009).

Mitglieder der Septine wiederum haben einen Einfluss auf die Zellteilung und GTP Bindung in höheren Eukaryoten (Kinoshita, 2003). Ein Einfluss auf die ALA-Bildung durch Überexpression im nicht-pathogenen Klon B8^{np} konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Für das Gen EHI_127670, das für ein hypothetisches Protein kodiert, konnte bisher noch keine Aussage über dessen biologische Funktion gemacht werden.

Die Überexpression führt zu einer Änderung des Phänotyps im nicht-pathogenen Klon B8^{np}. Obwohl der Einfluss bisher nicht als signifikant gezeigt werden konnte, zeichnet sich jedoch eine deutliche Tendenz ab. Mit einem Signifikanzwert von 0,058 liegt dieser knapp an der Grenze. Durch weitere Tierexperimente soll der Einfluss daher bestätigt werden. Ähnlich verhält es sich mit der Überexpression von EHI_127670 im nicht-pathogenen Klon A1^{np}. In einer vorhergehenden Untersuchung zeigte sich dort ein ähnlicher Einfluss auf die Leberabszessbildung im Tiermodell (Dissertation Fehling, 2015). Auch hier liegt der Signifikanzwert knapp über 0,05 und soll durch weitere Tierexperimente als signifikant bestätigt werden.

Auch in einer zuvor angefertigten Dissertation mit einem Vergleich des nicht-pathogenen Klons A1^{np} und dem pathogenen Klon B2^p auf Transkriptomebene, konnte dieses Gen als differentiell hochreguliert im Klon B2^p gefunden werden (Dissertation Fehling, 2015). Auch hier konnte durch Überexpression im nicht-pathogenen Klon A1^{np} eine Änderung des Phänotyps gezeigt werden, der sich jedoch nicht als signifikant bestätigen ließ (Anhang, Abbildung 25).

Die Änderung des Phänotyps durch Überexpression in den nicht-pathogenen Klonen A1^{np} und B8^{np} deutet auf einen Einfluss, des durch das Gen EHI_127670 kodierte hypothetische Protein, hin.

Penuliar und Kollegen zeigten bei Analyse einer Trifluormethionin resistenten HM-1:IMSS *E. histolytica* Kultur im Vergleich zur HM-1:IMSS Stammkultur auf Transkriptomebene, dass die beiden EhMGL1/2 Gene in der Resistenten herunterreguliert und das hypothetische Gen EHI_127670 73 fach hochreguliert war (Penuliar *et al.*, 2009).

Vermutlich erfolgt eine Regulation von EHI_127670, in der Trifluormethionin resistenten Kultur von *E. histolytica*, ähnlich zu der Überexpression in den nicht-pathogenen Klonen A1^{np} und B8^{np}. Durch Analyse der überexprimierenden Transfektanten in den Klonen A1^{np} und B8^{np} soll der Einfluss zukünftig näher analysiert werden.

4.4 Vergleichende Transkriptomanalysen

Zur Kontrolle welchen Einfluss die Überexpression auf Transkriptionsebene in Trophozoiten von *E. histolytica* hat wurden diese mittels mRNA-Seq untersucht. Zur

Eingrenzung der Zahl an regulierten Genen wurde der *fold change* auf ≥ 3 und einem *p*-adj von $< 0,05$ gesetzt.

4.4.1 Transkriptomanalyse zwischen der EHI_088020-Transfektante und der pNC-(Kontrolle)-Transfektante

Für die Trophozoiten der Überexprimierer der ADH EHI_088020-Transfektante zeigten sich 5 Gene als differentiell exprimiert auf Transkriptionsebene im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante. Neben einer erhöhten Transkriptmenge der ADHs EHI_160670 und EHI_088020 waren lediglich die Gene EHI_062960, EHI_022490 und EHI_176590 als differentiell hochreguliert in der ADH EHI_088020-Transfektante zu finden.

Das Gen EHI_062960 kodiert für ein hypothetisches Protein, dessen biologische Funktion unbekannt ist. In Strukturvorhersagen lässt sich lediglich ein Signalpeptid und eine Transmembrandomäne identifizieren, was darauf schließen lassen, dass es sich um ein membranständiges Molekül handeln muss.

Die beiden Gene EHI_022490 und EHI_176590 gehören zur Familie der AIG's. Ihre Funktion und Bedeutung in Trophozoiten von *E. histolytica* wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

4.4.2 Transkriptomanalyse zwischen der EHI_088020Mut-Transfektante und der pNC-(Kontrolle)-Transfektante

Zusätzlich wurde das Transkriptom der EHI_088020Mut-Transfektante im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante im Trophozoiten untersucht. Neben beiden erwarteten ADHs EHI_088020 und EHI_160670 zeigten sich 3 Gene, die für hypothetische Proteine kodieren und das Gen EHI_112880, als differentiell hochreguliert in der EHI_088020-Transfektante. Die hier gefundenen 3 hypothetischen Gene (EHI_068620, EHI_163860 und EHI_163500) wurden bisher in keiner Untersuchung von *E. histolytica* charakterisiert.

Durch Einsatz eines Strukturanalyseprogramms konnte für das Gen EHI_068620 eine Transmembranhelix vorhergesagt werden, die darauf hindeutet, dass dieses Protein in der Membran lokalisiert ist.

Das Gen EHI_163860 kodiert für ein hypothetisches Protein, das eine Zinkfinger-Domäne besitzt. Proteine mit diesem Strukturelement wurden bereits gut untersucht

und eine Beteiligung an DNA-Bindung und Einfluss auf die Transkription spezifischer Zielgene nachgewiesen (Iuchi, 2001).

Für das Gen EHI_163500, mit einem 21 fachen Anstieg der Transkriptmenge, konnte keine Domäne vorhergesagt werden.

Das Protein EHI_112880 konnte ebenfalls als differentiell hochreguliert in der ADH EHI_088020-Transfektante gefunden werden und kodiert für das ribosomale Protein S13, dessen Bedeutung im Abschnitt 4.4.3 näher beschrieben wird.

Welche biologische Funktion die hypothetischen Proteine und das ribosomale Protein S13 jedoch genau haben oder der Grund für deren Regulation im Trophozoiten als Antwort auf die Überexpression der ADH EHI_088020Mut-Transfektante bleibt weiter fraglich.

4.4.3 Transkriptomanalyse zwischen zwei EHI_160670-Transfektanten (_2/_1) und der pNC-(Kontrolle)-Transfektante

Das differentiell in dem nicht-pathogenen Klon B8^{np} hochregulierte Gen EHI_160670 kodiert für eine Alkoholdehydrogenase. Ein signifikanter Einfluss auf die Reduktion der Abszessgröße durch Überexpression im pathogenen Klon B2^p konnte gezeigt werden. Der Einfluss der Überexpression sollte auf Transkriptomebene in zwei Klonen der EHI_160670-Transfektante im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante bestimmt werden.

Für die EHI_160670-Transfektante_2 konnten 4 Gene als differentiell hochreguliert gefunden werden.

Das Gen EHI_087210 kodiert für ein hypothetisches Protein, dessen biologische Funktion unbekannt ist. Durch Strukturvorhersage konnte jedoch ein Signalpeptid und eine Transmembranhelix vorhergesagt werden. Eine Lokalisation in der Membran ist daher wahrscheinlich.

Das Gen EHI_118220, mit einer 12 fach erhöhten Transkriptmenge in der ADH EHI_160670-Transfektante_2, kodiert für die vakuläre ATP-Synthase Untereinheit B. Die Hauptaufgabe dieses Komplexes besteht darin, ATP zu synthetisieren. Abhängig vom Organismus besteht sie aus 8-20 Untereinheiten (Hahn *et al.*, 2016). Warum nun genau diese Untereinheit differentiell exprimiert wird bleibt fraglich, da keine weitere Untereinheit als differentiell hochreguliert identifiziert wurde.

Das Gen EHI_114920 kodiert für die ribosomale Untereinheit L35a, die mit dem 60S Ribosom assoziiert ist. Die Untereinheit bindet an Initiator- und tRNA und hat so einen Einfluss auf die Elongation (Herzog *et al.*, 1990). Auch hier ist es verwunderlich, dass nur diese Untereinheit als differentiell exprimiert gefunden werden konnte.

Das Gen EHI_200090, mit einer Erhöhung der Transkriptmenge um das 3.3 fache in der ADH EHI_160670-Transfektante_2, kodiert für ein CXXC-reiches Protein. In *E. histolytica* konnten mehr als 100 Gene identifiziert werden, die für Proteine mit einem solchen Strukturmotiv kodieren. Die kleine Untereinheit Igl des Galaktose/*N*-Acetyl-D-Galaktosamin gehört ebenfalls zu den CXXC-reichen Proteinen und ist an der Adhäsion der Trophozoiten an die Wirtszellen beteiligt (Petri, 1996; Horstmann, 1992). Das Vorhandensein von CXXC-Motiven deutet daher auf eine Rolle in der Protein-Protein Interaktion hin.

Zusätzlich zur ADH EHI_160670-Transfektante_2, wurde die ADH EHI_160670-Transfektante_1 ebenfalls auf Transkriptomebene im Vergleich zur pNC-(Kontrolle)-Transfektante untersucht. Die beiden Transfektanten unterscheiden sich in der Transkriptmenge an ADH EHI_160670.

Die Auswertung der Transkriptomdaten der ADH EHI_160670-Transfektante_1, zeigte überraschenderweise 37 Gene als differentiell hochreguliert, besonders da zuvor in der ADH EHI_160670-Transfektante_2 nur 4 Gene differentiell hochreguliert gefunden wurden.

Die Analyse der 37 differentiell hochregulierten Gene zeigte 18, die für hypothetische Proteine kodieren. Obwohl ihre biologische Funktion unbekannt ist, wurde eine Domänenvorhersage durchgeführt um eventuelle Rückschlüsse auf ihre biologische Funktion ziehen zu können. Für die Gene EHI_166860, EHI_058530, EHI_120950 und EHI_125750 konnte keine Domäne identifiziert werden. Über ihre Bedeutung im Lebenszyklus der Trophozoiten kann daher keine Aussage getroffen werden.

Für die Gene EHI_092270, EHI_129370, EHI_079270, EHI_062960, EHI_096410, EHI_174220, EHI_048730 und EHI_011400 die für hypothetische Proteine kodieren, konnten eine oder mehrere Transmembrandomänen identifiziert werden.

Das Gen EHI_163860, welches für ein Protein mit einer Zinkfingerdomäne kodiert, konnte bereits zuvor in der ADH EHI_088020Mut-Transfektante als differentiell hochreguliert gefunden werden.

Das für ein hypothetisches Protein kodierende Gen EHI_015010 und das Gen EHI_186810 gehören, laut Strukturvorhersage, zur Superfamilie der *Major Facilitator* Proteine. Sie sind ubiquitär in allen Organismen zu finden und die größte Gruppe an Transportern. Sie regeln den Stofftransport, wobei man Symporter, Uniporter und Antiporter unterscheidet (Yan, 2015). Um welchen genauen Stofftransport es sich handelt und welche Bedeutung ihnen durch die Überexpression in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 zukommt bleibt jedoch unklar.

Das Gen EHI_005960 kodiert für ein hypothetisches Protein, das mehrere Transmembrandomänen besitzt. Es gehört laut Strukturvorhersage zu den Cysteinreichen Wachstumsfaktoren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind.

Das für ein hypothetisches Protein kodierende Gen EHI_004400 besitzt eine PhoX homologe Domäne. Diese Lipid-Bindungsdomäne kann Phosphoinositid binden. Darüberhinaus können sie auch an der Protein-Protein Interaktion beteiligt sein und beispielsweise Clathrin binden, welches ebenfalls als differentiell hochreguliert gefunden wurde (Teasdale und Collins, 2012).

Ein weiteres Gen (EHI_040820), das für ein hypothetisches Protein kodiert, konnte einer OST3/OST6 Transportfamilie zugeordnet werden. Sie sind membranständig und ein Komplex bestehend aus 8 ER Proteinen (Karaoglu *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass bei Beschädigung des Komplexes keine N-Glykosylierung mehr stattfinden kann (Knauer und Lehle, 1999).

Dem hypothetischen Protein, kodiert durch das Gen EHI_107050, konnte eine Starch Bindungsdomäne zugeordnet werden. Man findet diese Domänen in Enzymen die am Polysaccharid-Stoffwechsel beteiligt sind und in nicht katalytischen Proteinen wie Lektinen oder Zuckertransportproteinen. Es handelt sich dabei zumeist um Multidomänenproteine (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005).

Auffällig ist das vermehrte Auftreten von Transmembrandomänen in differentiell hochregulierten Genen in der ADH EHI_160670-Transfektante_1, die für hypothetische Proteine kodieren. Ein genauer Mechanismus kann durch die Überexpression und Strukturanalyse nicht gemacht werden.

Neben den hypothetischen Genen fanden sich ebenfalls 14 weitere Gene als differentiell hochreguliert in der ADH EHI_160670-Transfektante_1.

Das Gen EHI_020310 kodiert für das 40S ribosomale Protein S23. Es hat einen Einfluss auf die Korrektheit der Translation (Kitaoka *et al.*, 1994). Zusätzlich dazu fand sich das Gen EHI_114920, mit einer 19 fach erhöhten Transkriptionsrate. Dieses Gen kodiert für

das 60S ribosomale Protein L35a. Es bindet an Initiator und tRNA und nimmt so Einfluss auf die Elongation (Herzog *et al.*, 1990). Neben diesen beiden ribosomalen Proteinen zeigte sich ebenfalls das Gen EHI_112880 als differentiell hochreguliert und kodiert für das ribosomale Protein S13. Überraschenderweise bildet dieses Protein Brücken zur 23S und zu L35a Proteinen und koordiniert so die Synthese der Proteine im Ribosomen (Cukras *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass alle 3 Proteine differentiell hochreguliert aufgefunden wurden deutet darauf hin, dass die Proteinmaschinerie im Trophozoiten von *E. histolytica* durch die überexprimierende ADH EHI_160670-Transfektante_1, vermehrt genutzt wird.

Die beiden Gene EHI_200090 und EHI_159700 kodieren für Proteine mit CXXC-Motiven, die bereits für die ADH EHI_160670-Transfektante_2 beschrieben wurde und vermutlich für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sind.

Darüberhinaus zeigten sich eine Vielzahl von Genen als differentiell hochreguliert, die am intrazellulären Transport im Trophozoiten beteiligt sind. Das Gen EHI_158570 kodiert für Aktobindin, das bereits im Abschnitt 4.2.2 beschrieben wurde und Aktinmonomere bindet. Einhergehend damit zeigte sich ein zweites Gen als differentiell hochreguliert, das für das aktinbindende Protein Cofilin (EHI_186840) kodiert. Cofilin sorgt durch die Bindung von Aktin für die Reorganisation der Aktinfilamente (dos Remedios *et al.*, 2003).

Das Gen EHI_096210 kodiert für ein Protein, das Homologien zu Proteinen in anderen Organismen aufweist, die mit der Vesikelmembran assoziiert sind. Genaue Untersuchungen zu diesem Protein in *E. histolytica* fehlen jedoch komplett.

Daneben findet sich das Gen Coatamer EHI_169210 in der ADH EHI_160670-Transfektante_1 hochreguliert. Es kodiert für das Protein Coatamer und ist Teil der Membran von Transportvesikeln.

Die kleine Kette des Clathrin Adaptor Komplexes, die durch das Gen EHI_009940 codiert wird, ist Teil eines heterotetrameren Adaptor Komplexes und spielt eine Rolle beim intrazellulären Stofftransport in Vesikeln (Robinson, 2004).

Diese hochregulierten Gene geben einen eindeutigen Hinweis darauf, dass die Überexpression der ADH EHI_160670-Transfektante_1 den Vesikeltransport im Trophozoiten beeinflusst.

Das Gen EHI_010020 kodiert für das Protein Calmodulin und dient als Second Messenger. Es bindet Calcium und ist membranständig. Der genaue Signalweg, der

durch diesen Second Messenger aufgrund der Überexpression der ADH EHI_160670-Transfektante_1 differentiell reguliert wird, konnte leider nicht geklärt werden.

Das Gen EHI_022490 kodiert für ein Protein das zur Familie der AIG's gehört und wurde bereits bei der Transkriptomanalyse der ADH EHI_088020-Transfektante als differentiell hochreguliert identifiziert werden.

Die Rhomboidprotease S54 (EhROM3), wird durch das Gen EHI_029220 kodiert und ist eine von 4 Rhomboidproteasen, die im Genom von *E. histolytica* gefunden wurden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Phagozytose von *E. histolytica* (Rastew 2015). Die EhROM 1 ist in der Membran des Parasiten zu finden und spaltet Oberflächenlektine, zu denen auch das Gal/GalNac gehört. Es wird vermutet, dass so Oberflächenrezeptoren umhüllt werden und den Parasiten vor dem Immunsystem des Wirtes schützen (Baxt *et al.*, 2010). Inwiefern eine solche Bedeutung auch der EhROM3 zukommt ist jedoch ungewiss, da diese bisher nicht näher in Trophozoiten von *E. histolytica* charakterisiert wurde.

Erstaunlicherweise zeigte sich ebenfalls der Vorläufer des Amoebapore B, das durch das Gen EHI_194540 kodiert wird, mit einer 3 fach erhöhten Transkriptionsrate in der ADH EHI_160670-Transfektante_1. Amoebapore sorgen nach Adhäsion an die intestinale Mucosa für einen kontaktabhängigen, zytotoxischen Effekt auf die Wirtszellen (Gadasi und Kessler, 1983).

Das Gen EHI_119490 kodiert für die TatD Hydrolase, die in anderen Organismen wie *E. coli* cytoplasmatisch lokalisiert ist und eine DNase Aktivität besitzt (Wexler *et al.*, 2000). Für die DNase I konnte eine aktinbindende Aktivität gezeigt werden, die durch Bindung zur Inaktivierung führt und so Einfluss auf das Cytoskelett nehmen kann (dos Remedios *et al.*, 2003). Ob die TatD Hydrolase in *E. histolytica* jedoch die gleiche Funktion wie die DNase I übernimmt ist nicht geklärt.

Das letzte hochregulierte gefundene Gen EHI_042900 kodiert für das Protein Thioredoxin. Es bildet zusammen mit der Thioredoxin Reduktase ein Redoxpaar (Arias *et al.*, 2007). Beide sorgen für eine Detoxifizierung in der Zelle, hervorgerufen durch oxidativen Stress. Verwunderlich ist es jedoch, dass die Thioredoxin Reduktase nicht auch als hochreguliert gefunden wurde, da sie gemeinsam mit Thioredoxin ein Redoxpaar bildet. Der genaue Grund für die Regulation ist daher weiterhin fraglich.

In den beiden Überexpressionstransfektanten der ADH EHI_16060 konnten die Gene EHI_114920 und EHI_200090 übereinstimmend differentiell hochreguliert gefunden werden.

Die Zahl an unterschiedlich hochregulierten Genen im Transkriptom der ADH EHI_160670-Transfektante_1 und ADH EHI_160670-Transfektante_2 ist verwunderlich. Der Effekt könnte auf die unterschiedliche Transkriptmenge an ADH EHI_160670 in beiden Transfektanten zurückzuführen sein. Während bei ADH EHI_160670-Transfektante_2 mittels qPCR eine 133.75 fache Überexpression gezeigt werden konnte, ließ sich für die EHI_160670-Transfektante_1 lediglich eine 62.75 fache Überexpression der ADH EHI_160670 zeigen.

4.5 Sequenzanalyse von EHI_160670 und EHI_088020

Erfreulicherweise konnte für die beiden Gene der Alkoholdehydrogenasen EHI_160670 und EHI_088020 eine Reduktion der Abszessgröße durch Überexpression im pathogenen Klon B2^p gezeigt werden. Zur genaueren Charakterisierung wurden beide ADHs miteinander verglichen, wodurch sich herausstellte, dass sie Sequenzen beider Gene identisch ist. Während die ADH EHI_088020 eine Länge von 1149 bp aufweist, besitzt die ADH EHI_160670 lediglich 669 bp. Weiterhin lokalisieren beide ADH-Gene in verschiedenen Bereichen des Genoms von *E. histolytica*. Überraschenderweise zeigten sich die 33 vorgelagerten Basenpaare als identisch zur Sequenz der ADH EHI_088020 was darauf schließen ließ, dass es sich bei einem der beiden ADHs um ein Genduplikat handeln muss. Durch Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass der nichtkodierende Bereich vor dem Gen der ADH EHI_160670 homolog zur vollen Sequenz der ADH EHI_088020 ist. Sie unterscheiden sich lediglich in einem Basenaustausch an Position 657 der ADH EHI_160670, die zu einer stillen Mutation führt und in einem Basenaustausch in der Sequenz der ADH EHI_088020, die zu einem verfrühten Stopp führt an Position 495. Schlussfolgernd aus diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser ADH nicht um ein *single copy gene* handelt, sondern um ein Gen mit mindestens zwei Kopien im Genom von *E. histolytica* von dem eines der Gene aufgrund einer Punktmutation mit großer Wahrscheinlichkeit für kein aktives Protein kodiert.

4.6 Identifizierung homologer ADHs zur ADH EHI_088020 im Genom von *E. histolytica*

Zur weiteren Charakterisierung der ADH EHI_088020 wurde über eine Sequenzanalyse nach homologen ADHs im Genom von *E. histolytica* gesucht. Dabei fanden sich 3

homologe ADHs. Für die ADH EHI_192470 konnte eine 79 %ige Übereinstimmung, für die ADH EHI_193530 eine 70 %ige und für die ADH EHI_125950 eine 59 %ige Übereinstimmung mit der ADH EHI_088020 nachgewiesen werden (Abbildung 9). Im *Alignment* zeigte sich aufgrund der für die Metallbindung und Cofaktorbindung hoch konservierten Aminosäuren deutlich, dass die vier ADHs zur metallabhängigen Gruppe III der Alkoholdehydrogenasen gehören.

4.7 Einfluss der Überexpression der ADHs EHI_192470, EHI_193530 und EHI_125950 auf die Pathogenität

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem Einfluss der ADH EHI_088020 auf die Pathogenität im pathogenen Klon B2^p um einen spezifischen Effekt handelt, sollten die Gene der ADHs EHI_192470, EHI_193530 und EHI_125950 ebenfalls im Klon B2^p überexprimiert und ihr Einfluss auf die Pathogenität untersucht werden. Während ein Einfluss auf die Pathogenität für die Überexpression des Gens der ADH EHI_088020 im Klon B2^p bereits zuvor gezeigt werden konnte, lässt sich diese für die ADHs EHI_192470 und EHI_193530, trotz hoher Sequenzübereinstimmung, nicht feststellen. Seltsamerweise jedoch zeigt sich für die ADH EHI_125950, mit der geringsten Sequenzübereinstimmung zur ADH EHI_088020, eine signifikante Verkleinerung der Abszessgröße im Tiermodell.

Die einzige Übereinstimmung zwischen diesen beiden ADHs fanden Biller und Kollegen 2010 in einer Untersuchung der membranassoziierten Proteine von *E. histolytica* Trophozoiten (Biller *et al.*, 2010). Beide ADHs konnten mit der Membran assoziiert gefunden werden.

4.8 Analyse der Alkoholdehydrogenase EHI_088020

4.8.1 Expression und Reinigung rekombinanter ADH EHI_088020

Von entscheidender Bedeutung für die Arbeit mit rekombinanten Proteinen ist deren bestmögliche Expression und Reinigung. Mit Hilfe von verschiedenen Strategien und individueller Eigenschaften der Proteine lassen sich diese beiden Faktoren beeinflussen. Nachdem die Klonierung in einen Expressionsvektor mit His-tag Sequenz zu keinen positiven Klonen führte, konnte die ADH EHI_088020 von *E. histolytica* erfolgreich in

einen Expressionsvektor kloniert werden, der für einen zusätzlichen GST-*tag* C-terminal kodiert.

Überraschenderweise zeigt eine Expression bei 17 °C über Nacht eine deutlich verbesserte Ausbeute an rekombinant exprimierter ADH. Eine erste Affinitätsreinigung konnte bereits zu einem zufriedenstellenden Reinigungsgrad führen. Für das weitere Abtrennen unerwünschter Proteine wurden deren unterschiedlichen hydrodynamischen Radien in einer Größenausschlusschromatographie genutzt. Diese schnelle und kostengünstige Methode zeigt jedoch eine Limitierung, da die Größenunterschiede der Proteine jeweils mindestens doppelt so groß sein muss wie die des gesuchten Proteins.

In der Größenausschlusschromatographie zeigte sich, dass die ADH EHI_088020 als Homodimer vorliegt. Dieses Resultat entspricht vielen Untersuchungen, die bereits zuvor an Alkoholdehydrogenasen durchgeführt wurden und diese zumeist als einen dimeren Komplex identifizieren konnten (Elleuche *et al.*, 2014).

Da für eine Kristallisation das Protein möglichst rein vorliegen muss, wurde nach der Größenausschlusschromatographie eine Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Dabei macht man sich die Eigenschaft der unterschiedlichen Proteine zu nutze, eine jeweils spezifische Außenladung zu haben. Leider zeigte es sich jedoch, dass diese Methode zu Abtrennung der Verunreinigungen, aufgrund des pI von 6,79 für die ADH EHI_088020 zu nahe am Isoelektrischen Punkt liegt und daher nicht geeignet ist. Obwohl keine komplette Abtrennung der störenden Proteine erfolgte, war die Reinheit und Menge des gereinigten rekombinanten Proteins ausreichend, um dieses zum Generieren von Antikörpern und Proteinkristallen für die Strukturaufklärung zu nutzen.

4.8.2 Lokalisation der ADH EHI_088020 in Trophozoiten von *E. histolytica*

Die genaue Rolle der ADH EHI_088020 im Stoffwechsel von *E. histolytica* ist bisher unklar. Für ein genaues Verständnis ist die Lokalisation von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit konnten erfolgreich polyklonale Antikörper generiert und eine Lokalisation in Trophozoiten durchgeführt werden.

Davis und Kollegen konnten 2009 die ADH EHI_198760, die eine 70 % ige Identität zu der in dieser Arbeit untersuchten ADH EHI_088020 aufweist, als membranständig im Trophozoiten nachweisen (Davis *et al.*, 2009). Eine Überexpression der von Davis untersuchten Alkoholdehydrogenase zeigte keinen Einfluss auf die Abszessgröße (Davis

et al., 2009). Dieses Ergebnis stimmt mit unseren Versuchen überein in denen wir zeigen konnten, dass eine Überexpression der ADH EHI_198760 keinen Einfluss auf die Abszessgröße im Klon B2^p hat (Meyer *et al.*, 2016 eingereicht)

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der ADH EHI_088020 um ein im Cytosol der Trophozoiten lokalisiertes Molekül handeln muss. Die Trophozoiten der einzelnen Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} zeigen dabei keinen Unterschied in der Lokalisation, genau wie die überexprimierenden Transfektanten.

Obwohl die von Davis untersuchte ADH EHI_198760 keine Struktur aufweist, die eine Lokalisation an der Membran erklären könnte, gelang es Biller und Matthiesen 2013 in einer Untersuchung des Membranproteoms 514 Moleküle zu identifizieren, die keine Sekretionssignal oder Membranbindungsdomäne zeigten (Biller *et al.*, 2013).

Sie vermuteten, dass ein Großteil der Proteine durch Verschmelzung mit intrazellulären Membransystemen an die Oberfläche der Trophozoiten verlagert werden. Es handelt sich demzufolge bei der Plasmamembran nicht um ein statisches Kompartiment, sondern vielmehr um das Mitglied einer Maschinerie, die mit anderen intrazellulären Membransystemen im konstanten Austausch steht. Eventuell ist die Lokalisation der ADHs EHI_125950 und EHI_088020 zu diesem Zeitpunkt auf ein ähnliches Phänomen zurück zu führen.

Es bleibt zu sagen, dass Kreuzreaktionen mit den als strukturell ähnlich vorkommenden ADHs nicht ausgeschlossen werden können. Eine Lokalisation, die lediglich auf die ADH EHI_088020 im Trophozoiten zurückzuführen ist, muss daher ausgeschlossen werden. Die durch Davis beobachtete Lokalisation an der Oberfläche von *E. histolytica* HM-1:IMSS jedoch ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen.

Die einzige Abweichung zeigten die Trophozoiten der EHI_088020Mut-Transfektante. In der ohne Saponin behandelten Probe zeigten 10 % der Trophozoiten eine Lokalisation auf der Oberfläche, wobei dieses Phänomen nicht entgeltig geklärt werden kann.

4.8.3 Identifizierung möglicher Bindungspartner der ADH EHI_088202

Eine Vielzahl von Proteinen benötigt für dessen Aktivität einen Bindungspartner. Um einen solchen auch für die ADH EHI_088020 von *E. histolytica* zu identifizieren, wurde ein *Thermal Shift Assay* durchgeführt. Dieser zeigte erstaunlicherweise einen Einfluss sowohl von Zink, als auch von Nickel. Daher wurde zusätzlich eine

konzentrationsabhängige Untersuchung beider Metallionen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich der Effekt von Zink nicht bestätigen ließ. Nickel hingegen erwies sich als möglicher Bindungspartner, dessen Konzentrationsoptimum in einem Bereich von 0,2 – 1 mM Nickel liegt.

Bereits zuvor konnten eine NAD⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Oenococcus Oeni* gezeigt werden, die ebenfalls Nickel bindet und dessen Aktivität steigert (Elleuche *et al.*, 2012; Elleuche *et al.*, 2013). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse können nun Kristallansätze und Aktivitätstest mit dem rekombinant exprimierten Protein unter Zugabe von Nickel adaptiert werden.

4.8.4 Kristallisation der ADH EHI_088020

Die Röntgenstrukturanalyse stellt eine Methode dar, die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu lösen. Die Voraussetzung dafür sind jedoch Proteinkristalle, deren Qualität von entscheidender Bedeutung für diesen Versuch ist.

Für die ADH EHI_088020 aus *E. histolytica* konnten geeignete Pufferbedingungen gefunden werden, in denen ein Kristallwachstum ermöglicht werden konnte. Durch Verfeinerung dieser Bedingungen gelang es Kristalle zu generieren, deren Größe und augenscheinliche Form qualitativ gut genug waren um die Struktur dieses potentiellen Pathogenitätsfaktors von *E. histolytica* zu entschlüsseln. Die von Dr. Sophia Reindl an der DESY, Beam Line B13, PETRA III Anlage in Hamburg durchgeführte Vermessung der Kristalle zeigte jedoch, dass es sich zwar um Proteinkristalle handelt, deren Packung jedoch nicht gut genug war, um eine Auflösung zu erzielen, die zum Lösen der Struktur ausreicht.

Schaut man sich parallel andere gelöste Strukturen von *E. histolytica* an, wie beispielsweise die Methionin γ -Lyase 2 mit 2,2 Å oder die Methionin γ -Lyase 1 mit 2,8 Å, wird schnell klar, dass die Auflösung mindestens 3 Å haben sollte (Sato *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2008). Die für die ADH EHI_088020 erzielte Auflösung von 4,5 Å ist nicht ausreichend, lässt sich aber durch Anpassung der Kristallisationsfaktoren weiter verbessern und so in der nahen Zukunft zum Lösen der dreidimensionalen Struktur führen.

Zusammenfassung

Das parasitische Protozoon *Entamoeba histolytica* ist der Verursacher der Amöbiasis. Mit 50 Millionen Infektionen jährlich ist es die drittwichtigste humanpathogene protozoische Erkrankung weltweit. Eine Infektion verläuft bei 90 % der Erkrankten symptomfrei, während sich bei 10 % der Infizierten eine invasive, intestinale Verlaufsform zeigt. Sie wird von Symptomen wie Bauchschmerzen, Kolitis, blutigen Durchfällen und Fieber begleitet. Die aggressivste Verlaufsform stellt die invasive, extraintestinale Amöbiasis dar, bei der sich Abszesse in Organen wie der Lunge, dem Gehirn und bevorzugt in der Leber manifestieren.

Bisher konnte nur eine geringe Zahl an Molekülen identifiziert werden, die als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* in Frage kommen. Dabei handelt es sich um das Gal/GalNac Adhärenzlektin, die porenbildenden Amoebapores und Cysteinpeptidasen. Da sich die Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* jedoch nicht nur auf diese Moleküle eingrenzen lassen, scheint ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren für die Pathogenität verantwortlich zu sein. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren durch Überexpression differentiell exprimierter Gene in pathogenen und nicht-pathogenen *E. histolytica* Klonen.

Zur Analyse neuer Pathogenitätsfaktoren wurde für diese Arbeit die aus dem HM-1:IMSS Isolat generierte sog. Zelllinie B verwendet. Die aus Zelllinie B erzeugten Klone (B1-B12) zeigen eine große Diversität ihrer Pathogenitätseigenschaften, die von nicht-pathogen (Klon B8^{np}) bis hin zu pathogen (Klon B2^p) reichen. In dieser Arbeit erfolgte ein direkter Vergleich des nicht-pathogenen Klons B8^{np} mit dem pathogenen Klon B2^p auf Transkriptomenebene zur Identifizierung potentieller Pathogenitätsfaktoren. Die Analyse der Pathogenität erfolgte im Mausmodell nach intrahepatischer Injektion der Trophozoiten.

Die vergleichende Transkriptomstudie zwischen den Klonen B2^p und B8^{np} erfolgte mit Hilfe der mRNA Sequenzierung. Dabei konnten 12 Gene identifiziert werden, die im nicht-pathogenen Klon B2^p stärker transkribiert wurden. 6 dieser Gene kodieren für hypothetische Proteine, zwei der Genen für Alkoholdehydrogenasen und jeweils ein Gen für Aktobindin, die Galaktose inhibierende 35 kDa Lektin Untereinheit, ein AIG1

Molekül, sowie eine Phosphoserinaminotransferase. 7 Gene konnten wiederum als stärker transkribiert im nicht-pathogenen Klon B8^{np} gefunden werden, wobei 5 dieser Gene für hypothetische Proteine und zwei Gene für Methioningammalyasen kodieren.

Durch Überexpression der 19 differentiell regulierten Gene, in dem jeweiligen Klon mit der geringeren Transkriptionsrate, konnte ein Einfluss auf die Leberabszessbildung der beiden Alkoholdehydrogenasen EHI_088020 und EHI_160670, sowie der Gene EHI_058920 und EHI_127670, die für hypothetische Proteine kodieren, im Tiermodell gezeigt werden.

Mit Hilfe der mRNA Sequenzierung wurde der Einfluss der Überexpression der *adh* Gene auf Transkriptomebene analysiert. Für die ADH EHI_088020-Transfektante konnten 3 Gene als differentiell höher exprimiert identifiziert werden, die für ein hypothetisches Protein und zwei AIG Moleküle kodieren. Zusätzlich erfolgte die Analyse der ADH EHI_160670-Transfektante. Den höchsten Anstieg in der Transkriptmenge zeigten Gene, die für hypothetische Proteine, CXXC-reiche Proteine und das 60S ribosomale Protein L35a kodieren.

Eine weitere Charakterisierung der ADH EHI_088020 konnte diese zur Klasse III der Alkoholdehydrogenasen zuordnen und eine Lokalisation im Cytosol der Trophozoiten erfolgreich zeigen. Im *Thermal Shift Assay* wurde Nickel als potentieller Bindungspartner identifiziert. Außerdem konnten Proteinkristalle generiert werden, mit denen bei Vermessung eine Auflösung bis 4.5 Å erreicht werden konnte.

Somit konnte in dieser Arbeit die ADH EHI_088020 aus *E. histolytica* als ein Molekül identifiziert und charakterisiert werden, dass einen Einfluss auf die Amöbenleberabszess-Bildung hat.

5. Literaturverzeichnis

Abhyankar MM, Hochreiter AE, Connell SK, Gilchrist CA, Mann BJ, Petri WA Jr. (2009) Development of the Gateway system for cloning and expressing genes in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int* **58**(1):95-7

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.

Aley SB, Scott WA, Cohn ZA. (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **152**(2):391-404

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.

Alsmark UC, Sicheritz-Ponten T, Foster PG, Hirt RP, Embley TM. (2009) Horizontal gene transfer in eukaryotic parasites: a case study of *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Methods Mol Biol* **532**: 489–500.

Anderson IJ, Loftus BJ. (2005) *Entamoeba histolytica*: observations on metabolism based on the genome sequence. *Exp Parasitol* **110**(3):173-7

Andrä J, Berninghausen O, Leippe M. (2004) Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett* **564**(1-2):109-15

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.

Arias DG, Gutierrez CE, Iglesias AA, Guerrero SA. (2007) Thioredoxin-linked metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Free Radic Biol Med* **42**(10):1496-505

Bakatselou C, Kidgell C, Graham Clark. (2000) A mitochondrial-type hsp70 gene of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **110**: 177–82.

Baxt LA, Rastew E, Bracha R, Mirelman D, Singh U. (2010) Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis. *Eukaryot Cell* **9**(8):1283-93

Biller, L., Schmidt, H., Krause, E., Gelhaus, C., Matthiesen, J., Handal, G., Lotter, H., Janssen, 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
- Biller** L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schumann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I. (2013) The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics* **13**(1):132-44
- Bosch** DE, Kimple AJ, Manning AJ, Muller RE, Willard FS, Machius M, Rogers SL, Siderovski DP. (2013) Structural determinants of RGS-RhoGEF signaling critical to *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Structure* **21**(1):65-75
- Bubb** MR, Baines IC, Korn ED. (1998) Localization of actobindin, profilin I, profilin II, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Motil Cytoskeleton* **39**(2):134-46
- Brandt** H, Tamayo RP. (1970) Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol* **1**(3):351-85
- Bailey** GB, Shen PS, Beanan MJ, McCoomer NE. (1992) Actin associated proteins of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* **23**(2):129-32
- Blessmann**, J., Van, L.P., Nu, P.A.T., Thi, H.D., Mller-Myhsok, B., Buss, H., Tannich, E. (2002): Epidemiology of Amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in Central Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* **66**(5): 578-583.
- 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.
- Brumpt**, ME. (1925) Étude sommaire de l' "*Entamoeba dispar*" n. sp. Amibe a kystes quadrinuclées, parasite de l'homme. *Bull Acad Med (Paris)* **94**: 943-952
- Burchard**, G.D., Tannich, E. (2004) Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis. *Deutsches Ärzteblatt* Jg. 101 Heft 45.
- Caballero-Salcedo** A , Viveros-Rogel M , Salvatierra B , Tapia-Conyer R , Sepulveda-Amor J , Gutierrez G , Ortiz-Ortiz L (1994) Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* **50**(4):412-419
- Chan** KW, Slotboom DJ, Cox S, Embley TM, Fabre O, van der Giezen M, Harding M, Horner DS, Kunji ER, Leon-Avila G, Tovar J. (2005) A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Curr Biol* **15**: 737-42.
- Clark** CG, Kaffashian F, Tawari B, Windsor JJ, Twigg-Flesner A, Davies-Morel MC, Blessmann J, Ebert F, Peschel B, Le Van A, Jackson CJ, Macfarlane L, Tannich E. (2006) New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 9):2235-9
- Clark**, C. G., U. C. Alsmark *et al.* (2007). Structure and content of the *Entamoeba*

histolytica genome. *Adv Parasitol* **65**: 51-190.

Cukras AR, Southworth DR, Brunelle JL, Culver GM, Green R. (2003) Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex. *Mol Cell* **12**(2):321-8

Daher W, Pierce R, Khalife J. (2007) Census, molecular characterization and developmental expression of Leucine-Rich-Repeat proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **155**(2):161-6

Das S, Stevens T, Castillo C, Villasenor A, Arredondo H, Reddy K (2002). Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol* **32**: 655-75.

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 peroxyredoxin as an important component of amoebic virulence. *Mol Microbiol* **61**: 1523-1532.

Davis PH, Zhang Z, Chen M, Zhang X, Chakraborty S, Stanley SL Jr. (2006) Identification of a family of BspA like surface proteins of *Entamoeba histolytica* with novel leucine rich repeats. *Mol Biochem Parasitol* **145**(1):111-6

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 cysteineproteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol Biochem Parasitol*. **151**: 118-128.

Davis PH, Chen M, Zhang X, Clark CG, Townsend RR, Stanley SL Jr. (2009) Proteomic comparison of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and the role of *E. histolytica* alcohol dehydrogenase 3 in virulence. *PLoS Negl Trop Dis* **3**(4):e415

Deng Y, Wang Z, Gu S, Ji C, Ying K, Xie Y, Mao Y. (2002) Cloning and characterization of a novel human alcohol dehydrogenase gene (ADHFe1). *DNA Seq* **13**(5):301-6.

Diamond, L.S., Harlow, D.R., 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.

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

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**(2):433-73

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

Elleuche S, Klippel B, von der Heyde A, Antranikian G. (2013) Comparative analysis of two members of the metal ion-containing group III-alcohol dehydrogenases from *Dickeya zeae*. *Biotechnol Lett* **35**(5):725-33

- Elleuche S**, Fodor K, Klippel B, von der Heyde A, Wilmanns M, Antranikian G. (2013) Structural and biochemical characterisation of a NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase from *Oenococcus oeni* as a new model molecule for industrial biotechnology applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(20):8963-75
- Elleuche S**, Fodor K, von der Heyde A, Klippel B, Wilmanns M, Antranikian G. (2014) Group III alcohol dehydrogenase from *Pectobacterium atrosepticum*: insights into enzymatic activity and organization of the metal ion-containing region. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**(9):4041-51
- Fehling H**. (2015) Dissertation: Analyse der Unterschiede pathogener und apathogener *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) Klone in der Parasit-Wirt Interaktion.
- Field J**, Rosenthal B, Samuelson J. (2000) Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **38**: 446–55.
- Friedmann SL** (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *H Biol Chem* **275**:2247-2250
- Gadasi, H.** and E. Kessler (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **39**: 528-531.
- Gilchrist CA**, Houpt E, Trapaidze N, Fei Z, Crasta O, Asgharpour A, Evans C, Martino-Catt S, Baba DJ, Stroup S, Hamano S, Ehrenkauf G, Okada M, Singh U, Nozaki T, Mann BJ, Petri WA Jr. (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol* **147**: 163–76.
- Gilchrist A**. (2007). Modulating G-protein-coupled receptors: from traditional pharmacology to allosterics. *Trends Pharmacol Sci* **28**(8):431-7
- Gosh SK**, Field J, Frisardi M, Rosenthal B, Mai Z, Rogers R, Samuelson J. (1999) Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* **67**: 3073–81.
- Guillén N**. (1996) Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends Microbiol* **4**(5):191-7
- Hahn A**, Parey K, Bublitz M, Mills DJ, Zickermann V, Vonck J, Kühlbrandt W, Meier T. (2016) Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol Cell* **61**:2765(16)30223-4
- He C**, Nora GP, Schneider EL, Kerr ID, Hansell E, Hirata K, Gonzalez D, Sajid M, Boyd SE, Hruz P, Cobo ER, Le C, Liu WT, Eckmann L, Dorrestein PC, Houpt ER, Brinen LS, Craik CS, Roush WR, McKerrow J, Reed SL. (2010) A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *J Biol Chem* **285**(24):18516-27
- Helk E**, Bernin H, Ernst T, Ittrich H, Jacobs T, Heeren J, Tacke F, Tannich E, Lotter H. (2013) TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during

Entamoeba histolytica infection. *PLoS Pathog* **9**(1):e1003096

Hernández-Cuevas NA, Weber C, Hon CC, Guillen N. (2014) Gene expression profiling in *Entamoeba histolytica* identifies key components in iron uptake and metabolism. *PLoS One* **9**(9):e107102

Hertzog M, Yarmola EG, Didry D, Bubb MR, Carlier MF. (2002) Control of actin dynamics by proteins made of beta-thymosin repeats: the actobindin family. *J Biol Chem* **277**(17):14786-92

Herzog H, Höfferer L, Schneider R, Schweiger M. (1990) cDNA encoding the human homologue of rat ribosomal protein L35a. *Nucleic Acids Res* **18**(15):4600

Hester G, Stark W, Moser M, Kallen J, Marković-Housley Z, Jansonius JN. (1999) Crystal structure of phosphoserine aminotransferase from *Escherichia coli* at 2.3 Å resolution: comparison of the unligated enzyme and a complex with alpha-methyl-l-glutamate. *J Mol Biol* **286**(3):829-50

Hirt RP, Harriman N, Kajava AV, Embley TM. (2002) A novel potential surface protein in *Trichomonas vaginalis* contains a leucine-rich repeat shared by micro-organisms from all three domains of life. *Mol Biochem Parasitol* **125**(1-2):195-9

Höög JO. (1995) Cloning and characterization of a novel rat alcohol dehydrogenase of class II type. *FEBS Lett* (3):445-8

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

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

Iuchi S. (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**(4):625-35

Karaoglu D, Kelleher DJ, Gilmore R. (1995) Functional characterization of Ost3p. Loss of the 34-kD subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase results in biased underglycosylation of acceptor substrates. *J Cell Biol* **130**(3):567-77

Kedishvili NY, Gough WH, Chernoff EA, Hurley TD, Stone CL, Bowman KD, Popov KM, Bosron WF, Li TK. (1997) cDNA sequence and catalytic properties of a chick embryo alcohol dehydrogenase that oxidizes retinol and 3beta,5alpha-hydroxysteroids. *J Biol Chem* 1997 **272**(11):7494-500

Kimura A1, Hara Y, Kimoto T, Okuno Y, Minekawa Y, Nakabayashi T. (1996) Cloning and expression of a putative alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica* and its application to immunological examination. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**(3):270-4

Kinoshita M. (2003) Assembly of mammalian septins. *J Biochem* **134**(4):491-6

Kitaoka Y, Olvera J, Wool IG. (1994) The primary structure of rat ribosomal protein S23. *Biochem Biophys Res Commun* **202**(1):314-20

- Knauer R, Lehle L.** (1999) The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem* **274**(24):17249-56
- 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.
- Kobe B, Deisenhofer J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**(10):415-21
- Kumar S, Aslam S, Mazumder M, Dahiya P, Murmu A, Manjasetty BA, Zaidi R, Bhattacharya A, Gourinath S.** (2014) Crystal structure of calcium binding protein-5 from *Entamoeba histolytica* and its involvement in initiation of phagocytosis of human erythrocytes. *PLoS Pathog* **10**(12):e1004532
- Lambooy PK, Korn ED.** (1986) Purification and characterization of actobindin, a new actin monomer-binding protein from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* **261**(36):17150-5
- Lambooy PK, Korn ED.** (1988) Inhibition of an early stage of actin polymerization by actobindin. *J Biol Chem* **263**(26):12836-43
- Leippe, M., Muller-Eberhard, H.J.** (1994) The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* **87**: 5-18.
- Leippe M** (1997). Amoebapores. *Parasitology Today* **13**: 178–183.
- 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**, e7116.
- Lotter H, Jacobs T, Gaworski I, Tannich E.** (2006) Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* **74**(1):118-24
- Lotter H, González-Roldán N, Lindner B, Winau F, Isibasi A, Moreno-Lafont M, Ulmer AJ, Holst O, Tannich E, Jacobs T.** (2009) Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS Pathog* **5**(5):e1000434
- MacFarlane, R.C., 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, Samuelson J.** (1999) Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biol* **19**: 2198–205.

- Makioka A**, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. (2002) Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res* **88**: 454–9.
- Maralikova B**, Ali V, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, van der Giezen M, Henze K, Tovar J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell Microbiol* **12**: 331-42.
- Marshall MM**, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. (1997) Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**(1):67-85
- Martinez-Higuera A**, Salas-Casas A, Calixto-Gálvez M, Chávez-Munguía B, Pérez-Ishiwara DG, Ximénez C, Rodríguez MA. (2013) Identification of calcium-transporting ATPases of *Entamoeba histolytica* and cellular localization of the putative SERCA. *Exp Parasitol* **135**(1):79-86
- Matthiesen, J.** (2012) Dissertation: Charakterisierung des pathogenen Phänotyps von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903).
- Matthiesen, J.**, Bär, A.-K., Bartels, A.-K., Marien, D., Ofori, S., Biller, L., Tannich, E., Lotter, H., Bruchhaus, I. (2013) Overexpression of Specific Cysteine Peptidases Confers Pathogenicity to a Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* Clone. *mBio* **4**(2): e00072-13.
- Mazzuco A**, Benchimol M, De Souza W. (1997) Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron* **28**: 241–7.
- Mehta PK**, Hale TI, Christen P. (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* **214**(2):549-61
- Moreno A**, Parés X. (1991) Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J Biol Chem* **266**(2):1128-33
- Müller M.** (1983) Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* **93**: 165–71
- Nixon JE**, Wang A, Field J, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, Samuelson J. (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **1**(2):181-90
- Nozaki T**, Asai T, Sanchez LB, Kobayashi S, Nakazawa M, Takeuchi T. (1999) Characterization of the gene encoding serine acetyltransferase, a regulated enzyme of cysteine biosynthesis from the protist parasites *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Regulation and possible function of the cysteine biosynthetic pathway in *Entamoeba*. *J Biol Chem* **274**(45):32445-52
- Ohkura H**, Yanagida M. (1991) *S. pombe* gene *sds22+* essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1. *Cell* **64**(1):149-57

- Penuliar** GM, Furukawa A, Nakada-Tsukui K, Husain A, Sato D, Nozaki T. (2014) Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *J Antimicrob Chemother* **67**(2):375-86
- Petri** WA Jr, Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF, Ravdin JL. (1987) Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* **80**(5):1238-44
- Petri**, W., Jr. (1996) Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *J Investig Med* **44**: 24-36.
- Petri** WA Jr, Haque R, Mann BJ. (2002) The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* **56**:39-64
- Pritt** BS, Clark CG. (2008) Amebiasis. *Mayo Clin Proc* **83**(10):1154-9
- Rastew** E, Morf L, Singh U. (2015) *Entamoeba histolytica* rhomboid protease 1 has a role in migration and motility as validated by two independent genetic approaches. *Exp Parasitol* **154**:33-42
- Reid** MF, Fewson CA. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* **20**(1):13-56.
- Reuber** TL, Ausubel FM. (1996) Isolation of Arabidopsis genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. *Plant Cell* **8**(2):241-9
- 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.
- Robinson** MS. (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**(4):167-74
- Rodríguez-Sanoja** R, Oviedo N, Sánchez S. (2005) Microbial starch-binding domain. *Curr Opin Microbiol* **8**(3):260-7
- Sánchez** L, Horner D, Moore D, Henze K, Embley T, Müller M. (2002) Fructose-1,6-bisphosphate aldolases in amitochondriate protists constitute a single protein subfamily with eubacterial relationships. *Gene* **295**: 51-9.
- Sato** D, Yamagata W, Kamei K, Nozaki T, Harada S. (2006) Expression, purification and crystallization of L-methionine gamma-lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**(Pt 10):1034-6
- Sato** D, Karaki T, Shimizu A, Kamei K, Harada S, Nozaki T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine gamma-lyase 1 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**(Pt 8):697-9
- Schneider** G, Käck H, Lindqvist Y. (2000) The manifold of vitamin B6 dependent

enzymes. *Structure* **8**(1):R1-6

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

Sharma A, Sojar HT, Glurich I, Honma K, Kuramitsu HK, Genco RJ. (1998) Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infect Immun* **66**(12):5703-10

Stanley SL Jr, Li E. (1992) Isolation of an *Entamoeba histolytica* cDNA clone encoding a protein with a putative zinc finger domain. *Mol Biochem Parasitol* **50**(1):185-7

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. (2003) Amoebiasis. *Lancet* **361**: 1025-1034.

Stark D, van Hal SJ, Matthews G, Harkness J, Marriott D. (2008) Invasive amebiasis in men who have sex with men, Australia. *Emerg Infect Dis* **14**(7):1141-3

Strachan, W.D., Chiodini, P.L., Spice, W.M., Moody, A.H., 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.

Tannich, E; Burchard, GD. (1991) Differentiation of pathogenic from non-pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J.Clin.Microbiology* **29**: 250-5.

Teasdale RD, Collins BM. (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J* **441**(1):39-59

Tillack, M., Nowak, N., 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.

Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, Takeuchi T, Nozaki T. (2003) Identification and characterization of two isoenzymes of methionine gamma-lyase from *Entamoeba histolytica*: a key enzyme of sulfur-amino acid degradation in an anaerobic parasitic protist that lacks forward and reverse trans-sulfuration pathways. *J Biol Chem* **278**(43):42717-27

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

Tovar J, Leon-Avila G, Sanchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernandez M,

- Muller M, Lucoq JM. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**:172–6.
- Tovar J**, Cox SS, van der Giezen M. (2007) A mitosome purification protocol based on percoll density gradients and its use in validating the mitosomal nature of *Entamoeba histolytica* mitochondrial Hsp70. *Methods Mol Biol.* **390**:167–77.
- Tschopp J**, Nabholz M. (1990). Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **8**:279-302
- Vallee BL**, Bazzone TJ. (1983) Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* **8**:219-44
- van der Giezen M** and Tovar J. (2005) Degenerate mitochondria. *EMBO reports* **6**: 525–30.
- Wai DC**, Shihab M, Low JK, Mackay JP. (2016) The zinc fingers of YY1 bind single-stranded RNA with low sequence specificity. *Nucleic Acids Res*
- Wexler M**, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C, Berks BC, Palmer T. (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* **275**(22):16717-22
- WHO/PAHA/UNESCO (1997) report: A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull* **18**: 13-14.
- Willhoef U, Tannich E.** (1999) The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **15**: 49–53
- Yan N.** (2015) Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annu Rev Biophys* **44**:257-83
- Yasunami M**, Chen CS, Yoshida A. (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17):7610-4
- Yi HS**, Lee YS, Byun JS, Seo W, Jeong JM, Park O, Duester G, Haseba T, Kim SC, Park KG, Gao B, Jeong WI. (2014) Alcohol dehydrogenase III exacerbates liver fibrosis by enhancing stellate cell activation and suppressing natural killer cells in mice. *Hepatology* **60**(3):1044-53
- YOUNG MD**, FREED JE. (1956) The effect of puromycin against *Entamoeba histolytica* and other intestinal parasites. *South Med J.* **49**(5):537-8
- Zhang X**, Zhang Z, Alexander D, Bracha R, Mirelman D, Stanley SL Jr. (2004). Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect Immun* **72**(2):678-83
- Zhong Wang**, Mark Gerstein, and Michael Snyder (2010) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**(1): 57–63

6. Anhang

Tabelle 9: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in A1^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung	eingefügte Restriktions-schnittstelle
EHI_015290	GAGAGGTACCATGTCTGGAGG ATATTACTCTCCTTTTG	s	EhC2-3 (C2 domain containing protein)	KpnI
	GAGAGGATCCTCATTCTTTTG TGGAGCTCCTTG	as		BamHI
EHI_042870	GAGAGGTACCATGATTTTTTTG TTAGTCATTACAG	s	EhMP8-2 (cell surface protease gp63)	KpnI
	GAGAGGATCCTTAAAACATAAC ACAAAAGCTTTG	as		BamHI
EHI_082070	GAGAGGTACCATGGCAGGAAG ACCAGCATTA	s	EhRab7D (Rab family GTPase)	KpnI
	GAGAGGATCCTTAGCAACACC CTCCTTCT	as		BamHI
EHI_059860	GAGAGGTACCATGATCAAGATT GAATTAA	s	EhC2-5 (C2 domain containing protein)	KpnI
	GAGAGGATCCTTAGAATGGGT TGTAGTAA	as		BamHI
EHI_118130	GAGAGGTACCATGTCCGTAGG ATATAATTCA	s	EhC2-2 (C2 domain containing protein)	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTTGGTGG TTGTTGTGG	as		BamHI
EHI_169280	GAGAGGTACCATGTCAAATAAA AATCACAAG	s	EhRab7E (Rab family GTPase)	KpnI
	GAGAGGATCCTCAACAACACC CTCCTT	as		BamHI
EHI_074080	GAGAGGTACCATGTACTCAAAA GACGCTTAT	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCCTAAAATCCTC CCATTGG	as		BamHI
EHI_187090	GAGAGGTACCATGCTAAAATTG ATTTTAATTG	s	EhRab7G (Rab family GTPase)	KpnI
	GAGAGGATCCTTAACAACAAC CACTTTCAG	as		BamHI
EHI_075660	GAGAGGTACCATGTTCCATAT TGGACAAG	s	CAAX prenyl protease	KpnI
	GAGAGGATCCTTAATCACTTTT CATATCT	as		BamHI
EHI_075690	GAGAGGTACCATGGTTAGTAA ACTTGAACCTA	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTCATCTTT GTTATC	as		BamHI
EHI_039020	GAGAGGTACCATGGACGCTAA AGTACTT	s	Actobindin	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTTAGCCTT GGCTTG	as		BamHI

Tabelle 10: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in A1^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, mittels qPCR

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung
EHI_015290	GATATCCACCACAACAAGG	s	EhC2-3 (C2 domain containing protein)
	GGTGGATAACCTGGATAAGC	as	
EHI_042870	AAGATGGAGGAGGACGAGGT	s	EhMP8-2 (cell surface protease gp63)
	CCCCAAGTGCCTCAAAATAA	as	

EHI_082070	CAACCGATACGTCAATAACC	s	EhRab7D (Rab family GTPase)
	TGCTCCATTAACAGTAACAGG	as	
EHI_059860	AAGTGGTTGATACTTGGTTAGG	s	EhC2-5 (C2 domain containing protein)
	GGAGCACCAACTGTTAAGC	as	
EHI_118130	AATGTTAAGCCATCAACTGG	s	EhC2-2 (C2 domain containing protein)
	AAGGATCAGAAGAACGAAGG	as	
EHI_169280	ATTCTCATTGGTGATTCTGG	s	EhRab7E (Rab family GTPase)
	AATCAGCTCCAATAGTTGC	as	
EHI_074080	GGTTATCCACCACAACCAAT	s	Hypothetical protein
	CCATAGGACCTGACATTCCTC	as	
EHI_187090	TTACTGCTATTGACACATGG	s	EhRab7G (Rab family GTPase)
	CTAACCTCGGTTGGCAGTCC	as	
EHI_075660	AGCAGAAGCAGCAGACC	s	CAAX prenyl protease
	AACCACATAGTTCCTTGTC	as	
EHI_075690	TTGCTAGATCAGCTGAAGG	s	Hypothetical protein
	CAACCATTCTAATGAACC	as	
EHI_039020	TGATAGAAATGAACCTTCTAGTGAA	s	Actobindin
	CCTTGGCTTGAATATCAGCA	as	

Tabelle 11: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in B2^p im Vergleich zu A1^{np} hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung	eingefügte Restriktions- schnittstelle
EHI_127670	GAGAGGTACCATGTCCCTTAG TTTGCA	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTCAGTATAAGC AAGTAACA	as		BamHI
EHI_144490	GAGAGGTACCATGTCAAGAGT AGTAGTA	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCCTAATATTGAAT TTCTTTT	as		BamHI
EHI_014170	GAGAGGTACCATGAAATCATT TTAAAGAAG	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTAATACTTAAT CAATTCAAAACAAG	as		BamHI
EHI_144610	GAGAGGTACCATGACTGCTCA AGATATTA	s	Methionine gamma- lyase	KpnI
	GAGAGGATCCTTAACAAAGCT CTAATG	as		BamHI

Tabelle 12: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in A1^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, mittels qPCR

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung
EHI_127670	TGGGAGGAAGAGTGTGATGA	s	Hypothetical protein
	TTCCCGTTTACATGACGAG	as	
EHI_144490	TATGCTTACATTCTGCGATG	s	Hypothetical protein
	TAAATACCATGGTGGGGTTA	as	
EHI_014170	GCAGATCTTAATGGTGCTTCAA	s	Hypothetical protein
	CTACCACCAGCTCACCAAG	as	
EHI_144610	ACATGCTTATCCAATCTTCC	s	Methionine gamma-lyase
	CCAAGTCTAGAGTAGATATGACC	as	

Tabelle 13: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in B8^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung	eingefügte Restriktions-schnittstelle
EHI_048140	GAGAGGTACCATGAAACAAAA CACTAATT	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTTTTAGT TGCTG	as		BamHI
EHI_058920	GAGAGGTACCATGAATATAATA TTTATTTG	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTAAATCATTAA TATAACTCCCA	as		BamHI
EHI_026360	GAGAGGTACCATGAAAGGCA AAATATT	s	Phosphoserine aminotransferase	KpnI
	GAGAGGATCCTTAATGAGTATG TAATTGT	as		BamHI
EHI_039020	GAGAGGTACCATGGACGCTAA AGTACTT	s	Actobindin	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTTAGCCTT GGCTTG	as		BamHI
EHI_088020	GAGAGGTACCATGAAAAATTC ACATA	s	alcohol dehydrogenase	KpnI
	GAGAGGATCCTTAGTAAATATC ATTTAAG	as		BamHI
EHI_151930	GAGAGGTACCATGAACGCTAT TAAACCTA	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTTGTCTGA ATTGTCT	as		BamHI
EHI_160670	GAGAGGTACCATGAAAATGGC AGGACAAG	s	Alcohol dehydrogenase 3	KpnI
	GAGAGGATCCTTAGTAAATATC ATTTAAG	as		BamHI
EHI_180390	GAGAGGTACCATGAAACAAAC TAAG	s	AIG1 family protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTAATTTGACCA CTT	as		BamHI
EHI_056490	GAGAGGTACCATGAGAGCAGC TATGGTAG	s	20 kDa antigen	KpnI
	GAGAGGATCCTTATTGTTGAGC AGCTGCT	as		BamHI

Tabelle 14: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in B8^{np} im Vergleich zu B2^p hochreguliert sind, mittels qPCR

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung
EHI_048140	CACTGATTCTGGAAATGCTAC	s	Hypothetical protein
	TAGCACCTTTTGCTTTATCC	as	
EHI_058920	TCACTCTGAAGATGGAACAA	s	Hypothetical protein
	TGGTGCACCTGTCTATGTTATG	as	
EHI_026360	CTTGTTGCAGATATGTCTTCTG	s	Phosphoserine aminotransferase
	TTGTGCACCTGCATAGATTA	as	
EHI_039020	TGATAGAAATGAACCTTCTAGTGAA	s	Actobindin
	CCTTGGCTTGAATATCAGCA	as	
EHI_088020	TGGAGTTGAACAATGTTGG	s	alcohol dehydrogenase
	TTGTGGAACCTCATAACACC	as	
EHI_151930	CATAATGGTTATGGTGTGTC	s	Hypothetical protein
	CACACCATCTTCTTGAACG	as	
EHI_160670	TGGAGTTGAACAATGTTGG	s	Alcohol dehydrogenase 3
	TTGTGGAACCTCATAACACC	as	
EHI_180390	CCAAAGTCAAAGAGTTCCCA	s	AIG1 family protein
	TGCCTTTGACAATACAACCA	as	

EHI_056490	ATGAGAGCACGTATGGTAGG	s	20 kDa antigen
	ATGAAGAAGGTCCACAACC	as	

Tabelle 15: PCR Oligonukleotide für die Klonierung der Gene, die in B2^p im Vergleich zu B8^{np} hochreguliert sind, in den pNC-Vektor

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung	eingefügte Restriktions-schnittstelle
EHI_127670	GAGAGGTACCATGTCCCTTAG TTTGCA	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCTCAGTATAAGC AAGTAACA	as		BamHI
EHI_073680	GAGAGGTACCATGAATGAAAAT AAAG	s	Leucine-rich repeat containing protein	KpnI
	GAGAGGATCCTTAGTTTTTCTT TTTTAAT	as		BamHI
EHI_144490	GAGAGGTACCATGTCAAGAGT AGTAGTA	s	Hypothetical protein	KpnI
	GAGAGGATCCCTAATATTGAAT TTCTTTT	as		BamHI
EHI_144610	GAGAGGTACCATGACTGCTCA AGATATTA	s	Methionine gamma- lyase	KpnI
	GAGAGGATCCTTAACAAAGCT CTAATG	as		BamHI

Tabelle 16: PCR Oligonukleotide für die Bestimmung der Überexpression der Gene, die in B2^p im Vergleich zu B8^{np} hochreguliert sind, mittels qPCR

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung
EHI_127670	TGGGAGGAAGAGTGTGATGA	s	Hypothetical protein
	TTCCCGTTCTACATGACGAG	as	
EHI_073680	TCAGAAAGTGACCAACAAGC	s	Leucine-rich repeat containing protein
	CCTCCTCCAAATCCTTGTC	as	
EHI_144490	TATGCTTACATTCTGCGATG	s	Hypothetical protein
	TAAATACCATGGTGGGGTTA	as	
EHI_144610	ACATGCTTATCCAATCTTCC	s	Methionine gamma-lyase
	CCAAGTCTAGAGTAGATATGACC	as	

Tabelle 17: Oligonukleotide für die qualitative *Real-Time* PCR

Accession-Nr	Sequenz 5' → 3'	sense (s) / antisense (as)	Bezeichnung
β-Actin	AAGCTGCATCAAGCAGTGAA	s	Aktin
	GGAATGATGGTTGGAAGAGG	as	

Tabelle 18: Verwendete Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Vektor
pJC45 forward	GGATAACAATCCCCTCTAG	pJC45
M13 F	GTAAAACGACGGCCAG	TOPO
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	TOPO

Tabelle 19: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($\text{padj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_088020-Transfektante in B2^P

Gen	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	A_1	A_2	A_3	A_4	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj
EHI_088020	225,8374662	216,730905	476,4165364	329,7502968	4113,54288	3760,847078	3496,086776	4951,570286	13,07086319	3,708282514	1,19012E-37	9,42337E-34
EHI_160670	38,89043981	28,54069531	106,9311665	58,93409561	600,837847	1705,340745	797,1077849	973,4883329	17,47465781	4,1271923	5,05839E-08	0,000200262
EHI_022490	12,28119152	9,810864012	12,41165325	25,25746955	47,65008947	48,06194349	62,92956196	50,47717281	3,499241039	1,807042045	1,36596E-06	0,003306224
EHI_144490	369,8003224	347,8397241	195,7222244	322,7343331	859,1906758	884,8547097	605,5222296	633,3683351	2,413189899	1,270941503	1,67023E-06	0,003306224
EHI_176590	11,5989031	9,810864012	36,2802172	56,1277101	71,47513421	131,3120956	85,30451733	97,3488329	3,386473276	1,759783611	2,88163E-06	0,004563352
EHI_062960	11,5989031	11,59465747	6,683197905	9,822349268	34,99303446	41,19595156	37,75773718	32,4496111	3,687647976	1,882700942	1,5517E-05	0,020477322

Tabelle 20: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($\text{padj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_160670-Transfektante_2 in B2^P

Gen	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	B_1	B_2	B_3	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj
EHI_160670	66,7483248	48,67069359	184,5688685	102,0734887	6926,420073	5030,67422	7303,392321	63,87245923	5,997122093	3,92251E-56	3,13409E-52
EHI_114920	59,72218535	9,125755048	36,25459917	14,58192695	576,4761544	449,8248759	638,3080457	18,54441794	4,212913081	5,3839E-25	2,15087E-21
EHI_157570	721,3503172	501,9165277	535,579306	580,8467569	8,706220239	103,9971229	6,754582494	0,068076128	-3,876707205	1,67749E-21	4,46772E-18
EHI_088020	387,6086932	369,5930795	822,3202267	571,1254272	4085,704784	3418,967613	3865,731993	7,049290685	2,817478098	7,19659E-17	1,43752E-13
EHI_106800	0	0	0	0	996,2403445	355,7796308	613,8226841	#DIV/0!	#DIV/0!	1,74812E-15	2,79349E-12
EHI_200090	195,5608814	123,1976932	0	85,06124054	499,9857909	712,5544494	731,6057164	6,41918626	6,282390423	9,8201E-11	1,30771E-07
EHI_112880	140,5227891	285,9403249	26,36698122	320,8023929	644,2602977	740,9173011	775,5105026	3,723883773	1,896808045	1,3276E-08	1,51536E-05
EHI_058530	0	19,77246297	32,95872652	65,61867128	154,2244728	106,9826862	145,2235236	4,578860883	2,194988733	3,24001E-08	3,23596E-05
EHI_030710	46284,69365	39920,61546	29763,37798	50599,28652	13939,90235	9323,914297	8874,677074	0,257260289	-1,958699319	8,32458E-08	7,39037E-05
EHI_169210	0	7,604795874	14,83142693	0	47,88421132	35,32916614	61,63556526	8,608040902	3,105684933	3,05509E-07	0,000244102
EHI_042900	38,64376699	13,68863257	18,12729959	9,721284634	107,5840072	109,9682495	121,5824849	5,639487497	2,49556406	3,48696E-07	0,00025328
EHI_009940	35,13069727	22,81438762	24,71904489	29,1638539	135,5682866	131,3647868	127,4927446	4,702768245	2,233510237	3,89107E-07	0,000259081
EHI_159520	305,6370662	299,6289574	224,1193403	243,0321158	90,17156676	62,19923616	60,36908104	0,264498839	-1,918666704	5,72352E-07	0,000351776
EHI_107050	266,9932992	331,5691001	224,1193403	257,6140428	986,9122514	853,3735201	924,9556402	3,412943574	1,771016563	6,28747E-07	0,000357219
EHI_004440	43,32785996	74,52699956	64,26951672	77,77027707	0	15,92300446	12,24268077	0,144497959	-2,790878979	6,70623E-07	0,000357219
EHI_197520	81,97162695	247,9163455	115,3555428	272,1959697	2,487491497	0	2,955129841	0,018437729	-5,761195186	8,68814E-07	0,000412802
EHI_010020	469,5803201	439,5572015	390,5609093	369,4088161	1359,414103	1467,404379	1385,533734	3,364954308	1,750586915	8,78303E-07	0,000412802
EHI_191090	16,39432539	30,41918349	9,887617956	41,31545969	0	0	0	0	#DIV/0!	1,03277E-06	0,000458437
EHI_158570	119,4443707	150,5749583	126,8910971	109,3644521	366,2831229	495,1059198	444,113799	3,438192433	1,781650294	1,36442E-06	0,000573697
EHI_166860	12,88125566	13,68863257	14,83142693	2,430321158	66,54039754	64,6872056	73,03392321	6,213518924	2,635410546	1,44385E-06	0,000576818
EHI_126560	60,89320859	65,40124451	123,5952245	167,6921599	5,596855868	2,985563336	2,532968435	0,035491287	-4,816391298	2,90375E-06	0,001104806
EHI_004430	0	0	0	0	23,00929635	14,92781668	11,82051936	#DIV/0!	#DIV/0!	3,3648E-06	0,001222036
EHI_132640	3,513069727	114,0719381	293,332666	279,4869332	0	0	0	0	#DIV/0!	4,93575E-06	0,001661735
EHI_016010	36,30172051	71,48508121	130,1869698	106,934131	5,596855868	6,46872056	0	0,046642698	-4,422204938	4,99145E-06	0,001661735
EHI_126550	33,95967402	21,29342845	23,07110856	24,30321158	4,974982994	3,483157225	1,266484218	0,126342118	-9,48592435	6,58224E-06	0,002103684
EHI_096410	64,40627832	44,10781607	32,95872652	36,45481738	130,5933036	173,6602674	200,1045064	3,779499593	1,918195234	7,23031E-06	0,002212193
EHI_167620	0	142,9701624	140,0745877	68,04899244	0	0	0	0	#DIV/0!	7,67144E-06	0,002270177
EHI_174220	50,35399941	51,71261194	59,32570774	48,60642317	133,702668	190,0808657	216,5688012	3,430829023	1,77855723	8,55927E-06	0,002442448
EHI_102950	10,53920918	7,604795874	19,77523591	19,44256927	74,62474491	49,26179504	70,07879337	4,508582337	2,172673869	9,23674E-06	0,002528287
EHI_161070	4948,744221	5927,177904	3955,047183	7193,750629	1750,572141	1757,004023	1398,198576	0,296985978	-1,751533279	9,49294E-06	0,002528287
EHI_194540	2728,484154	1572,671787	2010,482318	1151,972229	6269,722318	6177,628135	5012,322372	3,119075386	1,641118422	1,07113E-05	0,002760761
EHI_005960	22,2494416	7,604795874	13,18349061	7,290963475	69,02788904	46,77382559	83,16579695	5,271148667	2,398117382	1,23625E-05	0,003086759
EHI_169350	180,3375793	208,3714069	177,9771232	228,4501889	741,894339	432,4090898	561,4746698	2,91065922	1,541345939	1,28471E-05	0,00311055
EHI_150770	206,1000906	313,31759	403,7443999	332,9539987	87,06220239	102,5043412	83,58795836	0,289946135	-1,786143186	1,93923E-05	0,004557196
EHI_117600	721,3503172	623,2458341	444,942808	493,3551952	202,730557	205,0086824	151,5559447	0,35294097	-1,502501185	2,11923E-05	0,004837905
EHI_126870	723,6923637	455,1142208	677,30183	670,7686397	1672,838032	2143,634475	1816,560529	2,78496593	-1,477659679	2,18827E-05	0,004856512
EHI_129370	35,13069727	22,81438762	8,23968163	4,860642317	78,35598215	111,4610312	70,07879337	4,877552934	2,28615753	2,52414E-05	0,005419437
EHI_199600	40,98581348	63,88028534	70,86126202	70,47931359	16,7905676	11,94225334	10,97619655	0,21504436	-2,217293803	2,57745E-05	0,005419437
EHI_039020	108,9951615	161,2216725	130,1869698	92,35220402	322,7550217	331,3975302	346,0927323	2,950591995	1,56100444	0,03987E-05	0,006227835
EHI_015010	29,27558105	0	3,295872652	9,721284634	62,8091603	58,71607893	54,45882136	5,54812536	4,272000386	3,17323E-05	0,006338522
EHI_092270	2,342046484	3,041918349	0	4,860642317	21,14367772	34,83157225	17,73077905	9,9282322	3,261955471	3,59562E-05	0,006756706
EHI_186840	42,15683672	41,06589772	29,66285387	72,90963475	139,9213967	117,9297518	166,3315939	3,044087897	1,606010017	3,61911E-05	0,006756706
EHI_020470	38,64376699	31,94014267	0	38,88513853	0	0,497593889	0	0,006060695	-7,36630103	6,36274E-05	0,006756706
EHI_040820	63,23525508	47,14973442	23,07110856	24,30321158	154,2244728	149,2781668	127,914906	3,64620887	1,866397207	4,5939E-05	0,008342102
EHI_096210	40,98581348	42,58685689	54,38189876	29,1638539	126,8620663	143,804634	144,8013622	3,314759718	1,728904295	5,11223E-05	0,009077042
EHI_174550	32,78865078	42,58685689	11,53555428	85,06124054	0	0	0,422161406	0,003273096	-8,255128319	5,65636E-05	0,009824853
EHI_082070	414,5422277	202,2875702	79,10094365	162,8315176	7,462474491	4,975938893	3,799452653	0,025211271	-5,309787337	5,91344E-05	0,010052844
EHI_193530	12,88125566	18,2515101	3,295872652	9,721284634	0	0	0,844322812	0,025498657	-5,293434921	6,39349E-05	0,010642503
EHI_141120	31,61762754	62,35932616	77,45300732	65,61867128	17,41244048	9,951877785	11,39835796	0,218029388	-2,197405485	6,66404E-05	0,010834709
EHI_198680	829,0844555	614,4675066	573,4818415	784,9937342	238,7991837	275,1694208	238,5211943	0,35806919	-1,481689706	6,90236E-05	0,010834709
EHI_107300	133,4966496	57,79644864	118,6514155	106,934131	24,87491497	30,35322724	30,39562122	0,273856719	-1,868506817	6,91577E-05	0,010834709
EHI_008200	1641,774586	1785,606071	1214,529072	2085,215554	348,2488096	900,1473457	485,0634553	0,343576102	-1,541298405	7,55091E-05	0,011602267
EHI_001280	44,4988832	57,6944864	19,77523591	53,46706549	7,462474491	4,975938893					

EHI_004400	4,684092969	13,68863257	14,83142693	14,58192695	55,34668581	35,82676003	48,12640027	3,88676222	1,958568851	0,000187384	0,023393679
EHI_169100	10564,50867	8324,209563	7768,371841	10599,92289	4215,676214	3265,708695	3744,149509	0,390212325	-1,357668747	0,000214114	0,025849344
EHI_130060	0	0	0	0	14,92494898	7,961502228	9,709712335	#DIV/0!	#DIV/0!	0,000218812	0,025849344
EHI_139970	71,43241777	42,58685689	49,43808978	77,77027707	157,3338372	164,7035773	176,8856291	2,757688632	1,463459573	0,000219361	0,025849344
EHI_139070	109,3920918	129,2815299	171,3853779	187,1347292	46,4046557	44,28585614	46,43775464	0,308755964	-1,695461089	0,000219994	0,025849344
EHI_199940	411,029158	468,4554258	507,5643884	510,3674433	1108,177462	1142,47557	1133,503375	2,37808027	1,249797413	0,000233587	0,026332676
EHI_125750	14,05227891	19,77246927	8,23968163	21,87289043	60,3216688	58,21848504	53,19233714	3,58126762	1,840470332	0,000236017	0,026332676
EHI_158310	96,02390586	97,34138718	87,34062528	55,89738664	237,555438	200,0327435	271,449784	2,808599737	1,489851036	0,000236752	0,026332676
EHI_104360	226,0074857	258,5630597	263,6698122	274,6262909	629,3353487	527,9471165	702,4765793	2,424244382	1,277535141	0,000237291	0,026332676
EHI_199140	2,342046484	10,64671422	14,83142693	12,15160579	0	0,995187779	0	0,033196335	-4,912832226	0,000243697	0,026508508
EHI_011400	37,47274375	25,85630597	16,47936326	41,31545969	97,01216838	72,15111394	111,4506111	3,089001777	1,627140701	0,000245511	0,026508508
EHI_016440	26,93353457	24,3353456	16,47936326	55,89738664	79,5997279	76,13186506	104,6960287	2,808322666	1,489708705	0,000273871	0,02883156
EHI_079270	9,368189593	10,64671422	8,23968163	14,58192695	49,12795706	36,82194781	43,90478621	4,041869732	2,015022825	0,000276169	0,02883156
EHI_040280	189,7057652	197,7246927	161,49776	131,2373426	511,1795026	383,6448886	442,4251533	2,62141969	1,390348348	0,000279737	0,02883156
EHI_186810	4,684092969	1,520959175	4,943808978	0	24,87491497	16,91819223	28,7069756	8,431364368	3,075766108	0,000282357	0,02883156
EHI_048730	46,84092969	48,67069359	29,66285387	19,44256927	126,8620668	115,9393762	107,6511585	3,231086143	1,692019214	0,000285068	0,02883156
EHI_178340	543,3547844	302,6708758	235,6548946	240,6017947	1114,396191	697,1290389	1083,688329	2,919410326	1,545676997	0,000320223	0,03161297
EHI_005890	372,385391	3291,355654	3928,680201	2529,964326	186,5618623	171,1722979	0,422161406	0,0471768	-4,405778618	0,000320482	0,03161297
EHI_163860	0	0	16,47936326	0	21,7655506	27,8652578	25,75184576	6,099155893	2,608609591	0,000324445	0,031613617
EHI_085700	72,60344102	44,10781607	65,91745304	72,90963475	19,89993198	27,8652578	10,13187374	0,30209198	-1,726940209	0,000346532	0,03335892
EHI_004490	1058,605011	1207,641585	1222,768754	1492,217191	2493,088353	2881,068619	2985,947624	2,237760642	1,162055729	0,000363494	0,033970692
EHI_012490	55,03809238	69,73659131	113,7076065	102,0734887	31,71551659	32,84119669	17,73077905	0,304298705	-1,716439903	0,000365983	0,033970692
EHI_199590	3511,898703	6588,795145	6255,566294	4756,138507	2164,739475	1512,685423	2120,938903	0,366190117	-1,449335239	0,000373135	0,033970692
EHI_131210	168,6273469	158,1797542	92,28443426	94,78252518	291,0365051	396,5823297	342,7950616	2,673583473	1,41877472	0,000373537	0,033970692
EHI_072070	251,7699971	190,1198968	140,0745877	240,6017947	77,73410928	82,10299173	72,1896004	0,376102138	-1,410803587	0,000375928	0,033970692
EHI_033710	39815,96126	36901,5115	36154,07506	40518,31435	17156,04211	13140,19592	0,413986242	-1,272345272	0,000384029	0,033970692	
EHI_029220	11,71023242	12,1676734	8,23968163	2,430321158	47,88421132	39,30991725	36,72804231	4,78262123	2,257801539	0,000385897	0,033970692
EHI_197530	221,3233928	214,4552436	145,0183967	376,6997796	39,17799108	42,79307448	38,41668793	0,167642338	-2,576541545	0,0003869	0,033970692
EHI_012420	108,9051618	62,35932616	52,73396243	38,88513853	193,4024639	183,1145512	204,7482818	2,948150548	1,559810198	0,000421844	0,036632602
EHI_093580	174,4824631	161,2216725	229,0631493	179,8437657	436,5547577	315,293953	495,1953291	2,398172811	1,261935622	0,000442363	0,037788734
EHI_183570	69,09037129	50,19165277	49,43808978	60,75802896	151,7369813	146,7901973	169,7088852	2,72058482	1,443916808	0,000447404	0,037788734
EHI_180130	16,39432539	13,68863257	9,887617956	14,58192695	3,109364371	0	1,688645623	0,117269535	-3,092099822	0,000449303	0,037788734
EHI_159700	5,855116211	3,041918349	4,943808978	0	24,25304209	19,90375557	30,39562122	7,181876228	2,84436079	0,000469999	0,039117601
EHI_155900	49,18297617	44,10781607	54,38189876	92,35220402	13,68120323	16,91819223	8,865389523	0,219226065	-2,189508754	0,000478086	0,039380462
EHI_119490	5,855116211	12,1676734	4,943808978	14,58192695	42,28735545	37,31954169	31,66210544	3,951118399	1,982261079	0,000488943	0,039863845
EHI_180420	73,77446426	62,35932616	57,67777141	77,77027707	21,14367772	19,40616168	22,37455451	0,308927844	-1,694658188	0,000496434	0,040007327
EHI_140700	10,53920918	30,41918349	16,47936326	26,73353274	4,974982994	2,985563336	2,110807029	0,159537431	-2,648033145	0,000500717	0,040007327
EHI_173600	80,80060371	104,9461831	72,50919835	89,92188286	29,84989796	19,40616168	35,8837195	0,326039407	-1,616881749	0,000507289	0,040120619
EHI_054480	140,5227891	127,7605707	97,22824324	128,8070214	291,0365051	295,0731763	336,4626405	2,488468709	1,315258246	0,000512178	0,040120619
EHI_149230	56,20911562	16,73055092	37,9025355	38,88513853	8,706220239	8,956690007	5,06593687	0,202402109	-2,304703773	0,000526099	0,040811019
EHI_022490	21,07841836	16,73055092	21,42317224	43,74578085	102,6090242	51,74976448	115,2500638	3,490830479	1,803570299	0,000536275	0,041200324
EHI_078750	121,7864172	135,3653666	158,2018873	233,3108312	59,69979593	45,77863781	41,79397918	0,302719228	-1,723947781	0,000563339	0,04255358
EHI_197980	99,53697559	63,88028534	84,04475263	89,92188286	36,06862671	31,84600891	20,26374748	0,348478925	-1,520856687	0,000565451	0,04255358
EHI_023500	443,8178088	403,0541813	492,7329615	313,5114294	942,1374045	948,4139529	1071,023487	2,388680255	1,25621375	0,00057081	0,042624066
EHI_176180	31,61762754	47,14973442	8,23968163	46,17610201	69,02788904	92,05486951	115,2500638	2,766444369	1,468032912	0,000580662	0,042958266
EHI_011370	22,2494416	41,06589772	36,25459917	24,30321158	81,46534652	104,4947167	80,01011977	1,538974064	0,000586274	0,000586274	0,042957949
EHI_156240	188,534742	92,77850966	92,28443426	128,8070214	335,8113521	316,4697136	312,3994403	2,560168438	1,356238731	0,000630419	0,045791365
EHI_049690	2445,09653	3020,624921	3459,018348	3096,229156	662,9164839	1264,883667	1612,65657	0,392697875	-1,348508305	0,000668529	0,04812203

Tabelle 21: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($\text{padj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_160670-Transfektante_1 in B2P

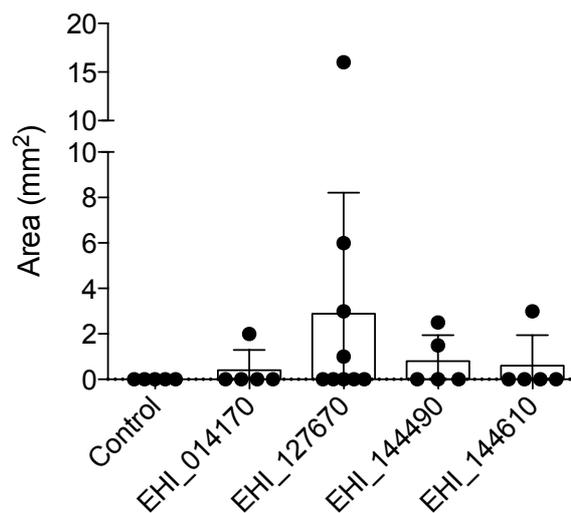
Gen	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	C_1	C_2	C_3	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj
EHI_160670	54,88340752	40,75328932	153,4960561	84,20116587	6513,015477	5648,830561	3673,137863	63,33982435	5,985040961	1,39792E-28	1,11372E-24
EHI_157570	593,1259479	420,2682961	445,4126629	479,1447296	58,5277037	25,0307462	22,05551784	0,072663642	-3,782622515	4,59303E-23	1,82963E-19
EHI_088020	318,7089103	309,4702908	683,8797501	471,125571	4143,629899	4073,923071	2690,177081	8,155992769	3,027860496	1,20221E-17	3,19266E-14
EHI_114920	49,10620673	7,641241747	30,15101102	12,02873798	282,7742988	344,3418869	203,8645162	11,19989545	3,48541336	1,17202E-13	2,33437E-10
EHI_028880	740,4445681	1597,019525	1132,033414	3775,018937	0	0	0,596095077	0,00010971	-13,15402182	3,57743E-09	5,41928E-06
EHI_118220	18,29446917	0	0	0	51,29394257	64,94463879	50,66808152	12,16445337	3,604599587	4,08129E-09	5,41928E-06
EHI_159520	251,3082344	250,8874374	186,3880682	200,4789664	63,78862089	48,03197244	49,47589137	0,241897425	-2,047532681	2,15586E-08	2,45368E-05
EHI_197520	67,4006759	207,5807675	95,93503508	224,5364423	3,288073242	2,706026616	2,384380307	0,018760826	-5,736132835	3,07703E-07	0,000306434
EHI_030710	38057,31021	33426,61202	24752,60955	41739,7208	12925,41591	14520,53882	9476,123434	0,356796453	-1,486826821	8,20373E-06	0,000762126
EHI_193530	10,59153478	15,28248349	2,741001002	8,019158655	0	0	0	0	#DIV/0!	1,24205E-05	0,009895416
EHI_171320	33,70033795	19,10310437	28,78051052	46,11016226	9,864219725	2,029519962	4,768760614	0,173983484	-2,522977733	1,77294E-05	0,012393931
EHI_173600	66,4378091	87,87428009	60,30202205	74,17721756	9,206605076	32,47231939	17,8828523	0,274993376	-1,862531229	1,86679E-05	0,012393931
EHI_004430	0	0	0	0	12,49467832	7,444573194	23,84380307	#DIV/0!	#DIV/0!	2,74998E-05	0,01595581
EHI_087210	0,962866799	0	2,741001002	4,009579327	25,64697128	12,17711977	16,69066215	9,423327391	3,236236568	2,80383E-05	0,01595581
EHI_200090	160,7987554	103,1567636	0	70,16763823	281,4590695	288,1918346	262,2818337	3,319864627	1,731124414	3,63784E-05	0,019321804
EHI_126560	50,06907353	54,76223252	102,7875376	138,3304868	0	8,794586502	10,1336163	0,072951735	-3,776913908	4,22379E-05	0,021031825
EHI_033710	32738,43										

Tabelle 22: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ($\text{padj} \leq 0,05$) zwischen der Kontrolle und dem Überexprimierer EHI_088020Mut-Transfektante in B2^p

Gen	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	M_1	M_2	M_3	M_4	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj
EHI_088020	401,8401249	379,9815336	847,3151489	587,6686571	5630,061931	5280,314546	7941,333348	6206,053933	11,30354655	3,498703592	3,63915E-24	2,91059E-20
EHI_160670	69,19905474	50,03872048	190,1789512	105,030143	953,3181503	1199,864451	1771,152896	1302,591437	12,61181425	3,656703922	6,78376E-18	2,71282E-14
EHI_157570	747,8353986	516,0243049	551,8585639	597,6715279	51,71424486	122,9795994	87,61330972	19,69772417	0,116850116	-3,097268925	1,25886E-17	3,35611E-14
EHI_016010	37,63457363	73,4943707	134,1440817	110,0315784	1,044732219	0	6,820197762	0	0,022135739	-5,497478652	1,26917E-08	2,53771E-05
EHI_159520	316,8588296	308,0508729	230,9315837	250,071769	76,26545202	59,21239971	58,75862688	86,41582215	0,25377429	-1,978382177	4,36094E-08	6,97576E-05
EHI_126560	63,12896222	67,23953064	127,3519763	172,5495206	4,178928878	5,205485689	0,524630597	5,718694113	0,036320775	-4,783061223	1,88248E-07	0,000250934
EHI_126550	35,20653662	21,89194021	23,77236891	25,0071769	3,134196658	2,602742844	0	5,718694113	0,10819652	-3,208273995	2,47636E-07	0,000282941
EHI_171320	42,49064765	23,45565022	35,65855336	57,51650687	4,178928878	10,41097138	4,197044777	1,270820914	0,12605326	-2,987894664	3,34514E-07	0,000314882
EHI_157770	598,5111226	358,0895934	1120,697391	732,7102832	37,6103599	0	0,524630597	138,5194796	0,062866172	-3,991572277	3,54331E-07	0,000314882
EHI_163500	7,284111025	0	0	0	36,04326157	30,58222842	25,70689926	59,0931725	20,78847525	4,377712041	5,77264E-07	0,000461695
EHI_180130	16,99625906	14,07339013	10,1881581	15,00430614	0	0	2,623152986	0	0,04662379	-4,422789892	2,72632E-06	0,001982286
EHI_140700	10,92616654	31,2742003	16,9802635	27,50789459	1,567098329	1,952057133	3,67241418	0,635410457	0,090288537	-3,469313353	5,62413E-06	0,003748486
EHI_168460	19,42429607	42,2201704	44,14868511	50,0143538	5,746027207	13,66439993	4,197044777	4,447873199	0,180064144	-2,473417166	1,2821E-05	0,007887884
EHI_198680	859,525101	631,738846	590,91317	807,7318138	289,3908248	299,9661128	273,3325411	171,5608234	0,357883354	-1,482438651	2,0249E-05	0,01156796
EHI_097650	20,63831457	12,50968012	8,490131752	15,00430614	60,59446873	53,35622831	40,39655598	85,14500123	4,228142107	2,080023866	3,58108E-05	0,019094294
EHI_040340	338,7111627	442,5299342	387,1500079	447,6284665	133,7257241	134,0412565	148,9950896	155,675562	0,354226918	-1,497254247	5,27915E-05	0,025544689
EHI_112880	145,6822205	293,9774828	27,16842161	330,0947351	650,3458066	739,8296535	477,938474	1034,448224	3,642212194	1,864814976	5,46677E-05	0,025544689
EHI_163860	0	0	16,9802635	0	27,16303771	44,89731407	31,47783583	70,53056072	10,25123952	3,357726458	5,74899E-05	0,025544689
EHI_067250	9,712148034	17,20081016	22,07434256	7,50215307	1,567098329	3,253428555	0	1,270820914	0,107831593	-3,213148166	7,08999E-05	0,029845137
EHI_023500	460,1130131	414,3831539	507,7098788	322,592582	785,1162629	1173,186337	1097,002579	1433,485991	2,633033073	1,396725643	7,7997E-05	0,030484325
EHI_082070	429,7625505	207,973432	81,50526482	167,5480852	10,9696883	12,36302851	11,54187314	5,718694113	0,045775567	-4,449278449	8,14194E-05	0,030484325
EHI_105350	172,3906276	159,4984215	67,92105402	125,0358845	389,6851179	389,1100552	262,3152986	416,8292598	2,777842959	1,473965041	8,423E-05	0,030484325
EHI_071360	0	0	0	0	13,05915274	7,157542822	11,01724254	10,80197777	#DIV/0!	#DIV/0!	8,76643E-05	0,030484325
EHI_199940	426,120495	481,6226846	522,9921159	525,1507149	979,4364557	1093,151995	1218,192246	1871,919206	2,639570954	1,400303448	0,000123247	0,041072108
EHI_068620	23,06635158	25,01936024	10,1881581	15,00430614	43,35638711	65,06857111	73,97291419	81,96794895	3,607701987	1,85108017	0,000143942	0,043734363
EHI_142930	114,1177394	71,93066068	96,78750197	110,0315784	174,9926468	292,1578843	292,7438732	274,4973174	2,632927827	1,396667975	0,000145637	0,043734363
EHI_109020	190,6009052	259,5758625	183,3868458	162,5466498	67,38522816	55,30828544	121,1896679	55,28070976	0,37578198	-1,412032207	0,00014764	0,043734363
EHI_126870	750,2634356	642,6848161	697,88883	690,1980824	1817,311696	1595,481364	1634,748941	1711,795771	2,430511436	1,281259922	0,000160708	0,045905019

Abbildung 25: Analyse der ALA-Bildung in *Mus musculus* infiziert mit Klon A1-Transfektanten

Die Überexpressionskonstrukte der Gene, die differentiell im Klon B2^p hochreguliert sind, wurden in den Klon A^{mp} transfiziert und auf ALA-Bildung 7 Tage nach Injektion im Mausmodell untersucht. Die Fähigkeit der entsprechenden Transfektanten in Mäusen 7 Tage nach intrahepatischer Infektion ALAs zu generieren wurde analysiert. Als Kontrolle dienten A1-Transfektanten, die mit dem Leervektor pNC transfiziert waren (Dissertation Helena Fehling, 2015).



Danksagung

Nach all den Jahren ist es nun tatsächlich geschafft und diese Arbeit dank der tatkräftigen Unterstützung von Familie und Freunden zu Papier gebracht.

Auf diesem Wege möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die stets an meiner Seite waren, zugehört haben wenn ich kurz vorm aufgeben war und für unzählige schöne Momente gesorgt haben.

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus, die nun seit mehr als 14 Jahren mit ihrer Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat und als Chefin und Mentorin stets ein offenes Ohr, unzählige Inspirationen und sich nicht gescheut hat konstruktiv zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. Tannich danke ich für die Möglichkeit dieses Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für seine vielen Ratschläge, konstruktive Kritik und unzähligen Tipps zur Lösung so mancher Probleme im Labor.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen beiden Mitstreiterinnen Frau Dr. Jenny Matthiesen und Frau Dr. Helena Fehling, die mir nicht nur stets zur Seite standen und ohne sie so manches Ergebnis dieser Arbeit nicht zustande gekommen wär, sondern auch für die tolle Freundschaft, die diese Zeit überdauern wird.

Allen Mitarbeitern der Labore 5 und 6 gilt mein Dank für die stetige Unterstützung und das tolle Arbeitsklima, das für viele unvergessliche Momente gesorgt hat.

Meiner Prinzessin Micha und Corinna Landau danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Hartnäckig wurde so manches Eppi beschriftet und unzählige Lysate fleißig analysiert.

Ein Tiefer Dank gilt auch einem ganz besonderen Menschen, der mich stets ermuntert, mich unterstützt und bei allen Problemen geholfen hat. Marie-Luise, danke für mehr als 10 Jahre treuer Freundschaft und die vielen Anregungen. Ohne dich wäre diese Arbeit womöglich nicht zustande gekommen.

Für die Unterstützung dieser Arbeit gilt mein Dank ebenfalls der gesamten Abteilung der Virologie, im besonderen Frau Dr. Sophia Reindl, Frau Dr. Maria Lehmann und Herrn Tobias Holm, ohne deren Einsatz, Freundschaft, Kreativität und Wissen so manche Frage dieser Arbeit ungelöst geblieben wär.

Was wäre ein Tag ohne den morgentlichen Kaffee mit euch Mädels. Monika, Sandy, Claudia, Birgit und Conny, euch danke ich für die Treue, die stetige Hilfe, die Ehrlichkeit

und die Fähigkeit mich stets zum Lachen zu bringen. Unvergesslich auch so manch tolle Weihnachtsfeier mit euch.

Franzi, Vivi, Steff und Andreas danke ich für eure jahrelange Freundschaft und Begeisterung an meiner Doktorarbeit und die strahlenden Gesichter über die Faszination an der Forschung wenn ich so manches Mal die Flinte ins Korn werfen wollte.

Mein größter Dank jedoch gehört meiner Familie. Meiner Mutter, Schwester, Tante und Großeltern, die stets an mich geglaubt und bei Problemen immer eine Lösung parat hatten. Danke, dass ihr immer für mich da wart, für eure Treue, Liebe, den Rückhalt und so manche meiner Entscheidungen und spontane Ideen, die bedingungslos unterstützt wurden.

Eidesstattliche Versicherung

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

Hamburg, den