

**Analyse der Unterschiede pathogener und apathogener  
*Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) Klone in der  
Parasit-Wirt Interaktion**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**Helena Sophia Fehling**

geborene Dobbeck  
aus Hamburg

Hamburg, 2017

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Egbert Tannich, unter der Anleitung von Prof. Dr. Iris Bruchhaus und PD Dr. Hannelore Lotter, am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

**1. Gutachter der Dissertation:** **Prof. Dr. Iris Bruchhaus**  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung Molekulare Parasitologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**2. Gutachter der Dissertation:** **Prof. Dr. Tim Gilberger**  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Abteilung Zelluläre Parasitologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**Vorsitzende des Prüfungsausschusses:** **Prof. Dr. Julia Kehr**

**Mitglieder des Prüfungsausschusses:** **Prof. Dr. Egbert Tannich**  
**PD Dr. Sabine Lüthje**

**Datum der Disputation:** **26.02.2016**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	1
1.1.1 Verbreitung, Krankheitsbild und Therapie .....	1
1.1.2 Biologie, Morphologie und genetische Organisation von <i>E. histolytica</i> .....	3
1.1.3 Kulturoisolate von <i>E. histolytica</i> .....	4
1.2 Virulenzentstehung .....	6
1.2.1 Pathogenitätsfaktoren von <i>E. histolytica</i> .....	7
1.2.2 Wirtsfaktoren .....	8
1.2.3 Motilität .....	8
1.3 Vergleichende Transkriptom-Studien .....	9
1.4 Zielsetzung .....	10
<b>2. Material .....</b>	<b>12</b>
2.1 Geräte und Software .....	12
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	12
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	13
2.4 Enzyme und Enzyminhibitoren .....	13
2.5 Reaktionskits .....	14
2.6 Immunreagenzien .....	15
2.7 Oligonukleotide .....	15
2.8 Puffer und Medien .....	16
2.9 Organismen .....	17
2.9.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	17
2.9.2 <i>Mus musculus</i> .....	18
2.9.3 <i>Meriones Unguiculatus</i> .....	19
<b>3. Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Zellbiologische Methoden .....	20
3.1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	20

3.1.1.1 Kultivierung von <i>Entamoeba histolytica</i> .....	20
3.1.1.2 Zellernte von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten für die RNA-Isolierung .....	20
3.1.1.3 Aufbereitung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten für die Amöbenleberabszessinduktion .....	21
3.1.1.4 Induktion von Amöbenleberabszessen in <i>Mus musculus</i> .....	21
3.1.1.5 Induktion von Amöbenleberabszessen in <i>Meriones unguiculatus</i> .....	22
3.1.1.6 Markierung von Trophozoiten mit Superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (SPIO).....	22
3.1.1.7 Herstellung von Amöbenphantomen .....	22
3.1.2 Magnetresonanztomographie.....	23
3.1.3 Histologie und Immunhistochemie .....	24
3.1.4 Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber .....	25
3.1.4.1 Separation von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	25
3.1.4.2 Fixierung von Trophozoiten .....	26
3.1.4.3 Extrazelluläre Immunmarkierung von Trophozoiten .....	27
3.1.4.4 Durchflusszytometrie .....	27
3.1.4.5 Magnetische Zellseparation von Trophozoiten aus Lymphozyten.....	29
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.1 Isolierung von RNA .....	29
3.2.1.1 Isolierung von RNA aus <i>E. histolytica</i> Trophozoiten mit TRIzol® .....	29
3.2.1.2 Isolierung von Gesamt- und miRNA aus <i>E. histolytica</i> Trophozoiten und Lebergewebe mittels des <i>mirVana™</i> miRNA Isolation Kits (Ambion) .....	30
3.2.1.3 Isolierung von RNA aus fixierten Zellen mittels des <i>RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit</i> (Ambion).....	31
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA .....	31
3.2.3 Überprüfung der RNA-Integrität .....	32
3.2.4 Erststrangsynthese (cDNA-Synthese).....	33
3.2.5 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR).....	34
3.2.6 mRNA-Sequenzierung .....	35
3.2.6.1 Herstellung von NGS-Bibliotheken aus Gesamt-RNA nativer Zellen .....	36
3.2.6.2 Herstellung von NGS-Bibliotheken aus Gesamt-RNA fixierterer Zellen .....	38
3.3 <i>In silico</i> Methoden .....	40
3.3.1 Sequenzanalyse.....	40
3.3.2 Gendatenbanken.....	40

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
4.1 Charakterisierung der Pathogenität der <i>E. histolytica</i> Klone A1 und B2 in zwei Tiermodellen der Amöbiasis.....	41
4.2 Vergleichende Transkriptom-Analysen .....	43
4.2.1 Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Sequenzierung der <i>E. histolytica</i> Klone A1 und B2.....	43
4.2.1.1 Validierung der mRNA-Seq-Daten mittels quantitativer <i>real-time</i> PCR (qPCR).....	50
4.2.1.2 Einfluss der identifizierten Gene auf die Amöbenleberabszessbildung im Mausmodell .....	52
4.2.2 Etablierung einer Methode zur Reisolierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten aus der Leber für weiterführende RNA-Analysen .....	55
4.2.2.1 Untersuchung zur Spezifität und Kreuzreaktivität des Amöben-spezifischen Antikörpers $\alpha$ -EhLectin mittels Durchflusszytometrie .....	56
4.2.2.2 Optimierung der Zellausbeute bei der Reisolierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	59
4.2.2.3 Quantitative und qualitative Analysen der RNA aus der Leber reisolierter <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	62
4.2.3 Wirtsspezifische Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Sequenzierung nach intrahepatischer Infektion in C57BL/6 Mäusen mit den <i>E. histolytica</i> Klonen A1 und B2.....	68
4.3 <i>In vivo</i> Visualisierung von <i>Entamoeba histolytica</i> Trophozoiten mittels Magnetresonanztomographie .....	73
4.3.1 Vergleichende <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Darstellung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten des pathogenen Klons B2 nach SPIO-Markierung mittels MRT .....	73
4.3.2 Einfluss von SPIO-Partikeln auf die Abszessentwicklung .....	76
4.3.3 Histologische Darstellung von SPIO-markierten <i>E. histolytica</i> Trophozoiten im Amöbenleberabszess .....	78
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>80</b>
5.1 Charakterisierung der Pathogenität der <i>E. histolytica</i> Klone A1 und B2 in zwei Tiermodellen der Amöbiasis.....	81
5.2 Vergleichende Transkriptom-Analysen .....	82
5.2.1 mRNA-Seq der <i>in vitro</i> kultivierten <i>E. histolytica</i> Klone A1 und B2.....	82
5.2.1.1 Einfluss der identifizierten Gene auf die Amöbenleberabszessbildung im Mausmodell .....	85

5.2.2 Reisolierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten aus der Leber für weiterführende molekulare Analysen .....	86
5.2.3 Wirtsspezifische Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Sequenzierung nach intrahepatischer Infektion von C57BL/6 Mäusen mit den <i>E. histolytica</i> Klonen A1 und B2...	88
5.3 <i>In vivo</i> Visualisierung von <i>Entamoeba histolytica</i> Trophozoiten mittels Magnetresonanztomographie .....	90
5.4 Ausblick .....	91
<b>Zusammenfassung/ Abstract.....</b>	<b>XII</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>XXIV</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>XXV</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>XXXI</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>XXXII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	auffüllen bis
<i>aig</i>	<i>avrRpt2-induziertes gen</i>
ALA	Amöbenleberabszess
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
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>
CP	Cysteinpaptidase
<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>Entamoeba moshkovskii</i>
Eh/eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alerti</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FC	<i>Fold change</i>

FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSE	<i>Fast-Spin-Echo</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
GRE	<i>Gradient-Echo</i>
GTP	Guanosintriphosphat
<i>Hpi</i>	<i>hours post infection</i>
<i>HPLC</i>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IL-...	Interleukin-...
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaar (Größenangabe d. Genom/ Nucleinsäure)
kDa	1000 Da (atomare Masseneinheit <i>Dalton</i> ), <i>siehe Da</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6C</i>
M	Mol
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
Mb.	Megabyte
m	milli
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
N	nano
Na	Natrium
n.d.	nicht differenziell
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
p	pico
padj	adjustierter p-Wert
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>

PE	Phycoerythin
PAHA	<i>Physical Activity Health Alliance</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
S	Svedberg
Seq	Sequenzierung
SPIO	Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel
SSC	<i>Sidwards scatter</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
T	Thymin
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
tRNA	transfer RNA
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
U	Unit (Einheit)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\mu$	micro
$\Delta$	delta
%	Prozent
°C	Grad Celsius

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b> Lebenszyklus von <i>Entamoeba histolytica</i> .....	<b>2</b>
<b>Abbildung 1.2</b> Ausbildung von Amöbenleberabszessen in <i>Meriones unguiculatus</i> durch Trophozoiten der <i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS Zelllinien A und B und der aus ihnen generierten Klone A1-A12 und B1-B12. ....	<b>6</b>
<b>Abbildung 3.1</b> Herstellung einer NGS-Bibliothek mithilfe des ScriptSeq™v2 RNA-Seq Library Preparation Kit. ....	<b>37</b>
<b>Abbildung 3.2</b> SMARTer Technologie für die cDNA Synthese aus degradierten RNA-Proben (www.clontech.com). ....	<b>39</b>
<b>Abbildung 4.1</b> Verlauf der Amöbenleberabszessformation hervorgerufen durch die intrahepatische Infektion mit <i>E. histolytica</i> -Klonen unterschiedlicher Pathogenität. ....	<b>42</b>
<b>Abbildung 4.2</b> Expressionsprofil der Gene, die in dem apathogenen Klon A1 signifikant höher exprimiert sind als in dem pathogenen Klon B2. ....	<b>47</b>
<b>Abbildung 4.3</b> Expressionsprofil der Gene, die in dem pathogenen Klon B2 signifikant höher exprimiert sind als in dem apathogenen Klon A1. ....	<b>49</b>
<b>Abbildung 4.4</b> Graphische Darstellung der Amöbenleberabszessbildung in <i>Mus musculus</i> durch in Klon A1 und Klon B2 transfizierte <i>silencer</i> - und Überexpressionskonstrukte. ....	<b>54</b>
<b>Abbildung 4.5</b> Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Reisolierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten aus der Leber für weiterführende RNA-Analysen.....	<b>56</b>
<b>Abbildung 4.6</b> Analyse der Spezifität des $\alpha$ -EhLectin Antikörpers. ....	<b>58</b>
<b>Abbildung 4.7</b> Ausschluss unspezifischer Kreuzreaktionen des $\alpha$ EhLectin-Antikörpers mit murinen Leberlymphozyten.....	<b>59</b>
<b>Abbildung 4.8</b> Graphische Darstellung der Verlustraten nach den einzelnen Teilschritten des Versuchsablaufs zur Reisolierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten.....	<b>61</b>
<b>Abbildung 4.9</b> Qualitativer Vergleich der RNA isoliert aus nativen und fixierten Proben des <i>E. histolytica</i> -Klons B2.....	<b>64</b>
<b>Abbildung 4.10</b> Nachweis von <i>E. histolytica</i> -Transkripten in nativen und fixierten, axenisch kultivierten Trophozoiten ( <i>in vitro</i> ) sowie in aus der Leber reisolierten Trophozoiten ( <i>ex vivo</i> ) mittels qPCR. ....	<b>66</b>
<b>Abbildung 4.11</b> Qualitative und quantitative Analyse der RNA und cDNA-Bibliotheken zur <i>ex vivo</i> Transkriptomanalyse mittels mRNA-Seq.....	<b>67</b>
<b>Abbildung 4.12</b> Genexpressionsprofil nach intrahepatischer Injektion in <i>Mus musculus</i> mit den Klonen A1 und B2 in der frühen Phase der Amöbenleberabszessentstehung. ....	<b>72</b>

**Abbildung 4.13** Exemplarische Darstellung der MR-Bildgebung von Mauslebern nach intrahepatischer Injektion von nicht-markierten und SPIO-markierten *E. histolytica* Trophozoiten sowie freien SPIO-Partikeln zusammen mit den entsprechenden in Agarosegel eingebetteten Korrelaten..... **75**

**Abbildung 4.14** Ausbreitung von viablen und Formalin-fixierten SPIO-markierten *E. histolytica* Trophozoiten und deren Einfluss auf die Abszessentwicklung an den Tagen 1, 3 und 5 nach intrahepatischer Infektion. .... **79**

**Abbildung 4.15** Kolo­kalisierung von SPIO-Partikeln und *E. histolytica* Trophozoiten in der Mausleber 24 Stunden nach intrahepatischer Infektion. .... **77**

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1</b> Verwendete Laborgeräte .....	<b>12</b>
<b>Tabelle 2.2</b> Verwendete Software .....	<b>12</b>
<b>Tabelle 2.3</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	<b>13</b>
<b>Tabelle 2.4</b> Ausnahmen der Bezugsquellen für Chemikalien und Reagenzien .....	<b>13</b>
<b>Tabelle 2.5</b> Verwendete Enzyme und Enzyminhibitoren .....	<b>14</b>
<b>Tabelle 2.6</b> Verwendete Reaktionskits .....	<b>14</b>
<b>Tabelle 2.7</b> Verwendete Immunreagenzien .....	<b>15</b>
<b>Tabelle 2.8</b> Verwendete Oligonukleotide .....	<b>15</b>
<b>Tabelle 3.1</b> Parameter der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> MRT Sequenzen .....	<b>24</b>
<b>Tabelle 4.1</b> Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene des apathogenen Klons A1 mit einem $p_{adj} \leq 0,05$ und einem <i>Fold Change (FC)</i> von $\geq 3,0$ im Vergleich zum pathogenen Klon B2. ....	<b>44</b>
<b>Tabelle 4.2</b> Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene des pathogenen Klons B2 mit einem $p_{adj} \leq 0,05$ und einem <i>Fold Change (FC)</i> von $\geq 3,0$ im Vergleich zum apathogenen Klon A1. ....	<b>48</b>
<b>Tabelle 4.3</b> Verifizierung der differentiellen Genexpression von 17 Genen mittels qPCR, die laut mRNA-Seq in dem Klon A1 signifikant höher exprimiert sind ( $FC \geq 3,0$ ) als in dem Klon B2. ....	<b>50</b>
<b>Tabelle 4.4</b> Verifizierung der differentiellen Genexpression von 11 Genen mittels qPCR, die laut mRNA-Seq in dem Klon B2 signifikant höher exprimiert sind ( $FC \geq 3,0$ ) als in dem Klon A1. ....	<b>51</b>
<b>Tabelle 4.5</b> Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene, 12 und 24 Stunden nach intrahepatischer Injektion ( <i>hpi</i> ) in <i>Mus musculus</i> mit dem apathogenen Klon A1 mit einem $p_{adj} \leq 0,05$ im Vergleich zur Infektion mit dem pathogenen Klon B2. ....	<b>69</b>
<b>Tabelle 4.6</b> Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene, 12 und 24 Stunden nach intrahepatischer Injektion ( <i>hpi</i> ) in <i>Mus musculus</i> mit dem pathogenen Klon B2 mit einem $p_{adj} \leq 0,05$ im Vergleich zur Infektion mit dem apathogenen Klon A1. ....	<b>71</b>
<b>Tabelle A1</b> Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ( $p_{adj} \leq 0,05$ ) zwischen den <i>E. histolytica</i> Klonen A1 und B2 .....	<b>XXV</b>
<b>Tabelle A2</b> Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ( $p_{adj} \leq 0,05$ ) 12 Stunden nach intrahepatischer Infektion in C57BL/6 Mäusen mit den <i>E. histolytica</i> Klonen A1 und B2. ....	<b>XXIX</b>

**Tabelle A3** Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ( $p_{adj} \leq 0,05$ ) 24 Stunden nach intrahepatischer Infektion in C57BL/6 Mäusen mit den *E. histolytica* Klonen A1 und B2. ....**XXX**

## 1. Einleitung

### 1.1 *Entamoeba histolytica*

Das parasitische Protozoon *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) ist der Erreger der Amöbiasis. Nach Malaria und Schistosomiasis zählt die Amöbiasis zu den häufigsten humanen Parasitosen, die weltweit jedes Jahr ca. 50 Millionen Menschen befällt. Nach Schätzungen fallen ihr bis zu 100.000 Infizierte jährlich zum Opfer (WHO/PAHA/UNESCO, 1997; Walsh, 1986).

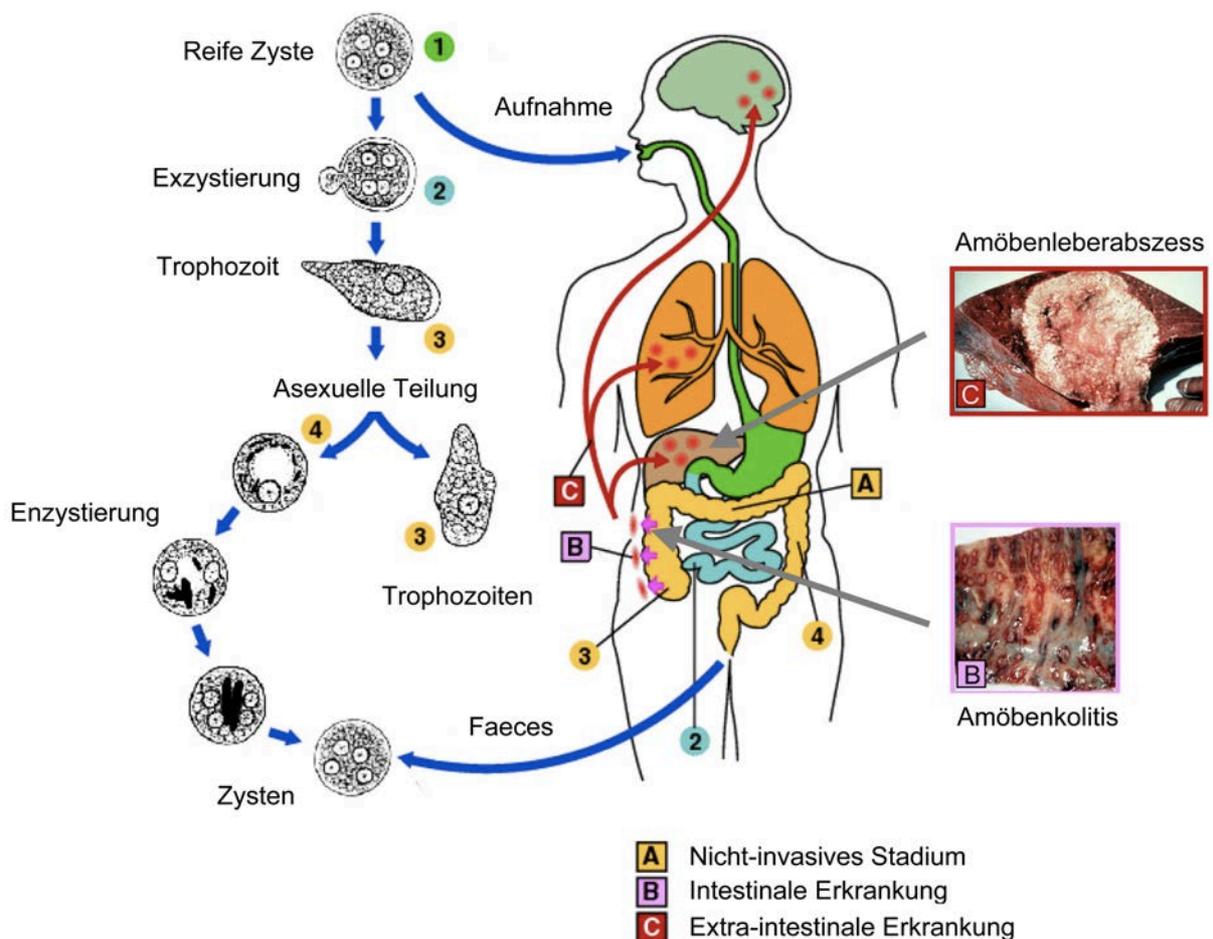
Neben wenigen Affenarten ist der Mensch der einzige relevante Wirt des Erregers (van Lunzen, 1996). Die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme vierkerniger Zysten (Abbildung 1.1), aus denen sich im unteren Dünndarm durch Exzystierung achtkernige Trophozoiten entwickeln. Durch Plasmateilung entstehen einkernige Trophozoiten, die aufgrund von Pseudopodienbildung beweglich sind und schließlich den oberen Dickdarm besiedeln (Marshal *et al.*, 1997). Sie können dort als apathogene Kommensalen leben und ernähren sich vornehmlich über Phagozytose von Bakterien der Darmflora und von Nahrungsresten. Nach einer asexuellen Fortpflanzung durch Zweiteilung erfolgt im unteren Dickdarm eine Enzystierung. Die äußerst widerstandsfähigen reifen Zysten werden über den Stuhl des Wirts ausgeschieden. Eine infizierte Person kann bis zu 45 Millionen Zysten pro Tag ausscheiden, die abhängig von den Umweltbedingungen über mehrere Wochen infektiös bleiben (Lucius, 2008). Die Übertragung erfolgt meist mit fäkal verunreinigtem Trinkwasser oder Lebensmitteln.

#### 1.1.1 Verbreitung, Krankheitsbild und Therapie

Infektionen mit *E. histolytica* treten endemisch in den meisten tropischen und subtropischen Regionen der Erde auf. Aber auch in Gegenden mit gemäßigttem Klima ermöglichen eine mangelnde Hygiene und eine unzureichende Wasseraufbereitung die fäkal-orale Übertragung des Erregers.

Die Infektion kann in verschiedenen Verlaufsformen auftreten. In ca. 90% der Fälle entwickelt sich ein inapparenter Verlauf, d.h. die Infektion mit *E. histolytica* kann über mehrere Monate bis Jahre dauerhaft bestehen ohne besondere Symptome hervorzurufen (Abbildung 1.1 A). Schätzungsweise 10% der Infizierten entwickeln eine invasiv intestinale Amöbiasis. Bei dieser Verlaufsform werden die im Dickdarm lokalisierten Trophozoiten invasiv und dringen unter massiver Gewebszerstörung in die Mukosa und das Darmepithel ein (Stanley, 2003) (Abbildung 1.1 B). Zu den typischen Symptomen gehören Bauchschmerzen, eitrige

Kolitis und blutige Diarrhöe, die durch Fieber begleitet werden können. Nimmt die Amöbiasis einen extra-intestinalen Verlauf, gelangen die Trophozoiten nach Perforation des Darmepithels über den Blutstrom in weitere Organe und verursachen dort Abszesse (Abbildung 1.1 C). In einzelnen Fällen treten durch Amöben verursachte Abszesse in Lungen, Gehirn, Nieren sowie dem Urogenitaltrakt auf. In den meisten Fällen (> 95%) manifestieren sich die Amöbenabszesse jedoch in der Leber (Amöbenleberabszess = ALA) (Burchard und Tannich, 2004).



**Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*.**

Die Infektion erfolgt über die orale Aufnahme der reifen Zystenform von *E. histolytica* (1). Die vierkernige Zyste gelangt über den Magen in den Dünndarm, wo nach Exzystierung achtkernige Trophozoiten entstehen. Durch weitere Plasmateilungen entstehen einkernige, bewegliche Trophozoiten (2 und 3), die den oberen Dickdarm besiedeln. Bei nicht-invasiven Verläufen (A) kommt es durch asexuelle Zweiteilung zur Enzystierung der Trophozoiten. Diese werden über den Stuhl des Wirtes ausgeschieden (4). Bei intestinalen Verlaufsformen (B) kommt es zu einer Schädigung der Darmmukosa, was eine Amöbenkolitis zur Folge haben kann. Bei extra-intestinalen Erkrankungen (C) kann es in anderen Organen, vorzugsweise in der Leber, zur Abszessbildung kommen, indem die Amöben die Darmwand durchdringen und über den Blutstrom in die Organe des Wirtes gelangen.

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

Bei inapparenten Formen der Infektion erfolgt eine Behandlung durch die Verabreichung von Paromomycin, welches durch Bindung an die Ribosomen die Proteinbiosynthese der Amöben blockiert. Invasive Erkrankungen werden zehn Tage mittels Metronidazol therapiert. Dieses eliminiert Amöben unter anaeroben Bedingungen durch die Übertragung von Elektronen auf das Ferredoxin der Amöben, so dass Nitroradikale entstehen, welche wiederum DNA, Proteine und Lipide schädigen. Intraluminal verbleibende Formen werden ergänzend mit Paramomycin therapiert. Amöbenleberabszesse heilen unter rechtzeitiger Diagnose und adäquater medikamentöser Therapie vollständig aus. Ein unbehandelter Amöbenleberabszess weist dagegen eine sehr hohe Letalitätsrate auf.

### **1.1.2 Biologie, Morphologie und genetische Organisation von *E. histolytica***

*E. histolytica* wird taxonomisch in den Stamm der Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Ordnung Entamoebida, Familie Entamoebidae und der Gattung *Entamoeba* zugeordnet (Adl *et al.*, 2005). Sie zeichnen sich durch eine obligat anaerobe Lebensweise aus, wodurch sie an die Bedingungen des menschlichen Darms angepasst sind. Die Trophozoiten sind von einer einfachen Zellmembran umgeben, welche ihnen ihre charakteristische amöboide Bewegung durch Pseudopodien ermöglicht, die aus der Plasmamembran ausgestülpt werden. Diese sind ebenfalls an der Nahrungsaufnahme durch Phagozytose beteiligt.

Neben der pathogenen Spezies *E. histolytica* gibt es zwei weitere verwandte humaninfektiöse Spezies. Die apathogene Spezies *E. dispar* und die amphizoische Spezies *E. moshkovskii*. Zysten als auch Trophozoiten dieser drei Spezies sind aufgrund mikroskopisch-morphologischer Kriterien nicht voneinander zu unterscheiden, mit der Ausnahme, dass *E. histolytica* Trophozoiten wahrscheinlich mehr ingestierte Erythrozyten beinhalten können (Pritt und Clark, 2008). Co-Infektionen mit allen drei Spezies sind relativ häufig anzutreffen (Ali *et al.*, 2003; Tanyuksel *et al.*, 2007). Über Isoenzymanalysen, dem Nachweis von Antigenvariationen und weiteren molekularbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei *E. histolytica* und *E. dispar* um eigenständige Spezies handelt (Clark und Diamond, 1993; Strachan *et al.*, 1988; Tannich *et al.*, 1989). In der Diagnostik lassen sich *E. histolytica*, *E. dispar* und *E. moshkovskii* anhand von Marker-Genen, die für kleine ribosomale Proteine kodieren, mittels PCR-Analysen voneinander unterscheiden.

Vakuolen und Vesikel bilden 40% der Bestandteile des Endoplasmas der Trophozoiten, welche funktionell das Äquivalent der Lysosomen und der zytotoxischen Vesikel höherer eukaryotischer Zellen darstellen (Scholze und Tannich, 1994). Trophozoiten verfügen über ein vom Mitochondrium abgeleitetes Mitosom. Ein echtes mitochondriales Genom ist jedoch nicht vorhanden (Tovar *et al.*, 1999). Ein Endoplasmatisches Retikulum (ER) ist in den Zellen existent, allerdings konnte bisher noch kein Nachweis für einen – wie bei eukaryotischen

Zellen beschriebenen – Golgi-Apparat erbracht werden. Es konnten bislang nur Golgi-ähnliche Vesikel identifiziert werden (Bredeston *et al.*, 2005).

Das Genom von *E. histolytica* umfasst ungefähr 20 Mb. Mit etwa 75 % weist es einen vergleichsweise hohen AT-Gehalt auf (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010). Die Genomanalyse sagt 8.201 putative Gene voraus. Diese repräsentieren mit einer durchschnittlichen Länge von 1,26 kb, 49 % des gesamten Genoms (Lorenzi *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2007). Intronsequenzen besitzen dabei nur 25 % aller Gene, von denen bei ca. 6 % multiple Intronbereiche gefunden worden sind (Loftus *et al.*, 2005; Lorenzi *et al.*, 2010). Die exakte Anzahl der Chromosomen und deren Organisation konnten bisher noch nicht geklärt werden.

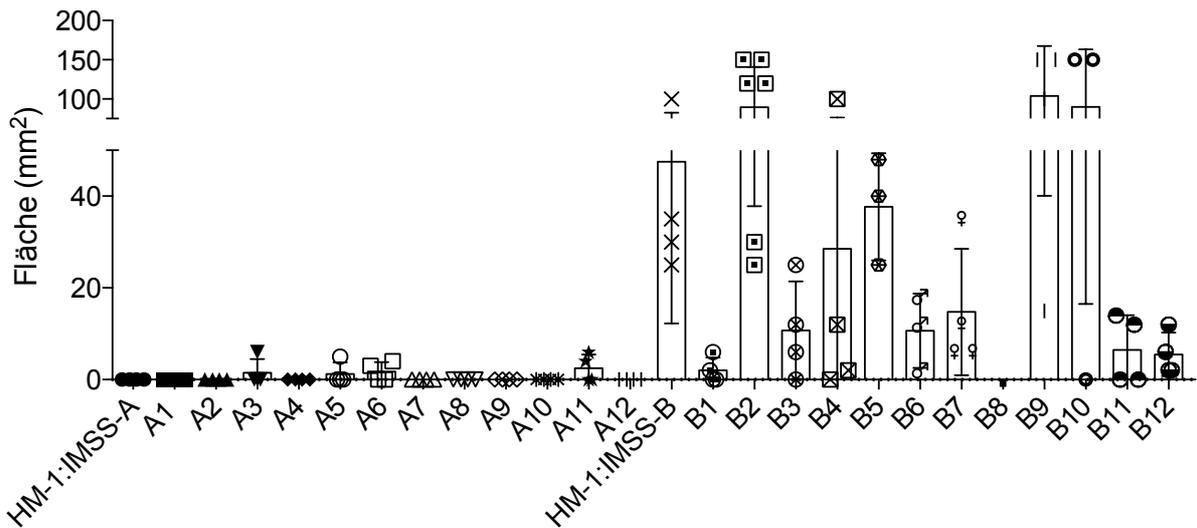
### 1.1.3 Kulturisolate von *E. histolytica*

*E. histolytica* kann aus Stuhlproben infizierter Patienten isoliert, und unter axenischen Bedingungen als entsprechende Zelllinie in die *in vitro*-Kultur überführt werden. Bedingt durch die variable Symptomatik im Patienten weisen diese Isolate spezifische Phänotypen auf. Diverse *in vitro* sowie *in vivo* Studien dienen der näheren Charakterisierung des Phänotyps sowie den für die Virulenzentstehung verantwortlichen Pathogenitätsfaktoren. Dabei wird sich die Fähigkeit der Trophozoiten nach intrahepatischer Injektion im Tiermodell Amöbenleberabszesse zu induzieren für die Untersuchung der Pathogenität des Parasiten zu Nutzen gemacht. Der Begriff Pathogenität wird daher in dieser Arbeit als das Vermögen von *E. histolytica* Amöbenleberabszesse im Tiermodell zu induzieren definiert. Insbesondere vergleichende Studien zwischen apathogenen und pathogenen Zelllinien werden daher häufig für die Identifizierung putativer Pathogenitätsfaktoren genutzt (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkauf *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006).

Das pathogene Isolat HM-1:IMSS wurde 1967 aus einem Patienten mit Amöbenkolitis isoliert. Von diesem Isolat existieren heutzutage verschiedene in Kultur gehaltene Subtypen. Zwei dieser Subtypen des *E. histolytica* Isolats HM-1:IMSS, die im Folgenden als Zelllinie A und Zelllinie B bezeichnet werden, unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Pathogenität im Tiermodell. Beide Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATTC, Katalog-Nr. 30459) zu unterschiedlichen Zeitpunkten bezogen und seitdem ohne Wirtspassage *in vitro* kultiviert. So gelangte die Zelllinie A 2001 ans Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM), die Zelllinie B bereits 1991. Um die Abstammung beider Zelllinien von dem Patientenisolat HM-1:IMSS nachzuweisen, wurde eine Genotypisierung von unterschiedlichen, hoch polymorphen tRNA-Arrays durchgeführt (Ali *et al.*, 2005). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass beide Zelllinien einen identischen genetischen Hintergrund haben und somit syngonisch sind. Allerdings ist nur die Zelllinie B im Tiermodell dazu befähigt Amöbenleberabszesse zu induzieren wohingegen die Zelllinie A diese Fähigkeit verloren hat (Biller *et al.*, 2009).

Die beiden Zelllinien wurden bereits in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien näher charakterisiert. Phänotypischen Untersuchungen zeigten, dass Zelllinie A sich durch eine kleinere Zellgröße, eine schwächere Wachstumsrate, eine reduzierte Cysteinpeptidaseaktivität, eine geringere Resistenz gegenüber Stress wie Hitze und reaktive Stickstoffspezies und eine gesteigerte hämolytische Aktivität von Zelllinie B unterscheidet. Hinsichtlich ihrer zytopathischen Aktivität, ihrer Fähigkeit zur Erythrophagozytose und *Rossettings* (Bindung von Erythrozyten an Trophozoiten) sowie ihrer Stressresistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden (Biller *et al.*, 2009). Zusätzlich wurden die beiden Zelllinien auch auf Ebene ihres jeweiligen Proteoms und Transkriptoms analysiert (siehe 1.3). Diese Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass die beiden Zelllinien heterogener sind als zunächst vermutet (Biller *et al.*, 2010; Biller *et al.*, 2014).

Um Studien mit homogenen Zellpopulationen zu gewährleisten, wurden aus beiden Zelllinien jeweils 12 Klone generiert (Dissertation Matthiesen, 2012). In ersten Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Klone hinsichtlich ihrer Pathogenität stark voneinander unterscheiden. Alle Klone, die aus der Zelllinie A generiert wurden, wurden für apathogen befunden, da 7 Tage nach Infektion in *Meriones unguiculatus* keine Amöbenleberabszesse detektiert werden konnten. Die Klone, die aus der Zelllinie B generiert wurden, weisen allerdings Variationen in ihrem Grad der Virulenz auf, die sich von avirulent bis hin zu hochgradig virulent darstellen (Abbildung 1.2). Über eine Subklonierung ausgewählter Klone konnte gezeigt werden, dass diese im Tiermodell hinsichtlich ihres Phänotyps stabil sind.



**Abbildung 1.2: Ausbildung von Amöbenleberabszessen in *Meriones unguiculatus* durch Trophozoiten der *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinien A und B und der aus ihnen generierten Klone A1-A12 und B1-B12.**

Die Abszessgrößen (Fläche, mm<sup>2</sup>) wurden 7 Tage nach intrahepatischer Injektion von jeweils  $1,25 \times 10^5$  Trophozoiten in *Meriones unguiculatus* (n = 4-6) ermittelt (modifiziert nach Matthiesen, 2012).

## 1.2 Virulenzentstehung

Der Name *E. histolytica* impliziert bereits die potente zytolytische Aktivität des Parasiten gegenüber Wirtszellen, Zellverbände aufzulösen und Gewebe mit hoher Effizienz zu lysieren. Der für die Gewebeerstörung verantwortliche Mechanismus wird als amöboide Trogozytose (von griechisch trogo = knabbern) bezeichnet. Dabei adhären die Parasiten an Zuckerstrukturen der Wirtszellmembran und internalisieren diese in Stücken. Dies führt zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Wirtszellmembran, wodurch in dieser der programmierte Zelltod ausgelöst wird (Ralston *et al.*, 2014). Die apoptotischen Zellen lösen wiederum eine starke inflammatorische Immunantwort aus, die zu einer Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen führt, welche dem Parasiten dann die Invasion der Kolonkrypten ermöglichen (Ralston und Petri, 2011). *E. histolytica* Trophozoiten können ebenfalls eine wirtsspezifische inflammatorische Signalkaskade über die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 sowie über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies induzieren (Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Rawal *et al.*, 2005; Dingayan, 2011). Die hauptsächlich für die Virulenzentstehung verantwortlichen Faktoren werden demnach aus einem komplexen Zusammenspiel von verschiedenen Pathogenitätsfaktoren des Parasiten sowie von wirtsabhängigen Faktoren gesteuert. Aber auch weitere Faktoren wie z. B. die Motilität der Parasiten könnten zu einer gesteigerten Invasivität in die Darmmukosa und die Migration zur Leber führen und somit für die Virulenzentstehung von Bedeutung sein. Obwohl der Mechanismus,

der zum programmierten Zelltod durch *E. histolytica* führen kann entschlüsselt worden ist (Ralston *et al.*, 2014), sind die dafür verantwortlichen auslösenden Faktoren nach wie vor unbekannt. Das klinische Krankheitsbild einer *E. histolytica*-Infektion kann im humanen Wirt sehr variabel verlaufen (vgl. 1.1.1), und demnach ist die Erforschung von Pathogenitätsfaktoren auf Seiten des Parasiten und des Wirtes nach wie vor von großer Relevanz um den Ursprung der Pathogenität aufzuklären.

### 1.2.1 Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

*E. histolytica* zeichnet sich durch eine hohe Zytotoxizität gegenüber einer Vielzahl von Zelltypen, wie z. B. Neutrophilen, T-Lymphozyten und Makrophagen aus. Dies geht in einem schrittweisen Prozess vonstatten, bei dem bisher drei Gruppen von Pathogenitätsfaktoren, die maßgeblich bei Adhärenz und Lyse involviert sind, identifiziert werden konnten.

Die Anheftung der Trophozoiten an das Darmepithel des Wirtes wird durch ein Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal/GalNAc) spezifisches Lektin der Trophozoiten vermittelt (Horstmann *et al.*, 1992; Petri, 1996). Diese Anheftung an das Darmepithel führt zu einer kontakt-abhängigen Lyse der Wirtszellen über die Ausschleusung von porenbildenden Proteinen, sogenannten *Amoebapores* (Leippe *et al.*, 1991; Leippe und Müller-Eberhard, 1994). Für *E. histolytica* sind drei Isoformen dieser Proteine, die *Amoebapores* A, B und C, bekannt, die unterschiedliche Primärstrukturen aufweisen. Sie können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Membranen permeabilisieren und dadurch die Lyse dieser Zellen auslösen (Leippe *et al.*, 1994). Untersuchungen haben gezeigt, dass die *Amoebapore*-Synthese durch transkriptionelle Inaktivierung des entsprechenden Gens verhindert werden kann und *E. histolytica* dadurch seine Pathogenität verliert (Bracha *et al.*, 2003).

Einen weiteren wichtigen Pathogenitätsfaktor stellen die Cysteinpeptidasen dar. Das Genom von *E. histolytica* enthält 50 Cysteinpeptidase-Gene (Loftus *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007; Tillack *et al.*, 2009), von denen 35 strukturell mit der C1 Papain-Superfamilie verwandt sind. Diese werden in drei Familien unterteilt: EhCP-A, EhCP-B und EhCP-C (Clark *et al.*, 2007; Tillack *et al.*, 2006). Cysteinpeptidasen sind in der Lage, die extrazelluläre Matrix der Wirtszellen anzugreifen und dadurch Gewebe aufzulösen (Keene *et al.*, 1986; Stanley *et al.*, 1995; Que *et al.*, 2002; Scholze und Tannich, 1994; Olivos-Garcia *et al.*, 2004; Bruchhaus *et al.*, 2003). In ersten Untersuchungen konnte zudem bereits gezeigt werden, dass der hoch pathogene Klon B2 eine 10fach höhere Cysteinpeptidase-Aktivität aufweist als der apathogene Klon A1. Durch die Überexpression ausgewählter Cysteinpeptidasen (EhCP-B8, -B9, -C13) in dem Klon A1 - die unter Kulturbedingungen sowie während der ALA-Entstehung in dem Klon B2 sehr hoch exprimiert sind - konnte ein pathogener Phänotyp erzeugt werden (Matthiesen *et al.*, 2013). Bei einem Vergleich der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität

aller aus den Zelllinien A und B generierten Klone mit den von ihnen verursachten Abszessgrößen konnte jedoch keine Korrelation festgestellt werden.

Allerdings konnten Homologe all dieser bisher identifizierten Pathogenitätsfaktoren auch in der apathogenen Spezies *E. dispar* identifiziert werden. Demzufolge sind weitere Studien erforderlich um einen Nachweis zu erbringen, ob nur einer oder eine Kombination dieser Faktoren oder eventuell zusätzliche Einflüsse für die Pathogenität von *E. histolytica* verantwortlich sind.

### 1.2.2 Wirtsfaktoren

Neben den Pathogenitätsfaktoren des Parasiten wird in immer mehr Studien belegt, dass auch wirtsspezifische Mechanismen bei einem Ausbruch der Amöbiasis eine wichtige Rolle spielen. So sind z.B. 80% der Patienten die einen ALA entwickeln Männer mittleren Alters, unabhängig von der Tatsache, dass die Prävalenz der Parasiten in Frauen und Kindern für gewöhnlich höher ist (Blessmann *et al.*, 2002). Der genetische Hintergrund ist zwar nach wie vor unklar, jedoch konnten Studien im Mausmodell zeigen dass gesteigerte Interferon- $\gamma$  Werte sowie Natürliche Killer T-Zellen in weiblichen Mäusen eine Resistenz gegenüber ALA zugrunde liegen könnte (Lotter *et al.*, 2006). In histologischen Analysen konnte gezeigt werden, dass es zu einer massiven Akkumulation von inflammatorischen Zellen, wie Neutrophilen und Makrophagen innerhalb des Abszessbereichs kommt (Ventura-Juárez *et al.*; 2003, Lotter *et al.*, 2006), diesen aber keine große Relevanz bei der Gewebszerstörung als auch bei der Kontrolle der Krankheit zugeschrieben werden kann, während Kuppferzellen der Leber und inflammatorische TNF $\alpha$  produzierende Ly6C-exprimierende Monozyten maßgeblich bei der Gewebszerstörung involviert sind (Helk *et al.*, 2013). In klinischen Studien konnte des weiteren gezeigt werden, dass neben wirtsinflammatorischen Mediatoren wie z.B. Leptin (Duggal, *et al.*, 2011), auch weitere Wirtsmoleküle wie das Apoptose-Regulator-Gen Bcl2, der Transkriptionsregulator NF- $\kappa$ B und Stat3 (Marie *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2011) einen starken Einfluss auf die Pathogenese der Amöbiasis haben.

### 1.2.3 Motilität

*E. histolytica* Trophozoiten zeichnen sich durch ihre Beweglichkeit aus. Da die Parasiten das intestinale Epithelium invadieren und sich im distalen Gewebe ausbreiten können, könnte die selbstgesteuerte Motilität an der Gewebeinvasion beteiligt sein und somit einen putativen Pathogenitätsfaktor darstellen.

Die Motilität der Trophozoiten ist Myosin-abhängig und auf Bläschenbildung basierend. Angetrieben wird sie über die dynamische Instabilität des intrazellulären hydrostatischen Drucks (Maugis *et al.*, 2010). Willkürliche als auch chemotaktische Bewegungen konnten bereits beobachtet werden. Außerdem wird vermutet, dass *E. histolytica* eigene chemotaxische Faktoren generieren kann, da gezeigt werden konnte dass konditioniertes Medium zu einer negativen Chemotaxis führt (Zaki *et al.*, 2006). *E. histolytica* reagiert auch *in vitro* auf TNF $\alpha$  als chemischen Lockstoff (Blazquez *et al.*, 2006). Die Rolle der Motilität bei der extra-intestinalen Ausbreitung der Parasiten und der Moleküle, die das chemotaktische Verhalten von Amöben *in vivo* steuern, ist bislang nur unzureichend untersucht. Allerdings stellt die nicht-invasive Visualisierung von pathogenen Mikroorganismen innerhalb ihres Wirts nach wie vor eine große Herausforderung für die Wissenschaft dar. In ersten Untersuchungen wurde zwar bereits versucht die Ausbreitung der Trophozoiten in den Organen zu untersuchen, jedoch sind diese Ergebnisse entweder auf *ex vivo* Daten limitiert oder hochgradig invasiv und nur auf ein kleines Sichtfeld begrenzt (Rigothier *et al.*, 2002; Labruyere und Guillen, 2006).

### 1.3 Vergleichende Transkriptom-Studien

Vergleichende Transkriptom-Studien zwischen apathogenen und pathogenen *E. histolytica* Isolaten können maßgeblich dazu beitragen, den Ursprung der Pathogenität aufzuklären. In zahlreichen Studien wurden das pathogene Isolat HM-1:IMSS mit dem apathogenen Isolat Rahman verglichen. Im Gegensatz zum HM-1:IMSS-Isolat, welches von einem Kolitis-Patienten stammt, wurde Rahman 1973 in England aus einem asymptomatischen Individuum isoliert. In diesen Studien konnten 1,5 % bis 10 % der analysierten Gene zwischen den beiden Isolaten als differentiell exprimiert identifiziert werden (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufner *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Diese Gene sind unter anderem an der proteolytischen und antimikrobiellen Aktivität, an biochemischen Reaktionswegen, der Reorganisation des Zytoskeletts und an Prozessen der Sekretion beteiligt (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufner *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Allerdings konnten nur wenige Übereinstimmungen zwischen den verschiedenen Studien beobachtet werden (Davis *et al.*, 2007; Ehrenkaufner *et al.*, 2007; MacFarlane und Singh, 2006). Der wahrscheinliche Grund dafür ist, dass Isolate mit einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund verglichen wurden. So konnte eine phänotypische Charakterisierung des Rahman-Isolates zeigen, dass dieses diverse Defekte z. B in der Erythrophagozytose-Fähigkeit aufweist, welche die Virulenz beeinträchtigen könnten (Davis *et al.*, 2006).

Auch die Transkriptome der beiden *in vitro*-kultivierten *E. histolytica*-Zelllinien A und B, die einen identischen genetischen Hintergrund aufweisen, wurden bereits miteinander verglichen. Dabei konnten von den 6242 untersuchten Genen 87 als differentiell exprimiert ( $\geq 2$ fach)

gefunden werden, wovon allerdings nur 19 Gene eine 5fache oder höhere differentielle Expression zeigten. Zu diesen gehören drei *rab7-gtpasen*, welche in der apathogenen Zelllinie A höher exprimiert sind als in der pathogenen Zelllinie B. In der Zelllinie B konnten dagegen mehr Transkripte, die für AIG1-GTPasen kodieren, gefunden werden. Alle differentiell exprimierten Gene wurden mittels ihrer putativen biologischen Funktionen unter anderem in die Rubriken Stressantwort, Transport, Signaltransduktion, Kinase-Aktivität, RNA/DNA-Metabolismus, Zellmetabolismus oder Peptidase-Aktivität klassifiziert, wobei ungefähr 50 % der differentiell regulierten Gene für hypothetische Proteine kodieren (Biller *et al.*, 2010).

*Ex vivo* Vergleiche der Genexpression von *E. histolytica* Trophozoiten wurden bisher noch kaum untersucht. In einer *ex vivo* Studie wurde die differentielle Genexpression zwischen axenisch kultivierten Trophozoiten und Trophozoiten, die aus einem Maus-Colon reisoliert wurden analysiert (Gilchrist *et al.*, 2006). Dabei wurde eine differentielle höhere Expression der Gene für verschiedene Cysteinpeptidasen, Transmembrankinasen, Rho-GTPasen, Lipasen und AIG 1 Proteine in den Trophozoiten entdeckt, die aus dem Maus-Colon reisoliert wurden. Gene für zwei verschiedene Gal/GalNAc Lektine hingegen waren differentiell niedriger exprimiert.

In allen aufgeführten Studien wurde die *Microarray*-Technologie genutzt, um differentielle Unterschiede der Genexpression von *E. histolytica* zu identifizieren. Auch wenn diese Methode ermöglicht, mit einer kleinen Probenmenge mehrere tausend Einzelnachweise durchzuführen, stehen mittlerweile neuere Technologien zur Verfügung. So zeichnet sich die Technologie der mRNA-Sequenzierung (mRNA-Seq) durch mehrere Vorteile gegenüber der *Microarray* Technologie aus. Die mRNA-Seq erfordert keine Spezies- oder Transkriptspezifischen Proben, wodurch neue Transkripte und Splicevarianten detektiert werden können, die von einem *Microarray* nicht erfasst werden können. In diversen vergleichenden Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die mRNA-Seq eine deutlich höhere Spezifität und Sensibilität hat als die *Microarray*-Technologie (Hurd und Nelson, 2009; Zhao *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015; Sîrbu *et al.*, 2012). Zudem ermöglicht diese Technologie eine viel weitere, dynamische Bandbreite, was die Detektion von mehr differentiell exprimierten Genen mit einem höheren *Fold Change* ermöglicht.

## 1.4 Zielsetzung

Die invasive Form der Amöbiasis kann im humanen Wirt zur Ausbildung von Amöbenleberabszessen führen. Der für die Virulenzentstehung relevante Mechanismus konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden, da die bereits bekannten Pathogenitätsfaktoren sowohl in pathogenen als auch in apathogenen *Entamoeba* Spezies und *E. histolytica* Isolaten nachgewiesen worden sind. Für diese Arbeit stehen *E. histolytica* Klone zur Verfügung welche aus

den HM-1:IMSS abstammenden Zelllinien A und B generiert wurden. Die aus der Zelllinie A erzeugten Klone wurden für apathogen befunden, da 7 Tage nach Infektion von *Meriones unguiculatus* keine Amöbenleberabszesse mehr detektiert werden konnten. Die aus der Zelllinie B generierten Klone, weisen hingegen eine überraschend große Diversität in ihren Pathogenitätseigenschaften auf. Auf Grund ihres identischen genetischen Hintergrundes und der Tatsache, dass es sich um homogene Zellpopulationen handelt, stellen die klonalen Linien ein robustes Instrument dar, um den Ursprung der Pathogenität von *E. histolytica* aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* durch einen direkten Vergleich ausgewählter Klone identifiziert werden. Dazu sollten der apathogene Klon A1 und der hoch-pathogene Klon B2 hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Pathogenitätseigenschaften wie folgt untersucht werden:

1. Zeitverlauf der Amöbenleberabszessentstehung in zwei unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Tiermodellen der Amöbiasis.
2. Vergleichende Transkriptom-Analysen zur Identifizierung neuer putativer Pathogenitätsfaktoren durch:
  - A. Bestimmung der Transkriptomprofile von *in vitro* kultivierten Trophozoiten.
  - B. Etablierung eines Protokolls zur Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber für eine Transkriptomanalyse *ex vivo*.
  - C. Analyse von Wirtsfaktoren in der frühen Phase der Amöbenleberabszessbildung *in vivo*.
3. Etablierung einer nicht-invasiven Methode zur Visualisierung von *E. histolytica* Trophozoiten *in vivo* zur Analyse der Motilität des Parasiten.

## 2. Material

### 2.1 Geräte und Software

In den folgenden Tabellen befinden sich Aufstellungen der verwendeten Geräte (Tabelle 2.1) und Software (Tabelle 2.2). Geräte des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgeführt.

**Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte**

Gerätename	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer System	Agilent Technologies
BD FACS Aria™III	BD Biosciences
BioPhotometer 6131	Eppendorf
ClinScan 7 T MRT	Bruker
Illumina HiSeq™ Sequencing System	Illumina
Illumina MiSeq™ Sequencing System	Illumina
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Qubit® 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Rotor-Gene 3000	Corbett Life Science

**Tabelle 2.2: Verwendete Software**

Software	Hersteller
Agilent 2100 Expert Software	Agilent Technologies
Prism® (Version 6.0)	GraphPad
FACSDiva™ (Version 6.1.3)	BD Biosciences
FlowJo 7.6.3	Treestar
OsiriX DICOM Viewer (Open-Source Version 3.7.1 32-bit)	<a href="http://www.osirix-viewer.com">www.osirix-viewer.com</a>
Rotor-Gene real time Analysis 6.0	Corbett Life Science

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2.3 befindet sich die Aufstellung zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien. Verbrauchsmaterialien des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgeführt.

**Tabelle 2.3: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Anaerocult® A	Merck Millipore
Anaerotest®	Merck Millipore
BD MICRO-FINE+ Insulinspritzen, Nadelstärke 0,30 mm	Becton Dickinson
Corbett Cups 0,1 mL	LTF-Labortechnik
Falcon® 5 mL Polypropylene Rundboden Tube mit Deckel (FACS-Messröhrchen, - Auffangröhrchen)	Becton Dickinson
Falcon® Zellsieb, 100 µm, gelb	Becton Dickinson
MACS® Separation Columns LS	Milteny Biotec
Multiwell-Platte, 6-Well	Greiner bio-one
UVette®	Eppendorf
Zellkulturflaschen 40 ml, 70 ml, 300 ml	Becton Dickinson

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysis* bestellt. Bezugsquellen für Chemikalien waren vorwiegend die Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Ausnahmen der Bezugsquellen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

**Tabelle 2.4: Ausnahmen der Bezugsquellen für Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
Ascorbinsäure	VWR International GmbH
<i>Diamond Vitamin Tween 80 Solution(40x)</i>	JRH Biosciences
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Hefeextrakt und Trypticase Pepton	Becton Dickinson
Isofluran Forene 100% (v/v)	Abbot GmbH & Co. KG
L-Cystein	USBiological Life Sciences
Paraformaldehyd, 20%, EM-Qualität	Science Services
Rinderserum	PAA Laboratories GmbH
RNAlater® Solution	Ambion, Life technologies
TRIzol®	Ambion, Life technologies

## 2.4 Enzyme und Enzyminhibitoren

In Tabelle 2.5 sind die verwendeten Enzyme und Enzyminhibitoren aufgeführt.

**Tabelle 2.5: Verwendete Enzyme und Enzyminhibitoren**

Enzyme/ Enzyminhibitoren	Hersteller
RNase free DNase Set	Qiagen
RNase Out	Invitrogen, Life technologies
RNasin Plus RNase Inhibitor	Promega
SuperScriptIII First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Life technologies
TURBO DNA-free™ Kit	Ambion, Life technologies

## 2.5 Reaktionskits

In Tabelle 2.6 befindet sich die Aufstellung zu den verwendeten Reaktionskits.

**Tabelle 2.6: Verwendete Reaktionskits**

Reaktionskit	Hersteller
AGENCOURT® RNAClean® XP	Beckmann Coulter
AGENCOURT® AMPure® PCR Purification Kit	Beckmann Coulter
Agilent HS DNA Kit	Agilent Technologies
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies
Low Input Library Prep Kit	TAKARA, Clontech
Maxima®First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
<i>mirVana</i> ™ miRNA Isolation Kit	Ambion, Life technologies
MinElute® PCR Purification Kit	Qiagen
MiSeq Reagent Kit v3	Illumina
Qubit® DNA HS Kit	Life technologies
Qubit® RNA HS Kit	Life technologies
RealMasterMix SYBR ROX	5 Prime
RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit	Ambion, Life technologies
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
RNeasy® MinElute® Cleanup Kit	Qiagen
Ribo-Zero™ Magnetic Gold Kit (Human/Mouse/Rat)	Epicentre, Illumina
RiboGone™-Mammalian-Low Input Ribosomal RNA Removal Kit (Human/Mouse/Rat)	TAKARA, Clontech
ScriptSeq™v2 RNA-Seq Library Preparation Kit	Epicentre, Illumina
SMARTer® Universal Low Input RNA Kit for Sequencing	TAKARA, Clontech

## 2.6 Immunreagenzien

In Tabelle 2.7 befindet sich die Aufstellung zu den verwendeten Immunreagenzien.

**Tabelle 2.7: Verwendete Immunreagenzien**

Immunreagenzien	Hersteller
Pre-Immunsereum (Kaninchen)	BNITM
$\alpha$ -EhLectin (Kaninchen)	BNITM
$\alpha$ -Kaninchen-IgG ALEXA Fluor® 594 (H+L), Ziege	Invitrogen, Life technologies
$\alpha$ -Kaninchen-IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec

## 2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins synthetisiert. Die Konzentration der Stocklösungen nach Aufnahme in TE-Puffer betrug 100  $\mu$ M. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 5 pmol/ $\mu$ l eingesetzt. In Tabelle 2.8 befindet sich eine Aufstellung der verwendeten Oligonukleotide.

**Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide**

Gen <sup>1</sup>	Gen-ID	Oligonukleotid-Sequenz (5')	Oligonukleotid-Sequenz (3')
<i>actin</i>	EHI_142730	AAGCTGCATCAAGCAGTGAA	GGAATGATGGTTGGAAGAGG
<i>EhCP-A1</i>	EHI_074180	TGCATCATCTGTTCAATTCC	CAACACCATATCCAACAGCA
<i>EhCP-A2</i>	EHI_033710	ATCCAAGCACCAGAATCAGT	TTCTTCAAGAGCTGCAAGT
<i>EhC2-2</i>	EHI_118130	CCAGGTTATCCTCAACAACC	GTTGAGCTGGTACTCCTGGT
<i>EhC2-3</i>	EHI_015290	AACAACAACCAGGTGCTTAGC	TCCTCCTTGTTGGTGGATAGC
<i>EhC2-5</i>	EHI_059860	AAGTGGTTGATACTTGTTAGG	GGAGCACCAACTGTTAAGC
<i>EhRab7D</i>	EHI_082070	GCAGGAAGACCAGCATTATT	GGTTATTGACGTATCGGTTG
<i>EhRab7E</i>	EHI_169280	CCGTGGTAGTGATTGTTGTC	AACATTAGCACCATTGAGGAA
<i>EhRab7G</i>	EHI_187090	CTCACGAGCACTCAATGGAA	TTCTTCACACCATTGACGA
<i>EhMP8-2</i>	EHI_042870	ATTGCTGTCATTCTGTGTG	TCACGAACCTCTCTGCTTG
<i>CAAX prenyl protease</i>	EHI_075660	GGAAATGCATTCTTTTCAGGA	TGTTTACAATGTCCAACCTCATGT
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_074080	GGTTATCCACCACAACCAAT	CCATAGGACCTGACATTCCTC
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_075690	TGCTAGATCAGCTGAAGGAA	AATTGCACCAGCAACAATAA
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_086690	AACAAGCTGCTGATGACG	AGATATGCTTCAGCTTCTGC
<i>EhC2-DIL1 hypothetical protein</i>	EHI_169670	CATTCAACCAGCAATTGAAGT	TGATGATTCAAGTTATCCGACT
<i>EhC2-DIL2 hypothetical protein</i>	EHI_014170	GCAGATCTTAATGGTGCTTCAA	CTACCACCAGCCTCACCAAG
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_121820	ATTGAATTGTGCTGCTCGTC	TCACCAATTCCAATAGTTCCTT
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_013240	CATGTTCTGGAGACCCAACA	CAAATTGATCAACTGGCATATC

<i>Phosphoserine aminotransferase</i>	EHI_026360	CTTGTTGCAGATATGTCTTCTG	TTGTGCACCTGCATAGATTA
<i>Protein phosphatase domain-containing protein</i>	EHI_075640	TTCTGATGATACTCCAACACC	GCAATACATTGTCCTTCTGC
<i>Casein kinase II regulatory subunit family protein</i>	EHI_075700	TGATAATCCAGGTATGGAACC	TCTTGAAGCGAATTGTTGTG
<i>Replication factor C subunit 4</i>	EHI_086540	GGTCAACCAGGAATTGGTAA	CAGAAGCATTCAAGTCCAGA
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_127670	AGAGAGCTACTCAACATGG	CATATTCATCACACTCTTCC
<i>Tyrosine kinase</i>	EHI_178610	TTGCCTCGTTACAGAATATG	TAGCTGCGTCAATGACTAAT
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_121820	ATTGAATTGTGCTGCTCGTC	TCACCAATTCCAATAGTTCCTT
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_111330	GCACAACGAGGAGTTGC	TACAATCACACGTCTTAACG
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_165190	TCTTATTCAACGCCAGTTA	AGCTTCAACATCAATCCAGT
<i>20 kDa antigen</i>	EHI_056490	ATGAGAGCACGTATGGTAGG	ATGAAGAAGGTCCACAACC
<i>Actobindin</i>	EHI_039020	GATAGATCTGCACCAGTTATTGC	GCTTGAATATCAGCAAGAAGAGC
<i>Hypothetical protein</i>	EHI_144490	TATGCTTACATTCTGCGATG	TAAATACCATGGTGGGGTTA
<i>Methionine gamma-lyase</i>	EHI_144610	ACATGCTTATCCAATCTTCC	CCAAGTCTAGAGTAGATATGACC

<sup>†</sup> = Gen übernommen von NCBI

## 2.8 Puffer und Medien

Die Puffer wurden mit Aqua bidest. angesetzt und zur Sterilisation autoklaviert (20 Minuten bei 121°C und 1,2 bar) oder steril filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 5 M NaOH oder 5 M HCL.

NaPBS (1x), pH 6,8:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,3 mM
NaCl	140 mM

FACS-Puffer:

1x NaPBS	990 ml
1% FCS	10 ml

TY-I-SS Medium (Diamond *et al.*, 1978), pH 6,8:

Trypticase	100 g
Hefeextrakt	50 g
Glucose	50 g
NaCl	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
L-Cystein	5 g
Ascorbinsäure	1 g
Fe(III)-Ammoniumcitrat	0,114 g

Die Bestandteile des TY-I-SS-Mediums wurden in 4350 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Zum Autoklavieren des inkompletten Mediums wurde ein Dampfkochtopf genutzt, in dem dieses bei einem Druck von 1,4 bar für 30 Minuten auf 120°C erhitzt wurde. Durch die Zugabe von 50 ml inaktiviertem Rinderserum, welches zweimal 30 Minuten bei 56°C inaktiviert wurde, 15 ml *Diamond Vitamin Tween 80 Solution*, 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin wurden vor Gebrauch jeweils 400 ml Medium komplettiert und anschließend steril filtriert.

## **2.9 Organismen**

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen werden im Folgenden näher beschrieben. Alle Versuchstiere wurden entsprechend den Anweisungen des Leitfadens für die Pflege und Verwendung von Labortieren in einer Pathogen-freien Umgebung gehalten und gepflegt. Alle Arbeiten wurden von der Regierung für Wissenschaft und Gesundheit (Hamburg) genehmigt (145/13, 41/11). Für die Erlaubnis der Durchführung der Versuchstierexperimente wurde das Felasa B Zertifikat erworben.

### **2.9.1 *Entamoeba histolytica***

Systematik von *Entamoeba histolytica*

Domäne: Eukaryota

Stamm: Amoebozoa

Klasse: Entamoebidea

Gattung: *Entamoeba*

Art: *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)

**HM-1:IMSS:** Pathogener Stamm, isoliert 1964 aus einem Patienten mit Kolitis. Heutzutage existieren verschiedene, in Kultur gehaltene Subtypen. Bezugsquelle: ATCC, Katalog-Nummer 30459.

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

**HM-1:IMSS Klon A1-A12:** Generiert aus Zelllinie A (Dissertation Matthiesen, 2012).

**HM-1:IMSS Zelllinie B:** Syngenisches zu Zelllinie A. Besitzt eine hohe Pathogenität im Tiermodell (*Meriones unguiculatus*, C57BL/6 Maus). Zelllinie B wurde seit ihrer Isolierung durchgängig in axenischer, mikroaerophiler Kultur ohne Wirtspassage gehalten, was ihre Pathogenität nicht beeinflusst hat. Im Folgenden wird dieses Isolat immer als Zelllinie B bezeichnet.

**HM-1:IMSS Klon B1-B12:** Generiert aus Zelllinie B (Dissertation Matthiesen, 2012).

In dieser Arbeit wurden ausschließlich mit dem aus Zelllinie A generiertem Klon A1 und mit dem aus Zelllinie B generiertem Klon B2 gearbeitet.

## **2.9.2 *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, 1758), Hausmaus

Mäuse des Stammes C57BL/6 sind Wildtypmäuse, welche durch Inzucht geno- und phänotypisch einheitlich wurden. Sie wurden als Modellorganismus für die Amöbenleberabszessbildung verwendet. Dabei wurden nur männliche Tiere im Alter von 10 bis 12 Wochen genutzt. Die Tiere wurden aus der Hauszucht des BNITM bezogen.

### **2.9.3 *Meriones unguiculatus***

Systematik von *Meriones unguiculatus*

Stamm: Chordata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Rodentia

Überfamilie: Muroidea

Familie: Muridae

Unterfamilie: Gerbillinae

Gattung: *Meriones*

Art: *Meriones unguiculatus* (MILNE EDWARDS, 1867), mongolische Wüstenrennmaus, Gerbil

Die mongolische Wüstenrennmaus wird ebenfalls als Modellorganismus für die Amöbenleberabszessbildung verwendet. Dabei wurden männliche als auch weibliche Tiere im Alter von 10 bis 12 Wochen genutzt. Die Tiere wurden von Janvier Labs bezogen.

### **3. Methoden**

Alle Arbeiten wurden in gentechnischen Laboren der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Für die Arbeiten mit RNA wurde RNase-freies HPLC-Wasser verwendet und die Laborausrüstung sowie alle Arbeitsflächen dekontaminiert, um ein RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten.

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 *Entamoeba histolytica***

###### **3.1.1.1 Kultivierung von *E. histolytica***

Die Trophozoiten der *E. histolytica* Klone A1 und B2 wurden in kompletten TY-I-SS Medium unter axenischen, mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C in 75 ml oder 250 ml Kulturflaschen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden sie in der logarithmischen Wachstumsphase auf die Bildung eines adhärennten Zellrasens untersucht. In einer auf die Wachstumsdichte angepassten Menge kompletten TY-I-SS Medium wurden die adhärennten Zellen durch Schütteln abgelöst und, entsprechend ihres Wachstums, 4 bis 10% der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischen kompletten TY-I-SS Medium aufgefüllt. Der Rest der Zellen wurde verworfen.

###### **3.1.1.2 Zellernte von *E. histolytica* Trophozoiten für die RNA-Isolierung**

Am Vortag wurden  $10^6$  Trophozoiten in eine 75 ml Kulturflasche eingesät und für 24 Stunden wie oben beschrieben inkubiert. Das Kulturmedium wurde nach 24 Stunden abgenommen und die Zellen in 5 ml kaltem 1x NaPBS durch kräftiges Schütteln abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4°C und 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Es wurde zweimal mit 1x NaPBS gewaschen und anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml 1x NaPBS in ein 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml TRIzol®-Reagenz aufgenommen. Die Isolierung der RNA erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben.

### 3.1.1.3 Aufbereitung von *E. histolytica* Trophozoiten für die Amöbenleberabszessinduktion

Die Trophozoiten wurden am Vortag in 250 ml Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium bis auf ca. 10 ml abgegossen und kurz auf Eis gelagert, damit sich die adhärent wachsenden Trophozoiten von der Oberfläche lösen. Nach zusätzlichem Schütteln wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt und bei 4°C und 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Residualvolumen resuspendiert. Die Zellzahl wurde wie mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Abszessinduktion wurde die Zellzahl in inkompletten TY-I-SS Medium wie folgt eingestellt:

- A.  $1,25 \times 10^5$  / 25 µl Trophozoiten für die ALA-Induktion in *Mus musculus*
- B.  $2 \times 10^5$  / 25 µl transgene Trophozoiten für die ALA-Induktion in *Mus musculus*
- C.  $2 \times 10^6$  / 50 µl Trophozoiten für die ALA-Induktion in *Meriones unguiculatus*

### 3.1.1.4 Induktion von Amöbenleberabszessen in *Mus musculus*

C57BL/6 Mäuse wurden vor der Injektion mit je 6,25 µL Cepetor (1 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH), 27 µl Ketanest (Ketamin Inresa, 50 mg/ml, Inresa Arzneimittel GmbH) und 66 µl sterilem 1x PBS durch intraperitoneale (i.p.) Applikation sediert. Sobald die Tiere in den Bereich der chirurgischen Toleranz gefallen sind, wurde die Bauchhöhle geöffnet und die vorbereitete Amöbensuspension in den linken, kaudalen Leberlappen injiziert. Nach Injektion wurde das Peritoneum vernäht und die Wunde mit Wundklammern fixiert. Zum Aufheben der Sedierung wurde den Mäusen 50 µl Antisedan® (5 mg/ml, ORION Pharma/JANSSEN Animal Health) intramuskulär (i.m.) injiziert (Lotter et al., 2006). Um eine Hypothermie zu verhindern, wurden die Tiere während des gesamten Eingriffs auf einer 37°C-Matte warmgehalten. Die Induktion der Amöbenleberabszesse erfolgt mit freundlicher Assistenz der Tierpflegerin Aline Adam (BNITM).

### 3.1.1.5 Induktion von Amöbenleberabszessen in *Meriones unguiculatus*

Mongolischen Wüstenrennmäusen wurden vor der Injektion zunächst gewogen, um die optimale Dosis der Injektionsnarkose zu ermitteln. Die Tiere wurden abhängig vom Gewicht mit je ca. 80 bis 100 µl einer Kombination aus 125 µl Ketavet® (Ketaminhydrochlorid, 100 mg/ml, Pfizer) und 25 µl Rompun™ Xylazine, 100 mg/ml, BAYER) durch i.m. Applikation sediert. Die Induktion des Amöbenleberabszesses erfolgte wie oben beschrieben.

### 3.1.1.6 Markierung von Trophozoiten mit Superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (SPIO)

Die Markierung der Trophozoiten erfolgte mit dem Kontrastmittel nano-screen MAG-PEG/P (Chemicell) mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 200 nm, ummantelt von einer 2000 Da Polyethylenglycol  $\alpha$ -,  $\omega$ -Diphosphat-Matrix, welche eine rote Fluoreszenz beinhaltet, wodurch die Partikel-Aufnahme in der Fluoreszenz-Mikroskopie quantifiziert werden kann (Exzitation 578 nm; Emission 613 nm).

Am Vortag ausgesäte Amöben wurden wie unter 3.1.1.1 beschrieben geerntet. Unter sterilen Bedingungen wurden  $1 \times 10^5$  Trophozoiten in 3 ml komplettem TY-I-SS Medium pro *Well* in eine 6-*Well*-Platte ausgesät. In jedes *Well* wurden 100 µg/ml SPIOs durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gegeben. Die Inkubation erfolgte für 18 Stunden bei 37°C in einem Anaerobiotopf zusammen mit einer Anaerocult® A-Platte (mit 35 ml H<sub>2</sub>O befeuchtet) und einem Anaerotest®-Teststreifen, welcher ein anaerobes Milieu durch einen Farbumschlag an der Indikatorstelle von blau nach weiß anzeigt. Nach Ablauf der 18 stündigen Inkubation wurde lichtmikroskopisch überprüft, ob die Trophozoiten die SPIO-Partikel internalisiert haben. Anschließend wurden die Trophozoiten auf die benötigte Zellzahl eingestellt und für die ALA-Induktion (siehe 3.1.1.4) oder für die Herstellung von Amöbenphantomen (siehe 3.1.1.7) eingesetzt.

### 3.1.1.7 Herstellung von Amöbenphantomen

Für die vergleichende *in vivo*- und *in vitro*-Darstellung von *E. histolytica* Trophozoiten des pathogenen Klons B2 nach SPIO-Markierung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) wurden Agarose-Zell-Phantome hergestellt. Dabei handelt es sich um SPIO-markierte Trophozoiten, die in Agarose eingebettet wurden.

Die SPIO-markierten Trophozoiten (siehe 3.1.1.6) wurden auf eine Zellzahl von 5000 Amöben/ml in NaPBS eingestellt und durch Zentrifugation (4°C, 1200 rpm, 5 Minuten) pelletiert.

Für die Herstellung der Agarose-Phantome wurden zunächst 3 ml 2%ige Agaroselösung in ein 15 ml Falcon gefüllt. Nach Auspolymerisierung, wurde das Amöben-Pellet in 500 µl warmer 0,5%iger Agaroselösung resuspendiert und vorsichtig über die ausgehärtete 2%ige Agarose geschichtet. Nachdem die Amöben-Agarosesuspension ausgehärtet ist, wurde eine weitere Schicht aus 5 ml 2%iger Agaroselösung aufgetragen. Nachdem diese komplett auspolymerisiert war, wurden die Amöbenphantome bis zur Analyse mittels MRT bei 4°C gelagert.

### 3.1.2 Magnetresonanztomographie

Für die Charakterisierung der Pathogenität der Klone A1 und B2 in zwei Tiermodellen der Amöbiasis, als auch für die *in vivo* und *in vitro* Visualisierung SPIO-markierter Trophozoiten wurde in dieser Arbeit die Magnetresonanztomographie (MRT), auch Kernspintomographie genannt, genutzt. Alle am MRT durchgeführten Arbeiten wurden in Kollaboration mit Herrn Dr. H. Ittrich und T. Ernst, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE), durchgeführt.

Die Magnetresonanztomographie ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem über hochfrequente elektromagnetische Strahlung die Atomkerne eines Individuums oder einer Probe angeregt werden. Im angeregten Zustand emittieren diese Atomkerne ein schwaches elektromagnetisches Signal. Dieses Signal enthält Informationen über die chemische Umgebung der einzelnen Kerne und kann bildgebend ausgewertet werden. Dabei wird sich bei einer MRT-Messung der Kernspin des Wasserstoff-Isotops zu Nutzen gemacht, da Wasserstoff zu einem hohen Anteil in biologischen Geweben vorhanden ist und durch magnetische Strahlung angeregt werden kann. Der Magnetresonanztomograph baut ein sehr starkes äußeres Magnetfeld auf, entlang dessen sich die Atomkerne ausrichten. Die Einstrahlung kurzer intensiver elektromagnetischer Impulse passender Frequenz auf das zu untersuchende Objekt führt dazu, dass die Wasserstoff-Atomkerne einen Teil der Energie aufnehmen und diese zeitversetzt wieder abgeben. Die dadurch entstandene elektromagnetische Welle wird von einer Empfängerspule gemessen und von einem Computer in ein visuelles Bild umgerechnet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit einem dedizierten Kleintiermagnetresonanztomographen (Bruker ClinScan 7 T, Bruker BioSpin) ausgeführt. Dieser arbeitet mit einer Flussdichte von 7 Tesla (T) und der Verwendung einer zirkular polarisierten Sende-Empfang-Volumenspule für Mäuse (*Mouse Body Coil*, 40 mm Resonatorlänge, 40 mm Innendurchmesser, Bruker BioSpin). Für die Analysen der mongolischen Wüstenrennmäuse wurde eine Ratten-Spule (*Rat Body Coil*, 80 mm Resonatorlänge, 80 mm Innendurchmesser, Bruker BioSpin) verwendet. Die Tiere werden während des gesamten Untersuchungszeitraums mit einem Gasgemisch aus 98% Sauerstoff und 1,5 bis 2,0% Isofluran

bei einem Gasfluss von 500 mL/Minute sediert. Um einer Hyperthermie vorzubeugen, lagern die sedierten Tiere während der Messung auf einer 37°C-Matte. Die Atemrate wird dabei dauerhaft überwacht, um für eine erfolgreiche Messung eine konstante Atmung von 30 bis 40 Atemzügen pro Minute zu gewährleisten. Eine optimale Messung findet diese in den Atempausen der Tiere statt.

Für die *in vitro* Untersuchungen der Amöbenphantome wurde die sogenannte 3-dimensionale Gradientenecho-Sequenz (3D GRE) verwendet. Für die *in vivo* Visualisierung SPIO-markierter Trophozoiten wurde die T2\* gewichtete GRE-Sequenz genutzt. Aufgrund der T2\*-Gewichtung können die durch eisenhaltige Nanopartikel resultierenden lokalen Störungen des Hauptmagnetfeldes als Signalauslöschung in den Aufnahmen sichtbar gemacht werden. Für die Untersuchungen der Amöbenleberabszesse wurde die sogenannte T2 gewichtete *Fast Spin Echo* Sequenz (FSE) genutzt. Die Parameter der verschiedenen Sequenzen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Für die Auswertung der Messdaten wurde der OsiriX Imaging Software DICOM Viewer genutzt. Mit Hilfe der Software ist die Bestimmung des Volumens der Zielregion (*Region of Interest*, ROI) möglich, wodurch Aussagen über die Größe der Amöbenleberabszesse getroffen werden können.

**Tabelle 3.1: Parameter der *in vitro* und *in vivo* MRT Sequenzen\***

	Sequenz	TR [ms]	TE [ms]	FoV [mm]	Schichten	Bild- punkte	Voxelgröße [ $\mu\text{m}^3$ ]	NSA	ETL	TA [min]
<i>in vitro</i>	3D GRE	45	7.50	31	36	256 × 256	121×121×120	4	1	37
<i>in vivo</i>	T2w FSE	≈ 2000**	51	32	17	256 × 256	125×125×600	4	14	≈ 6**
<i>in vivo</i>	T2*w GRE	≈ 2000**	6.39	32	24	256 × 256	125×125×400	1	1	≈ 10**

\* Abkürzungen: TR: Repetitionszeit, TE: Echozeit, FOV: *field of view*, ES: Echo-Abstand, NSA: Durchschnitt der Signal-Anzahl, ETL: Echozuglänge, TA: Aquisitionszeit

\*\* Atem-Trigger, TR und TA können aufgrund der individuellen Atmung variieren

### 3.1.3 Histologie und Immunhistochemie

Immunhistologische Untersuchungen werden angewandt, um antigene Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten mikroskopisch nachweisen zu können. Dafür werden spezifische

Antikörper genutzt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen oder partikulärem Material wie z.B. Goldpartikeln oder mit radioaktiven Isotopen markiert sind.

Nach intrahepatischer Infektion (24 Stunden) von C57BL/6 Mäusen mit SPIO-markierten Trophozoiten wurden den Tieren die Lebern entnommen, das Gewebe in 2%iger Formalinlösung fixiert und im Anschluss in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung wurden Gewebeschnitte (0,2 µm) angefertigt und zunächst mit Berliner-Blau gefolgt von einer *Nuclear-Fast-Red*-Gegenfärbung gefärbt. Dadurch stellen sich die SPIO-Partikel im Gewebe blau und die Zellkerne rot dar. Zur Detektion der Trophozoiten wurden die Leberschnitte mit einem Serumpool aus Amöben-spezifischen polyklonalen Antikörpern (Verdünnung 1:50.000) gefärbt. Die gebundenen Antikörper wurden mit dem ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Zytomed Systems GmbH) detektiert, wodurch es zu einer braunen Färbung der Trophozoiten kommt. Die Gegenfärbung mit Hämalan färbt die Immunzellen blau an.

Das Einbetten, schneiden und färben der Leberproben wurde freundlicherweise von Frau C. Marggraff (BNITM) übernommen.

### **3.1.4 Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber**

Für die Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber mussten verschiedene Methoden kombiniert, modifiziert und bereits bestehende Protokolle optimiert werden, um qualitativ hochwertige RNA für weiterführende Analysen zu gewinnen. Im Folgenden werden die eingesetzten zellbiologischen Methoden näher erläutert. Als Ausgangsmaterial wurden *in vitro* kultivierte Trophozoiten der Klone A1 und B2 (Ausgangsmenge ca.  $10^7$  Trophozoiten) eingesetzt sowie intrahepatisch infizierte Lebern aus *Meriones unguiculatus* 48 Stunden nach Infektion. Alle Arbeiten wurden jeweils mit drei biologischen Proben durchgeführt. Für den Erhalt einer biologischen Probe aus reisolierten Trophozoiten mussten nach der magnetischen Zellseparation (siehe 3.1.4.5) das Material aus 3 bis 5 Tieren zusammengeführt werden. Die *in vitro* kultivierten Trophozoiten wurden in allen Versuchsschritten als Kontrolle mitgeführt und den *ex vivo* reisolierten Trophozoiten gleichbehandelt. Im Folgenden werden sie daher nicht separat erwähnt.

#### **3.1.4.1 Separation von Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Die Isolierung von Trophozoiten und Leukozyten aus Lebergewebe erfolgte über eine OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation (Sigma-Aldrich). OptiPrep™ ist eine sterile und Endotoxin getestete Lösung aus 60% Iodixanol in H<sub>2</sub>O mit einer Dichte von 1.32 g/ml. Die OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation wurde auf die Separierung von Amöben mit dem Ziel möglichst intakte, viable Trophozoiten zu erhalten angepasst. Daher wurden abweichend von

gängigen Isolierungsprotokollen für verschiedene Zelltypen, alle Schritte bei 4°C durchgeführt. Alle eingesetzten Reagenzien wurden eiskalt verwendet und die Zentrifugationsstärken verringert.

Nach Leberentnahme wurden diese über einem 100 µm Zellsieb gemahlen und mit 40 ml eiskaltem, autoklaviertem und sterilfiltrierten 1x NaPBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 1400 rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Der trübe Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem Gemisch aus 5 ml 1x NaPBS und 2 ml OptiPrep™ resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und mit 1 ml NaPBS überschichtet. Durch Zentrifugation für 30 Minuten, bei 4°C und 1600 rpm und ohne Bremse erfolgte eine Zellfraktionierung. Dabei entstehen vier Phasen: die unterste, rot-braune Phase enthält die Erythrozyten, Hepatozyten und Granulozyten. Auf diese Phase folgt die trübe, rot-gräuliche OptiPrep™-Plasma-Phase. Dann folgt die weißliche Interphase, welche die Lymphozyten und die Trophozoiten enthält, gefolgt von der klaren NaPBS-Überschichtung.

Die weißliche Interphase wurde mit einer 5 ml Pipette abgenommen und in ein neues 15 ml Falcon überführt und auf 15 ml mit eiskaltem NaPBS aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde für 8 Minuten bei 4°C, 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 1 ml NaPBS aufgenommen.

#### **3.1.4.2 Fixierung von Trophozoiten**

Die nach der OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Zellsuspension aus Trophozoiten und Lymphozyten wurde im Anschluss fixiert um das Genexpressionsprofil zu konservieren.

Dafür wurde die Zellsuspension in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 4 Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer 1 mL Pipette abgenommen und das Zellpellet in 320 µl RNA*later* resuspendiert. RNA*later* ist ein Reagenz, welches die RNA sofort stabilisiert und so das Genexpressionsprofil konserviert. Es folgte eine 30-minütige Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 60 µl PFA (20%) mit 1:100 RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, N2615) hinzugefügt und für weitere 30 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Lyse der Trophozoiten in den nachfolgenden Schritten zu vermeiden. Die fixierte Fraktion aus Trophozoiten und Lymphozyten wurde für die im Folgenden beschriebene Amöben-spezifische Immunmarkierung eingesetzt.

### 3.1.4.3 Extrazelluläre Immunmarkierung von Trophozoiten

Die Immunmarkierung der Trophozoiten mit einem Amöben-spezifischen Primärantikörper dient der späteren Separation der Amöben von den Leberlymphozyten mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.1.3.4) oder magnetischer Zellseparation (siehe 3.1.3.5). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Für diese Studie stand ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper ( $\alpha$ -EhLectin), welcher an die Oberfläche der Trophozoiten bindet sowie das entsprechende Pre-Immuserum zur Verfügung (Biller *et al.* 2014). Die fixierte Zellsuspension (siehe 3.1.3.2) wurde bei 1400 rpm für 2,5 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Um die unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren wurde das Zellpellet in 500  $\mu$ l 2%iger FCS-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten im Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1400 rpm für 2,5 Minuten bei RT zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und dann folgten drei Waschschrte mit je 500  $\mu$ l 1x NaPBS. Das Zellpellet wurde dann in 100  $\mu$ l der entsprechenden Antikörperverdünnung unter Zugabe von RNasin Plus RNase Inhibitor (Verdünnung 1:25) für 60 Minuten bei RT im Schüttler inkubiert. Die eingesetzten Verdünnungen von  $\alpha$ -EhLectin und dem Pre-Immuserum sind in den Punkten 3.1.3.4 und 3.1.3.5 aufgeführt. Die mit dem Primärantikörper gefärbte Zellfraktion wurde nach Inkubation dreimal mit 1x NaPBS gewaschen und entweder für die Analysen mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.1.3.4) oder magnetischer Zellseparation (siehe 3.1.3.5) weiterverwendet.

### 3.1.4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (= FACS für *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung Zellen anhand von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen und Peptiden. Das Prinzip einer FACS-Analyse ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Als Ausgangsmaterial dient eine gefärbte Zellsuspension, bei der die Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Das dabei erzeugte Streu- und Fluoreszenzlicht wird separat detektiert. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflusszelle (*flow cell*), in welcher sie durch Laserlicht angeregt werden. Dabei werden die Lichtstreuung und das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore detektiert. Das von den Zellen gestreute Licht korreliert mit ihrer Größe und ihrer Komplexität. Granulozyten, die eine raue Oberfläche haben und im Zellinneren viele Vesikel besitzen, streuen deutlich mehr Licht als sehr glatte B- oder T-Zellen. Eine Unterscheidung nach Granularität und Größe der Zellen ist somit möglich. Das Vorwärtsstreulicht (FSC =

*Forward Scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist vom Zellvolumen abhängig. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) hingegen ermöglicht eine Unterscheidung der Zellen nach ihrer Granularität. Der SSC ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, welches von der Granularität der Zelle, der Größe und Strukturen ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Neben diesen beiden Parametern zur Differenzierung der Zellpopulationen, besteht unter anderem noch die Möglichkeit einer Phänotypisierung der verschiedenen Zellpopulationen anhand ihres unterschiedlichen Repertoires an Oberflächenmarkern (z.B. 170 kDA große Lectin der Amöben). Dabei werden spezifische, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper zur Markierung eingesetzt, die sich in den Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts der eingesetzten Fluorophore unterscheiden und somit Mehrfachfärbungen ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse genutzt, um zum einen die Spezifität der Amöben-spezifischen Färbung mit dem  $\alpha$ -EhLectin zu bestimmen und zur Separierung der gefärbten Trophozoiten von den Leberlymphozyten. Die Messungen und das Sortieren der Zellen wurden am FACSAria II (BD Biosciences) in Zusammenarbeit mit Frau C. Sander-Jülch (BNITM) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen FACSDiva™ und FlowJo.

Für die Bestimmung der Spezifität des  $\alpha$ -EhLectin Primärantikörpers wurden zunächst  $2 \times 10^6$  Trophozoiten des *E. histolytica* Klons B2 mit verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:1500, 1:10000) des  $\alpha$ -EhLectin und des Pre-Immuserums wie unter 3.1.3.3 beschrieben markiert. Als Fluoreszenz-gekoppelter Sekundär-Antikörper wurde ein  $\alpha$ -Kaninchen-IgG ALEXA Fluor® 594 Antikörper genutzt der an den Fc-Teil des  $\alpha$ -EhLectin bindet. Dieser wurden in einer 1:400 Verdünnung eingesetzt und die Zellen unter den gleichen Bedingungen wie bei der Immunmarkierung mit  $\alpha$ -EhLectin gefärbt. Die Zellen wurden nach der Färbung dreimal mit 1x NaPBS gewaschen, in 500  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Als Kontrollen, zur Festlegung der *Gating*-Strategie und zum Ausschluss von Kreuzreaktionen wurden naive murine Leberlymphozyten sowie nur mit dem Sekundär-Antikörper gefärbte Trophozoiten mitgeführt.

Für die Darstellung der Amöben wurden die Achsen des *DotPlots* (Punktediagramm) den Lasern FITC und PE-Texas-Red zugeordnet. Amöben stellen sich in dieser Darstellung als doppelt positive Zellpopulation im oberen rechten Quadranten dar, da sie aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz (FITC-Kanal) und ihrer Markierung mit dem  $\alpha$ -EhLectin bzw. der Fluoreszenz des Sekundär-Antikörpers (PE-Texas-Red-Kanal) in beiden Kanälen Licht emittieren. Das *Gate* wurde auf Grundlage der ungefärbten und nur mit dem Sekundär-Antikörper gefärbten Zellen gelegt, welche PE-Texas-Red negativ sind. Um im Folgenden die PE-Texas-Red positiven Zellen zu isolieren, wurde um diese ein weiteres *Gate* gesetzt und dann im Zell-Sorter ein Flüssigkeitsstrahl erzeugt, der in Einzeltropfen zerfällt (mit je

einer Zelle pro Tropfen) sobald er von einem Laserstrahl erfasst wird. Werden die zuvor festgelegten Sortierkriterien von den Zellen erfüllt, so wird jede einzelne Zelle elektrisch aufgeladen und mit Hilfe eines elektrischen Feldes abgelenkt und in einem mit 3 ml 1x NaPBS gefülltem Auffanggefäß gesammelt. Um die Sortiereinheit zu überprüfen, wurden im Anschluss die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **3.1.4.5 Magnetische Zellseparation von Trophozoiten aus Lymphozyten**

Die mit  $\alpha$ -EhLectin immunmarkierte Zellsuspension (3.1.4.3) wurde mittels magnetischer Zellseparation (MACS = *magnetic activated cell sorting*) einem Reinigungsschritt unterzogen, um die Trophozoiten von den Leberlymphozyten zu isolieren. Das MACS-System zur Trophozoiten-Aufreinigung beruht auf einem an *Microbeads* gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Antikörper, welcher an den Fc-Teil des  $\alpha$ -EhLectin bindet. Dies ermöglicht eine positive Selektion von Trophozoiten in einem Magnetfeld.

Für die MACS-Reinigung wurden die mit  $\alpha$ -EhLectin immunmarkierten Trophozoiten in Vorversuchen in drei verschiedenen Antikörper-Verdünnungen (1:10, 1:50, 1:100) eingesetzt. Die magnetische Markierung der Zellen mit dem  $\alpha$ -Kaninchen IgG Antikörper wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und im Anschluss wurden die Zellen zweimal über gekühlte LS Säulen gereinigt. Die positive Fraktion (Eluat) konnte dann für die RNA-Isolierung eingesetzt werden (siehe 3.2.1.3).

### **3.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1 Isolierung von RNA**

##### **3.2.1.1 Isolierung von RNA aus *E. histolytica* Trophozoiten mit TRIzol®**

Nach der Zellernte (siehe 3.1.1.2) wurde das aus Trophozoiten bestehende Sediment in 1 mL TRIzol® durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. TRIzol® ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, welche die Integrität der zu isolierenden RNA erhält, während Zellen und Zellbestandteile lysiert werden. Im Anschluss erfolgte Zugabe von 200  $\mu$ L eiskaltem Chloroform, welches durch Invertieren mit der Probe vermischt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2–3 min bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 12.000 rpm. Dieser Schritt führt zu einer Phasentrennung, so dass man eine chloroformhaltige Phase, in

der sich Proteine und DNA-Reste befinden, und eine darüberliegende wässrige, RNA-haltige Phase erhält. Diese wässrige RNA-Phase (ca. 500 µL) wurde abgenommen und die RNA durch die Zugabe von 500 µL Isopropanol gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70% EtOH und dem Trocknen des Sediments bei 56°C wurde die RNA in 100 µL RNase-freiem H<sub>2</sub>O durch stetiges Auf- und Abpipettieren aufgenommen.

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte eine zusätzliche Reinigung der RNA mit dem *RNeasy*<sup>®</sup>-*Mini-Kit* nach Herstellerangaben. Die in 100 µL H<sub>2</sub>O gelöste RNA wurde mit 350 µL RLT-Puffer und 250 µL 100 % EtOH gemischt, auf die Säule gegeben und mit 350 µL RW-1 Puffer gewaschen. Es folgte ein DNA Verdau auf der Säule mit dem *RNase-Free DNase Set* nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 25 µL HPLC-H<sub>2</sub>O eluiert und zur Erststrangsynthese (siehe 3.2.4) für die qPCR (siehe 3.2.5) genutzt.

### **3.2.1.2 Isolierung von Gesamt- und miRNA aus *E. histolytica* Trophozoiten und Lebergewebe mittels des *mirVana*<sup>™</sup> miRNA Isolation Kits (Ambion)**

Für die vergleichenden Transkriptom-Analysen der *E. histolytica*-Klone A1 und B2 (siehe 4.3.1), als auch für die Transkriptom-Analyse der unterschiedlich infizierten murinen Lebern (siehe 4.2.3) wurde das *mirVana*<sup>™</sup> miRNA Isolation Kit (Ambion) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Reaktionskit ermöglicht die parallele Isolierung von miRNA und Gesamt-RNA aus einer Probe. Obwohl für alle Proben beide RNA-Typen isoliert wurden, wurde die miRNA im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert und daher im Folgenden nicht weiter aufgeführt.

Die zu isolierenden Proben wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben zunächst in TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen. Das Lebergewebe wurde abweichend zu diesem Vorgang zunächst nur in 500 µl TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen, durch Zerstößeln homogenisiert und weitere 500 µl TRIzol<sup>®</sup> zugegeben. Der nach dem Zentrifugationsschritt abgenommenen wässrigen RNA-Phase wurde 1/3 Volumen 100%iges EtOH hinzugefügt, durch Invertieren mit der Probe vermischt und auf eine Säule aufgetragen. Diese wurde für 30 Sekunden bei 10.000 rpm und RT zentrifugiert. Die an die Säule gebundene Gesamt-RNA wurde zunächst einmal mit 700 µl *Wash Solution 1*, und dann zweimal mit 500 µl *Wash Solution 2/3* gewaschen. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde die RNA zweimal mit je 50 µl 37°C warmem RNase-freiem H<sub>2</sub>O nach einer Inkubation von 10 Minuten von der Säule eluiert. Die 100 µl Gesamt-RNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### 3.2.1.3 Isolierung von RNA aus fixierten Zellen mittels des *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion)

Die nach dem Protokoll der Reisolierung (siehe 3.1.4 ) erhaltenen fixierten Zellen wurden nach der MACS-Separierung 4 Minuten bei 1200 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Die Gesamt-RNA wurde aus dem Zellpellet mit Hilfe des *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion) nach Herstellerangaben isoliert, wobei ab dem Protease-Verdau in das Protokoll eingestiegen wurde. Dazu wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l *Digestion Buffer* und 4  $\mu$ l Protease resuspendiert, erst für 15 Minuten bei 50°C und dann für 15 Minuten bei 80°C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurden die Zelllysate bei -20°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut und 240  $\mu$ l *Isolation Additive* und 550  $\mu$ l EtOH hinzugefügt. Bevor die Proben auf eine Säule aufgetragen wurden, erfolgte eine Vermischung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Die Säule wurde für 30 Sekunden bei 10.000 rpm und RT zentrifugiert und die gebundene Gesamt-RNA zunächst einmal mit 700  $\mu$ l *Wash 1*, und dann zweimal mit 500  $\mu$ l *Wash 2/3* gewaschen. Anschließend wurde auf der Säule ein DNA-Verdau durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei RT folgten wie wiederholt die drei Waschschriffe mit *Wash 1-3*. Die RNA wurde mit 60  $\mu$ l RNase-freiem H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch Messung des Absorbtionspektrums zwischen 230 nm und 280 nm mithilfe des BioPhotometers oder des NanoDrops. Das Absorptionsmaximum von RNA befindet sich bei 260 nm, wodurch unter Berücksichtigung folgender Faktoren die Konzentration bestimmt werden kann (OD = optische Dichte):

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{l/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bei der photometrischen Messung wird der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren über den Quotienten aus A<sub>260</sub>/280 sowie A<sub>260</sub>/230 bestimmt. Für reine RNA gilt A<sub>260</sub>/280  $\geq$  2,0. Ist der gemessene Wert kleiner 2,0, deutet dies auf Verunreinigungen durch Proteine, Phenole oder andere Kontaminanten hin, deren Absorptionsmaximum ungefähr bei einer Wellenlänge von 280 nm liegen.

Mit allen Proben die für Transkriptom-Analysen mittels mRNA-Sequenzierung eingesetzt wurden wurde zusätzlich noch eine Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit®

3.0 Fluorometer durchgeführt. Im Gegensatz zu photometrischen Messungen misst das Qubit® Fluorometer durch aktive Bindung eines Farbstoffes nur funktionale RNA, wodurch in der Regel geringere Konzentrationswerte als bei photometrischen Messungen hervorgehen. Für die Messung am Qubit® Fluorometer wurde der Qubit® RNA HS Assay verwendet. Die Durchführung wurde nach Angaben des Herstellers realisiert. Dafür wurde ein Master-Mix aus  $X \times 1 \mu\text{l}$  Qubit RNA HS *Reagent* und  $X \times 200 \mu\text{l}$  Qubit RNA HS *Buffer* vorbereitet. Das Volumen des Master-Mix wurde für zwei Standards und  $X$  Proben ausgelegt. Für die Kalibrierung wurden  $190 \mu\text{l}$  Master-Mix mit  $10 \mu\text{l}$  Standard 1 und  $190 \mu\text{l}$  Master-Mix mit  $10 \mu\text{l}$  Standard 2 in speziellen Qubit® Reaktionsgefäßen vermengt. Abhängig von der zu erwartenden Konzentration wurden  $1 \mu\text{l} - 20 \mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe mit entsprechend  $180 \mu\text{l} - 199 \mu\text{l}$  Master-Mix gemischt. Die Proben wurden für 2 Minuten bei RT inkubiert und die Kalibrierung und Messung exakt nach Herstellerangaben am Qubit® 3.0 Fluorometer durchgeführt.

### 3.2.3 Überprüfung der RNA-Integrität

Eine gute Quantität und Qualität der RNA sind entscheidend für die Präzision bei Expressionsmessungen. In dieser Arbeit wurde die Integrität der isolierten Gesamt-RNA mit dem *Agilent RNA 6000 Pico Kit* am Bioanalyzer überprüft und dabei strikt nach Angaben des Herstellers verfahren.

Diese Technik basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese im Chipformat, welche eine automatisierte, parallele Bestimmung von 12 RNA-Proben hinsichtlich ihrer Größe und Konzentration ermöglicht. Alle zu analysierenden Proben wurden vor der Messung auf eine Konzentration von ca.  $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$  eingestellt und bei  $70^\circ\text{C}$  für 2 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Proben und ein mitgeführter Standard in die entsprechenden Vertiefungen des Chips pipettiert. Beim Start der Messung bewegen sich die Proben über in Glas eingezätzte Mikrokapillaren im elektrischen Feld fort, werden automatisch in eine Trennkapillare weitergeleitet und dort entsprechend ihrer Fragmentgröße durch den Molekularsiebeffekt mithilfe eines Polymers aufgetrennt. Ein Fluoreszenzdetektor registriert dann die RNA-Fragmente und die Laufzeit. Aus diesen Daten werden Elektropherogramme und Gel-ähnliche Bilder generiert. Zudem wird von der Software ein Zahlenwert von 1 bis 10, die sogenannte *RNA Integrity Numbre* (RIN), erstellt, welche eine Einstufung der RNA-Qualität darstellt. Dabei definiert der Maximalwert von 10 vollständig intakte RNA und ein RIN-Wert von 1 vollständig degradierte RNA definiert.

### 3.2.4 Erststrangsynthese (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese aus isolierter Gesamt-RNA wurde das *SuperScriptIII-First-Strand-Synthesis System-Kit* (Invitrogen) verwendet. Um aus der Gesamt-RNA selektiv die mRNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein Oligo(dT)-Primer (Invitrogen) genutzt, welcher spezifisch mit dem 3'-Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA hybridisiert. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz (20 µl) eingesetzt:

RNA	1 µg
Synthesepuffer (5x)	4 µL
DTT (0,1 mM)	2 µL
dNTPs (10 mM)	2 µL
Oligo (dT7-I)-Primer	1 µL
SuperScript III	1 µL
<i>RNase out</i>	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.4 µL
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 42 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert. Die gewonnene cDNA wurde für die qPCR-Analyse (siehe 3.2.4) verwendet.

Für die cDNA-Synthese von RNA aus fixiertem Probenmaterial wurde das *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Fermentas) genutzt, da nicht alle RNA-Fragmente einen 3'-Poly-A-Schwanz aufweisen und deshalb der Einsatz von Random Hexamer Primern erforderlich ist. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz (20 µl) eingesetzt:

RNA	0,1 µg
Reaktionspuffer (5x)	4 µL
Enzym-Mix	2 µL
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 50°C und 5 Minuten bei 85°C inkubiert und bei -20°C gelagert. Bis zu ihrem Einsatz in der qPCR (siehe 3.2.4) wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.2.5 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Die Methode der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) ermöglicht die quantitative Analyse des Expressionslevels ausgewählter Gene. In dieser Arbeit wurde das Konzept der relativen Quantifizierung genutzt, bei dem die Stärke der Expression eines Zielgens (*gene of interest*, GOI) in Relation zu einem Referenzgen (*normalizer gene*), welches zumeist ein sogenanntes *housekeeping gene* ist, gemessen wird. Das Referenzgen muss unter verschiedenen Versuchsbedingungen konstant exprimiert werden, da es als Standard dient, um Schwankungen in der cDNA-Ausgangsmenge auszugleichen. In dieser Arbeit wurde  $\beta$ -*actin* als Referenzgen genutzt, da es sich in vorhergehenden Studien als stabil exprimiert erwies (Biller *et al.*, 2010; Irmer *et al.*, 2009; Bruchhaus *et al.*, 2002).

Ermöglicht wird Detektion der PCR-Produkte in Echtzeit nach jedem Zyklus durch die Messung der Fluoreszenz eines doppelsträngigen DNA interkalierenden Reporterfarbstoffes wie z.B. des in dieser Arbeit verwendete SYBR® *Green*. SYBR® *Green* I ist ein Cyanin-Farbstoff welcher im Komplex mit DNA bei Anregung durch einen Laser ein Signal bei 522 nm emittiert. Die gemessene Fluoreszenz steigt proportional zur Menge der amplifizierten Produkte. Nach Abschluss der Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um eventuell entstandene Primer-Dimere oder unspezifische Produkte zu identifizieren und die Probe von der Analyse auszuschließen.

Über die Bestimmung des Zyklus, bei dem der Schwellenwert (*threshold of cycle*, CT) überschritten wird, kann die Expression des Zielgens quantifiziert werden. Dabei handelt es sich um den Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet. Er befindet sich immer in der exponentiellen Amplifikationsphase. Umso weniger Amplifikationszyklen zum Erreichen des CT benötigt werden, desto mehr cDNA-Kopien des Zielgens sind im Ausgangsmaterial vorhanden.

Bei Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode wird zunächst die Differenz ( $\Delta$ ) der  $C_T$ -Werte des Zielgens zum Normalisierungsgen ermittelt:

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

Im Anschluss wird der erhaltene  $\Delta C_T$ -Wert ins Verhältnis zu einer als Kalibrator dienenden Kontrollprobe gesetzt:

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

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

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

Für den Reaktionsansatz (20 µl) wurde das *RealMasterMix SYBR Rox Kit (5 Prime)* nach Herstellerangaben verwendet:

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

Zum Ausschluss einer Kontamination der Reagenzien wurde eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle mitgeführt. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren der Ansätze zu minimieren wurde jede qPCR-Reaktion mindestens im Doppelansatz durchgeführt und die Werte anschließend gemittelt. Die Durchführung erfolgte in einer *Corbett Research Rotor-Gene 3000* in 0,1 ml Reaktionsgefäßen. Es wurde folgendes *Cycler*programm verwendet:

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

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

### 3.2.6 mRNA-Sequenzierung

Die mRNA-Sequenzierung (mRNA-Seq) ist eine Methode, die auf der Sequenzierung der nächsten Generation (*next-generation-sequencing*, NGS) basiert. Sie wurde in dieser Arbeit

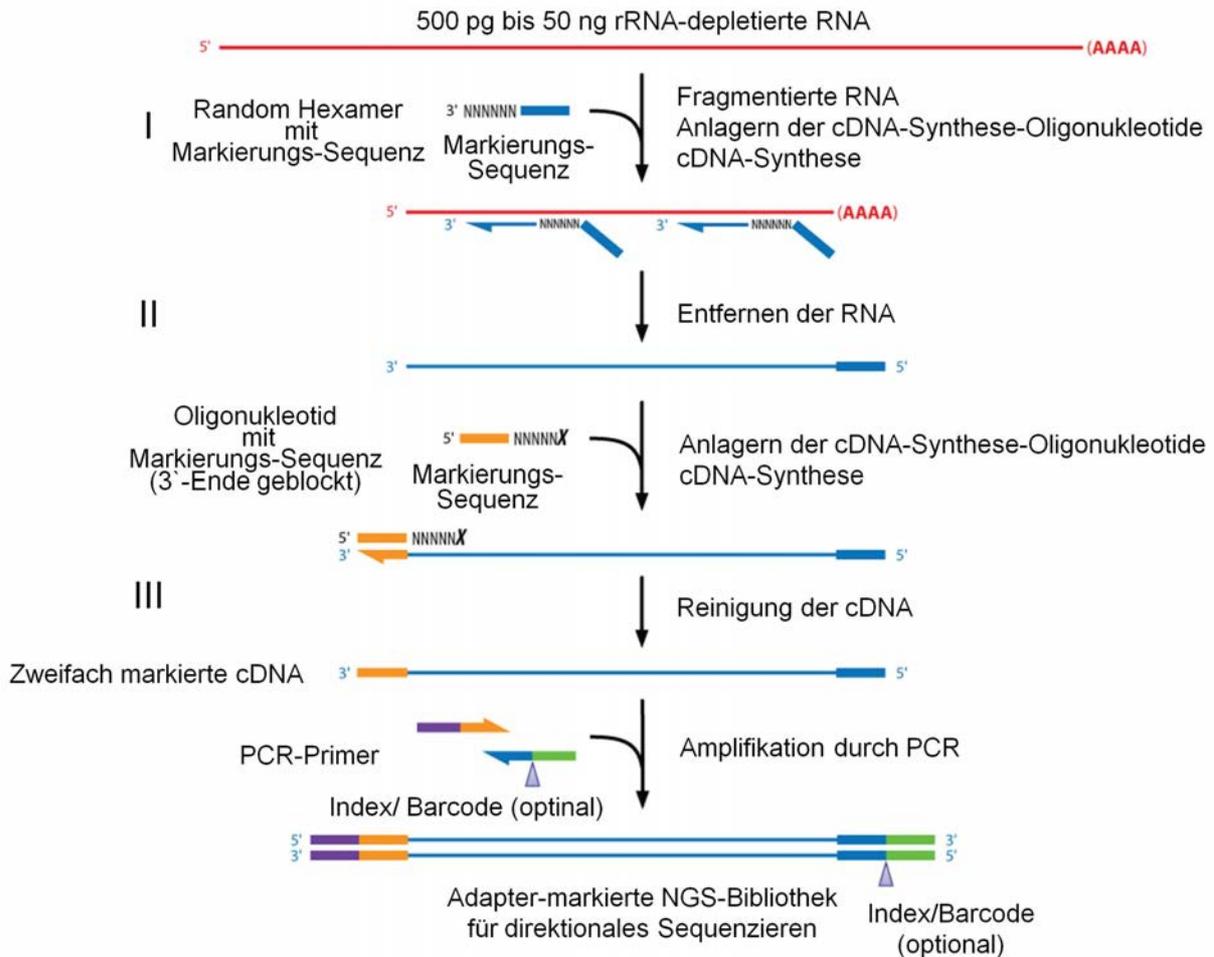
für verschiedene Transkriptom-Analysen genutzt, die über die Erstellung von Genexpressionsprofilen Aufschluss über den physiologischen Zustand einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt liefern. Alle zu analysierenden RNA-Proben wurden vor der Erstellung der NGS-Bibliotheken hinsichtlich ihrer Quantität und Integrität überprüft (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Abhängig von der Qualität der Ausgangs-RNA wurden dafür zwei unterschiedliche Verfahren für die Erstellung der NGS-Bibliotheken verwendet, die im Folgenden näher erläutert werden. Dabei wurde, sofern nicht anders erwähnt, immer exakt nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

### 3.2.6.1 Herstellung von NGS-Bibliotheken aus Gesamt-RNA nativer Zellen

Für die vergleichenden Transkriptom-Analysen der *in vitro* kultivierten *E. histolytica*-Klone A1 und B2 (siehe 4.2.1) und muriner Lebern nach intrahepatischer Infektion mit den Klonen A1 und B2 während der frühen Phase der Amöbenleberabszessbildung (siehe 4.2.3) wurde die RNA wie in 3.2.1.2 beschrieben isoliert. Nach Überprüfung der Quantität und Integrität der RNA-Proben erfolgte ein DNase-Verdau mithilfe des TURBO DNA-free® Kit (Ambion), um möglicherweise vorhandene kontaminierende DNA aus den Proben zu entfernen. Im Anschluss folgte eine rRNA-Depletion unter Verwendung von AGENCOURT®RNACleanXP Beads (Beckman Coulter) und dem Ribo-Zero™ Magnetic Gold Kit (Human/Mouse/Rat) (Epicenter). Dadurch wurden ca. 99 % der zytoplasmatischen (28S, 18S, 5.8S, 5S) rRNA und ca. 99% der mitochondrialen (12S, 16S) rRNA entfernt, um bei der späteren Sequenzierung deren Detektion zu reduzieren. Die rRNA-depletierten Proben wurden im nächsten Schritt mit dem RNeasy® MinElute® Cleanup Kit (Qiagen) gereinigt und die Quantität und Integrität mithilfe des Nanodrops und Bioanalyzers überprüft. Das relative rRNA-Level der 18S rRNA sollte dabei unter 5% liegen, um mit den Proben weiterarbeiten zu können.

Die prozessierte RNA konnte dann für die Erstellung einer NGS-Bibliothek eingesetzt werden (Abbildung 3.1). Dafür wurde in dieser Arbeit das ScriptSeq™v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicenter) verwendet. Dabei werden die RNA-Proben zunächst fragmentiert und über die Anlagerung von Random Hexameren, die mit einer 5'-Markierungs-Sequenz versehen sind, erfolgt dann die cDNA-Synthese (I). Nach Entfernung der RNA (II) wird die cDNA im nächsten Schritt mit Oligonukleotiden, die eine Markierungssequenz mit einem geblockten 3'-Ende besitzen, inkubiert. Die jetzt zweifach markierte cDNA wird nach Reinigung (III) über Oligonukleotide mit einer Adapter-Sequenz mittels PCR amplifiziert. In diesem Schritt können die Proben mit verschiedenen Indices (Barcodes) versehen werden, um eine spätere gemeinsame Analyse (Multiplexing) der Proben in einem mRNA-Seq-Lauf zu ermöglichen. Die erstelle

NGS-Bibliothek wurde dann mit dem AGENCOURT® AMPure® PCR Purification Kit (Beckmann Coulter) gereinigt und die Quantität und Qualität der DNA-Fragmente kontrolliert. Dafür wurden das Agilent HS DNA Kit (Agilent) und das Qubit DNA HS Kit (Life Technologies) verwendet.



**Abbildung 3.1: Herstellung einer NGS-Bibliothek mithilfe des ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit.**

Die rRNA-depletierten RNA-Proben werden fragmentiert und dann wird durch das Anlagern von cDNA-Synthese-Oligonukleotiden mit einer 5'-Markierungssequenz die cDNA synthetisiert (I). Die RNA wird entfernt (II), und die cDNA mit Oligonukleotiden mit einer 3'-Markierungssequenz inkubiert. Nach der Reinigung der zweifach markierten cDNA (III) wird die NGS-Bibliothek über Amplifikation durch PCR erstellt, wobei ein Barcode optional hinzugefügt werden kann. Die erstellte Adapter-markierte NGS-Bibliothek kann nun für ein direktionales Sequenzieren verwendet werden (verändert nach Pease und Sooknana, 2012).

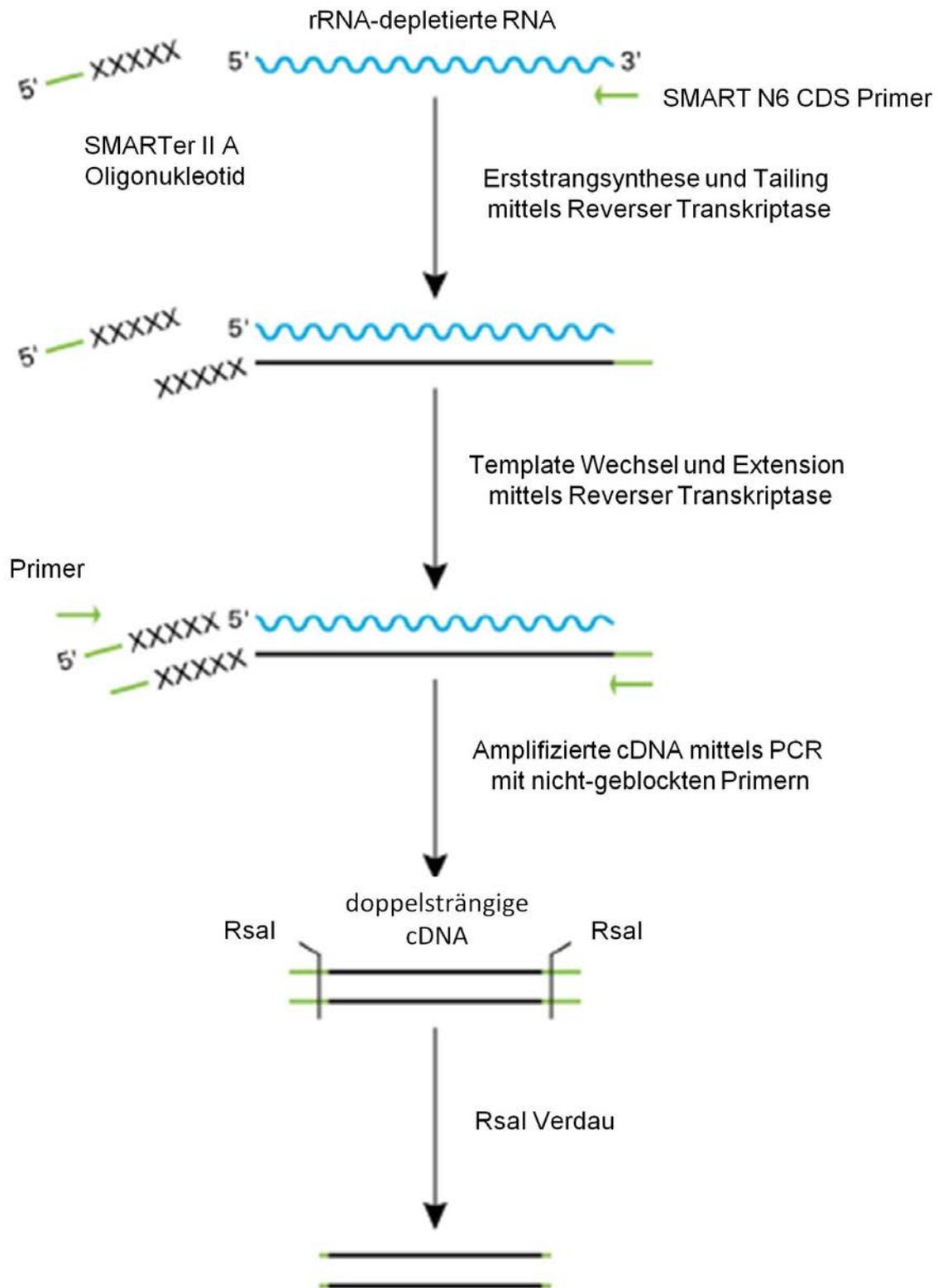
Die erstellten NGS-Bibliotheken waren dann einsatzbereit für die Cluster-Amplifikation und Sequenzierung über die Illumina Plattformen. Die Sequenzierung der *in vitro* kultivierten Trophozoiten der Klone A1 und B2 wurde mit freundlicher Unterstützung der

AG Horstmann (BNITM) am *Illumina MiSeq*® unter Verwendung des *MiSeq Reagent Kit v3* durchgeführt. Die Sequenzierung des intrahepatisch infizierten Lebergewebes wurde im *Centre for Genomic Research* (Liverpool, UK) unter Verwendung des *Illumina HiSeq*® Sequencing Systems durchgeführt.

### 3.2.6.2 Herstellung von NGS-Bibliotheken aus Gesamt-RNA fixierter Zellen

Für die RNA-Proben, die aus fixiertem Zellmaterial isoliert worden sind (siehe 3.1.4 und 3.2.1.3), musste aufgrund der geringen Mengen und der geringen Qualität der RNA ein anderes Verfahren zur Herstellung von NGS-Bibliotheken genutzt werden. Darum wurden hier verschiedene Reaktionskits der Firma Takara, Clontech verwendet, welche alle speziell für die Herstellung von NGS-Bibliotheken aus fixierten und daher fragmentiertem Ausgangsmaterial und für den Einsatz geringer Mengen konzipiert sind.

Die rRNA-Depletion erfolgte mithilfe des *RiboGone™-Mammalian-Low Input Ribosomal RNA Removal Kit* (Human/Mouse/Rat). Die *RiboGone* Technologie basiert auf einer Hybridisierung der rRNA an magnetische *Beads* (*AGENCOURT® AMPure® PCR Purification Kit*, Beckman Coulter) gekoppelt mit einem RNase H-Verdau, der 5S, 5.8S, 18S und 28S rRNA sowie 12S mtRNA depletiert. Im nächsten Schritt wurden die rRNA-depletierten RNA-Proben direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt. Hierfür wurde das *SMARTer® Universal Low Input RNA Kit for Sequencing* verwendet (Abbildung 3.2). Dabei wird der sogenannte *SMART N6 CDS Primer* (N = A, G, T oder C) für die Erststrangsynthese eingesetzt, bei der die *SMARTScribe* Reverse Transkriptase einen komplementären DNA-Strang produziert. Sobald Reverse Transkriptase das 5'-Ende der RNA erreicht, fügt sie aufgrund ihrer terminalen Transferase Aktivität wenige zusätzliche Nukleotide an das 3'-Ende der cDNA an. Im nächsten Schritt kommt es zu einem Strangwechsel und einer Extension des Templates. Dabei erzeugen die *SMARTer* Oligonukleotid Basenpaare ein erweitertes Template, welches es der Reversen Transkriptase ermöglicht mit der Replikation bis zum Ende des Oligonukleotids fortzufahren. Dann erfolgt die Amplifikation der cDNA über eine PCR. Im letzten Schritt werden die Adapter der amplifizierten cDNA über einen *RsaI* Verdau entfernt.



**Abbildung 3.2 SMARTer Technologie für die cDNA Synthese aus degradierten RNA-Proben** ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)).

Depletierte rRNA-Proben werden für die Erststrangsynthese unter Verwendung der SMART N6 Technologie eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wird mittels PCR amplifiziert und die Adapter über einen RsaI Verdau entfernt. Die pre-amplifizierte cDNA kann dann für die Herstellung einer NGS-Bibliothek genutzt werden.

Die Qualität der vorliegenden, pre-amplifizierten cDNA wurde am Bioanalyzer mit dem *Agilent HS DNA Kit* (Agilent) überprüft und im nächsten Schritt mit dem *Low Input Library Prep Kit* weiter bearbeitet. Dabei wurde die pre-amplifizierte cDNA-Bibliothek erneut amplifiziert und mit verschiedenen Indices (Barcodes) versehen, um eine spätere gemeinsame Analyse (Multiplexing) der Proben in einem mRNA-Seq-Lauf zu ermöglichen. Die erstellte NGS-Bibliothek wurde dann mit dem *AGENCOURT® AMPure® PCR Purification Kit* (Beckmann Coulter) gereinigt und die Quantität und Qualität der DNA-Fragmente kontrolliert. Dafür wurden das *Agilent HS DNA Kit* (Agilent) und das *Qubit DNA HS Kit* (Life Technologies) verwendet. Die erstellten NGS-Bibliotheken waren dann einsatzbereit für Cluster-Amplifikation und Sequenzierung über die Illumina Plattformen.

### **3.3 *In silico* Methoden**

#### **3.3.1 Sequenzanalyse**

Die bioinformatische Auswertung der mRNA-Sequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. Stephan Lorenzen (BNITM) durchgeführt.

#### **3.3.2 Gendatenbanken**

Die für die Auswertung der Transkriptom-Analysen benötigte Bestimmung der *Gene Ontology*-Termini (GO) erfolgte über die Internetseiten <http://www.amoebadb.org> und <http://www.informatics.jax.org>.

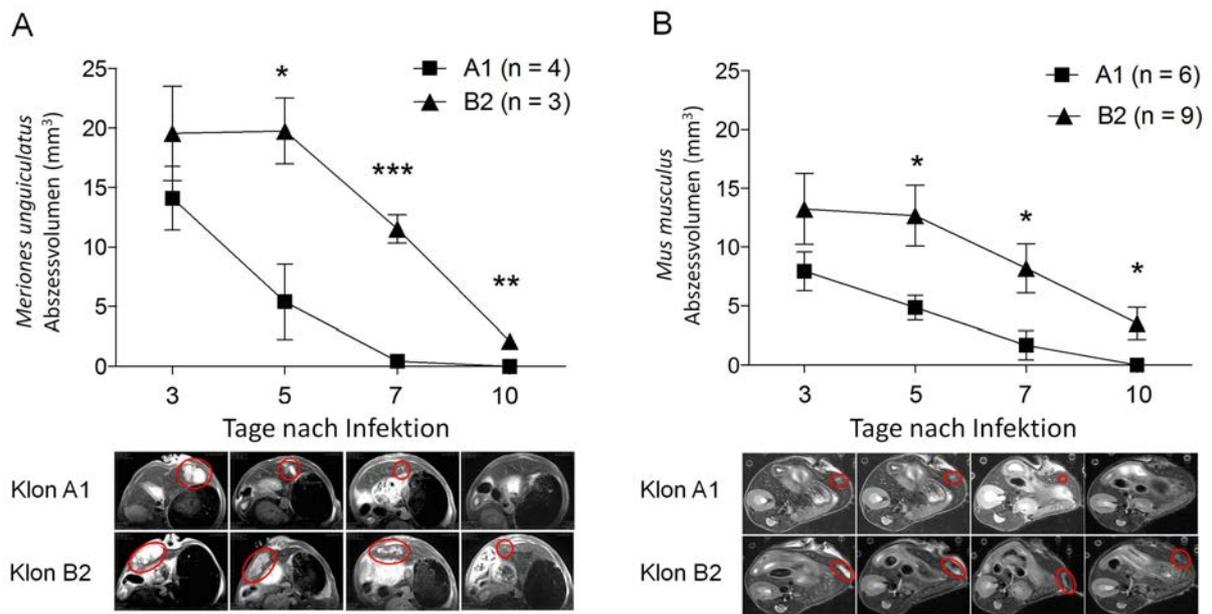
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Pathogenität der *E. histolytica* Klone A1 und B2 in zwei Tiermodellen der Amöbiasis

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die beiden syngenen *E. histolytica* Klone A1 und B2 weiterführend charakterisiert werden. In ersten Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass diese sich hinsichtlich verschiedener Parameter, wie z.B. ihrer Cysteinpeptidase Aktivität *in vitro* als auch *in vivo* unterscheiden (Matthiesen *et al.*, 2013). Der Klon A1 ist aus der apathogenen Zelllinie A, und der Klon B2 aus der pathogenen Zelllinie B hervorgegangen. Beide Zelllinien stammen wiederum von dem *E. histolytica* Isolat HM-1:IMSS ab und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten von der *American Type Culture Collection* (ATCC Nummer 30459) bezogen. So wird die Zelllinie B seit 1991 am BNITM axenisch kultiviert, wohingegen die Zelllinie A erst 2001 im Rahmen der Genomanalyse des HM-1:IMSS-Isolats (Loftus *et al.*, 2005) ans BNITM gelangte.

Die Pathogenität der Klone A1 und B2 wurde im zeitlichen Verlauf der Infektion in zwei unterschiedlichen Tiermodellen der Amöbiasis *in vivo* mittels Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht. Dazu wurden entweder  $1,25 \times 10^5$  axenisch kultivierte Trophozoiten der Klone A1 oder B2 in immunkompetente C57BL/6 Mäuse oder die 16fache Dosis ( $2 \times 10^6$  Trophozoiten) in mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) intrahepatisch injiziert. Anschließend wurde die Fähigkeit zur Entwicklung von Amöbenleberabszessen (ALA) beider *E. histolytica* Klone an den Tagen 3, 5, 7 und 10 untersucht. Dabei ermöglicht die MRT-Technologie eine longitudinale Untersuchung einzelner Individuen über einen längeren Zeitraum. Die Ermittlung der Abszessvolumina erfolgte über die Bestimmung des ROI (*Region of Interest*) Die Abszessstrukturen definieren sich durch hyperintense Gewebeeränderungen in der T2 gewichteten FSE-Sequenz im infizierten linken lateralen Leberlappen. Die Daten zur Abszessbildung im C57BL/6-Mausmodell wurden freundlicherweise von Mareen Zaruba und PD Dr. H. Lotter (BNITM) zur Verfügung gestellt.

Die Daten beider Tiermodelle zeigen übereinstimmend, dass der Klon B2 zu allen untersuchten Zeitpunkten größere Leberläsionen verursacht als der Klon A1, ab Tag 5 nach Infektion ist dieser Unterschied signifikant (Abb. 4.1 A: Tag 5 = \*p = 0,0224; Tag 7 = \*\*\*p = 0,0001; Tag 10 = \*\*p = 0,0059; Abb. 4.1 B: Tag 5 = \* p = 0,0334; Tag 7 = \*p = 0,0355; Tag 10 = \*p = 0,0569). Grundsätzlich können an Tag 3 nach Infektion mit beiden *E. histolytica* Klonen die größten Abszessvolumina detektiert werden, diese werden über den untersuchten Zeitraum stetig kleiner und sind sowohl im C57BL/6-Mausmodell als auch im *Meriones unguiculatus*-Modell an Tag 10 nach Infektion mit dem Klon A1 nicht mehr nachweisbar.



**Abbildung 4.1: Verlauf der Amöbenleberabszessformation hervorgerufen durch die intrahepatische Infektion mit *E. histolytica*-Klonen unterschiedlicher Pathogenität.**

Mongolischen Wüstenrennmäusen wurden je  $2 \times 10^6$  Trophozoiten der Klone A1 und B2 intrahepatisch injiziert (**A**), immunkompetente C57BL/6-Mäuse erhielten je  $1,25 \times 10^5$  Trophozoiten des jeweiligen Klons (**B**). In beiden Tiermodellen erfolgte die Messung der Abszessgrößen an den Tagen 3, 5, 7 und 10 nach Infektion mittels MRT. Dargestellt sind die Mittelwerte der Abszessgrößen  $\pm$  Standardfehler nach Bestimmung des ROI-Volumens, sowie eine exemplarische Darstellung der MR-Bildgebung in der T2 gewichteten FSE-Sequenz. Die als hyperintense Bereiche sichtbaren Abszessstrukturen im linken lateralen Leberlappen sind mit einer roten Markierung hervorgehoben. Nach Infektion mit dem pathogenen Klon B2 sind in beiden Amöbiasis-Tiermodellen ab Tag 5 signifikant größere Abszesse im Vergleich zu denen von Klon A1 hervorgerufenen Läsionen feststellbar. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels *unpaired-t*-Test (\*\**padj*  $\leq 0,001$ ; \*\**padj*  $\leq 0,01$ ; \**padj*  $\leq 0,05$ ).

Demnach weisen die *E. histolytica* Klone A1 und B2 in beiden Amöbiasis-Tiermodellen unterschiedliche Fähigkeiten zur ALA-Induktion auf. Obwohl der Klon A1 in der Lage ist eine Abszessbildung hervorzurufen, ist diese im Vergleich zu der Pathogenität von Klon B2 deutlich geringer ausgeprägt. Deshalb wird analog zu den Zelllinien A und B, von denen beide Klone abstammen, der Klon A1 im Folgenden als apathogen und der Klon B2 als pathogen definiert.

## 4.2 Vergleichende Transkriptom-Analysen

### 4.2.1 Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Sequenzierung der *E. histolytica* Klone A1 und B2

Zur Identifikation möglicher Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* sollten die Genexpressionen der beiden sich in ihrer Pathogenität unterscheidenden *E. histolytica* Klone miteinander verglichen werden. Die Bestimmung der Transkriptome axenisch kultivierter Trophozoiten des apathogenen Klons A1 und des pathogenen Klons B2 erfolgte mittels mRNA-Sequenzierung (mRNA-Seq). Um statistisch aussagekräftige Daten zu erhalten, wurde der Versuch mit drei biologischen Replikaten der jeweiligen Klone durchgeführt. Alle Zellernten erfolgten in der logarithmischen Wachstumsphase, die Gesamt-RNA wurde aus den Trophozoiten isoliert und ihre Integrität mit Hilfe des Bioanalyzers überprüft. Da Quantität und Qualität des Ausgangsmaterials entscheidend für die Präzision der mRNA-Seq sind, konnte dadurch sichergestellt werden, dass es sich bei der isolierten Gesamt-RNA um intaktes, nicht degradiertes, hochwertiges Ausgangsmaterial handelt.

Die Transkriptom-Analyse ergab, dass von insgesamt 8386 gefundenen Gensequenzen 142 als signifikant differentiell exprimiert angesehen werden können ( $p_{adj} \leq 0,05$ ). Zur weiteren Eingrenzung der Anzahl differentiell exprimierter Pathogenitätsfaktoren wurde der *Fold Change* auf  $\geq 3$  gesetzt, so dass eine Liste von insgesamt 76 Kandidatengenen erstellt werden konnte. Von diesen 76 Genen zeigen 46 Gene eine höhere Expression in dem Klon A1 und 30 Gene eine höhere Expression in dem Klon B2. 54 dieser differentiell exprimierten Gene konnte putative biologische Funktionen der entsprechenden Proteine wie z.B. eine Beteiligung an der Stressantwort, dem Proteintransport, am Metabolismus oder eine Enzymaktivität zugeordnet werden, wohingegen die übrigen 22 Gene für Proteine unbekannter Funktion kodieren (Tabellen 4.1 und 4.2).

Bei einem Großteil der als differentiell zwischen den beiden *E. histolytica* Klonen identifizierten Gene liegt der *Fold Change* zwischen 3 und 4. Im Vergleich zu dem pathogenen Klon B2 wurden im apathogenen Klon A1 die höchsten *Fold Change*-Werte von 25 bis 200 für Gene gefunden, die C2-Domänen-Proteine (EHI\_015290, EHI\_059860, EHI\_118130), GTPasen der Rab-Familie (EHI\_082070, EHI\_169280, EHI\_187090) die Zelloberflächen-Protease gp63 (EHI\_042870) und ein hypothetisches Protein (EHI\_074080) kodieren (Tabelle 4.1).

In dem Klon B2 sind fünf hypothetische Proteine kodierende Gene (EHI\_127670, EHI\_144490, EHI\_169670, EHI\_050490, EHI\_062080) mit einem *Fold Change* von 20 bis 200 höher exprimiert als in dem Klon A1 (Tabelle 4.2).

Das Expressionsprofil der in dem Klon A1 höher exprimierten Gene (Abb. 4.2) zeigt für 21 der insgesamt 46 identifizierten Gene hoch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den

Expressionsniveaus der in B2 exprimierten Gene (\*\*padj ≤ 0,001). Von diesen weisen 11 Gene ein sehr hohes Expressionslevel von >1000 auf, wohingegen die übrigen 10 hoch signifikanten Gene stark in der Höhe ihres Expressionsniveaus variieren (Expressionslevel ca. 80 – 1000).

Das Expressionsprofil der in dem Klon B2 höher exprimierten Gene (Abb. 4.3) zeigt für 20 der insgesamt 30 identifizierten Gene hoch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Expressionsniveaus der in A1 exprimierten Gene (\*\*padj ≤ 0,001). Von diesen 20 differentiellen Genen weisen 8 Gene eine sehr deutliche Expression auf (Expressionslevel > 1000), wohingegen die übrigen 12 hoch signifikanten Gene stark in der Höhe ihres Expressionsniveaus variieren (Expressionslevel ca. 25 – 1000).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse liegt der Fokus auf den Genen, die exklusiv in dem pathogenen Klon B2 in höheren Mengen gefunden werden konnten, da sie als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* in Betracht gezogen werden können. Interessanterweise wurden dabei hauptsächlich hypothetische Proteine identifiziert, deren putative Funktionen größtenteils mit verschiedenen enzymatischen Aktivitäten in Verbindung gebracht werden oder noch unbekannt sind, während bei dem apathogenen Klon A1 die am höchsten differentiell exprimierten Gene hauptsächlich für GTPasen kodieren und am Proteintransport beteiligt sind.

**Tabelle 4.1: Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene des apathogenen Klons A1 mit einem padj ≤ 0,05 und einem Fold Change (FC) von ≥ 3,0 im Vergleich zum pathogenen Klon B2.**

	Gen <sup>1</sup>	Gen-ID	Expressionslevel		FC	Putative biologische Funktion
			Klon A1	Klon B2		
1	<i>C2 domain protein (EhC2-3)</i>	EHI_015290	5475,48	24.50	223.47	Transport
2	<i>cell surface protease gp63 (EhMP8-2)</i>	EHI_042870	1097.95	7.36	149.12	Zelladhäsion
3	<i>Rab family GTPase (EhRab7D)</i>	EHI_082070	732.36	7.75	94.48	Transport
4	<i>C2 domain containing protein (EhC2-5)</i>	EHI_059860	884.90	11.47	77.14	Transport
5	<i>C2 domain containing protein (EhC2-2)</i>	EHI_118130	1213.30	20.11	60.31	Transport
6	<i>Rab family GTPase (EhRab7E)</i>	EHI_169280	287.26	5.67	50.61	Transport
7	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_074080	281.71	8.54	32.95	unbekannt
8	<i>Rab family GTPase (EhRab7G)</i>	EHI_187090	197.41	7.75	25.44	Transport
9	<i>Chaperone clpB</i>	EHI_155060	20.53	2.76	7.42	ATPase Aktivität
10	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_005657	71.28	10.09	7.06	unbekannt
11	<i>EF-hand calcium-binding domain containing protein</i>	EHI_151890	110.74	17.13	6.46	Calciumionen Bindung

Ergebnisse

12	<i>Phosphoserine aminotransferase (EhPSAT)</i>	EHI_026360	1270.94	215.46	5.89	L-Serin biosynthetischer Prozess
13	<i>CAAX prenyl protease (EhCAAX)</i>	EHI_075660	297.80	50.93	5.84	Peptidase Aktivität
14	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_097480	483.02	84.95	5.68	unbekannt
15	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_075690	986.11	178.99	5.50	unbekannt
16	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_137080	2264.50	437.89	5.17	unbekannt
17	<i>Protein phosphatase domain-containing protein</i>	EHI_075640	1006.21	197.65	5.09	Hydrolase Aktivität
18	<i>20 kDa antigen</i>	EHI_056490	2566.49	508.88	5.04	unbekannt
19	<i>Casein kinase II regulatory subunit family protein</i>	EHI_075700	181.71	36.77	4.94	Kinase Aktivität
20	<i>Rab family GTPase</i>	EHI_164900	1176.80	246.96	4.76	Transport
21	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_114950	127.48	27.119	4.70	AIG-GTPase
22	<i>Actobindin</i>	EHI_039020	2024.47	448.98	4.50	Actin Bindung
23	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_086690	3104.05	695.45	4.46	unbekannt
24	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_175930	111.07	24.95	4.45	unbekannt
25	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_086570	169.46	38.46	4.40	unbekannt
26	<i>Heat shock protein</i>	EHI_028920	78.94	18.05	4.37	Stressantwort
27	<i>Heat shock protein</i>	EHI_156560	76.06	17.79	4.27	Stressantwort
28	<i>AIG1 family protein</i>	EHI_126560	372.14	92.49	4.02	unbekannt
29	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_184500	257.72	64.63	3.98	Transport
30	<i>Cysteine synthase 2</i>	EHI_171750	140.38	35.85	3.91	unbekannt
31	<i>AIG1 family protein</i>	EHI_126550	225.41	57.93	3.89	AIG-GTPase
32	<i>Heat shock protein</i>	EHI_034710	89.31	23.34	3.82	Stressantwort
33	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>	EHI_006170	979.62	257.71	3.80	Ribosomen Bindung
34	<i>Splicing factor3B subunit 1</i>	EHI_085470	227.82	62.12	3.66	unbekannt
35	<i>Protein tyrosine kinase domain-containing protein</i>	EHI_148550	144.75	39.82	3.63	Kinase Aktivität
36	<i>Heat shock protein</i>	EHI_042860	88.88	25.36	3.50	Stressantwort
37	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_037550	134.83	38.51	3.50	unbekannt
38	<i>DNA mismatch repair protein Msh2</i>	EHI_123830	380.95	109.06	3.49	DNA/RNA Metabolismus
39	<i>Cysteine synthase A</i>	EHI_060340	625.57	179.63	3.48	L-Serin biosynthetischer Prozess
40	<i>Heat shock protein</i>	EHI_022620	100.01	29.34	3.40	Stressantwort
41	<i>Fructose-1,6-bisphosphate aldolase</i>	EHI_169470	12932.23	3978.28	3.25	Metabolismus
42	<i>3' exoribonuclease family protein</i>	EHI_086520	244.38	76.36	3.20	DNA/RNA Metabolismus

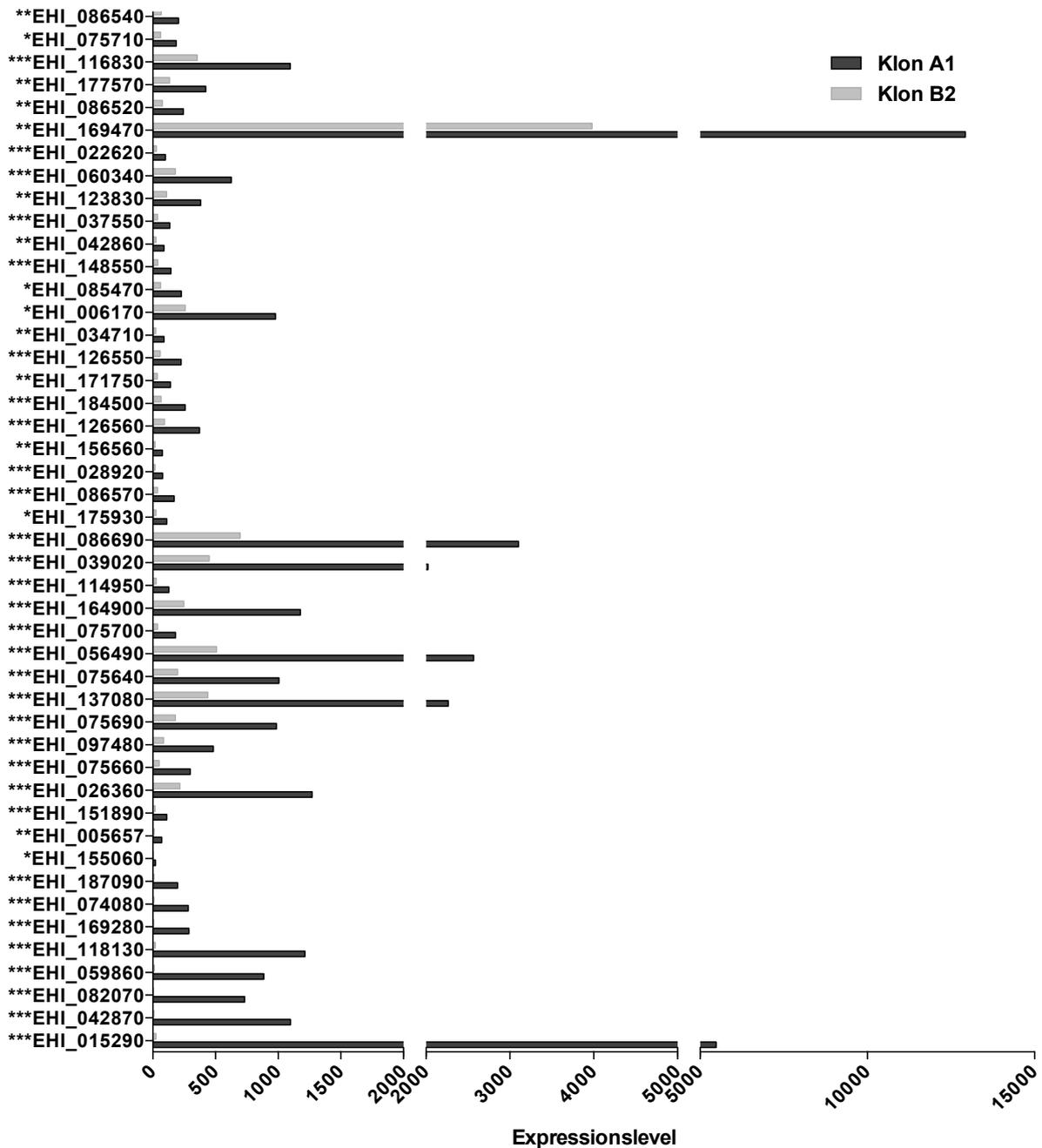
---

Ergebnisse

---

<b>43</b>	<i>RNA 3'-terminal phosphate cyclase</i>	EHI_177570	421.06	134.05	3.14	DNA/RNA Metabolismus
<b>44</b>	<i>D-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	EHI_116830	1096.68	353.71	3.10	L-Serin biosynthetischer Prozess
<b>45</b>	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_075710	187.29	60.76	3.08	unbekannt
<b>46</b>	<i>Replication factor C subunit 4</i>	EHI_086540	205.49	66.68	3.08	DNA/RNA Metabolismus

<sup>1</sup> = Gen übernommen von NCBI



**Abbildung 4.2: Expressionsprofil der Gene, die in dem apathogenen Klon A1 signifikant höher exprimiert sind als in dem pathogenen Klon B2.**

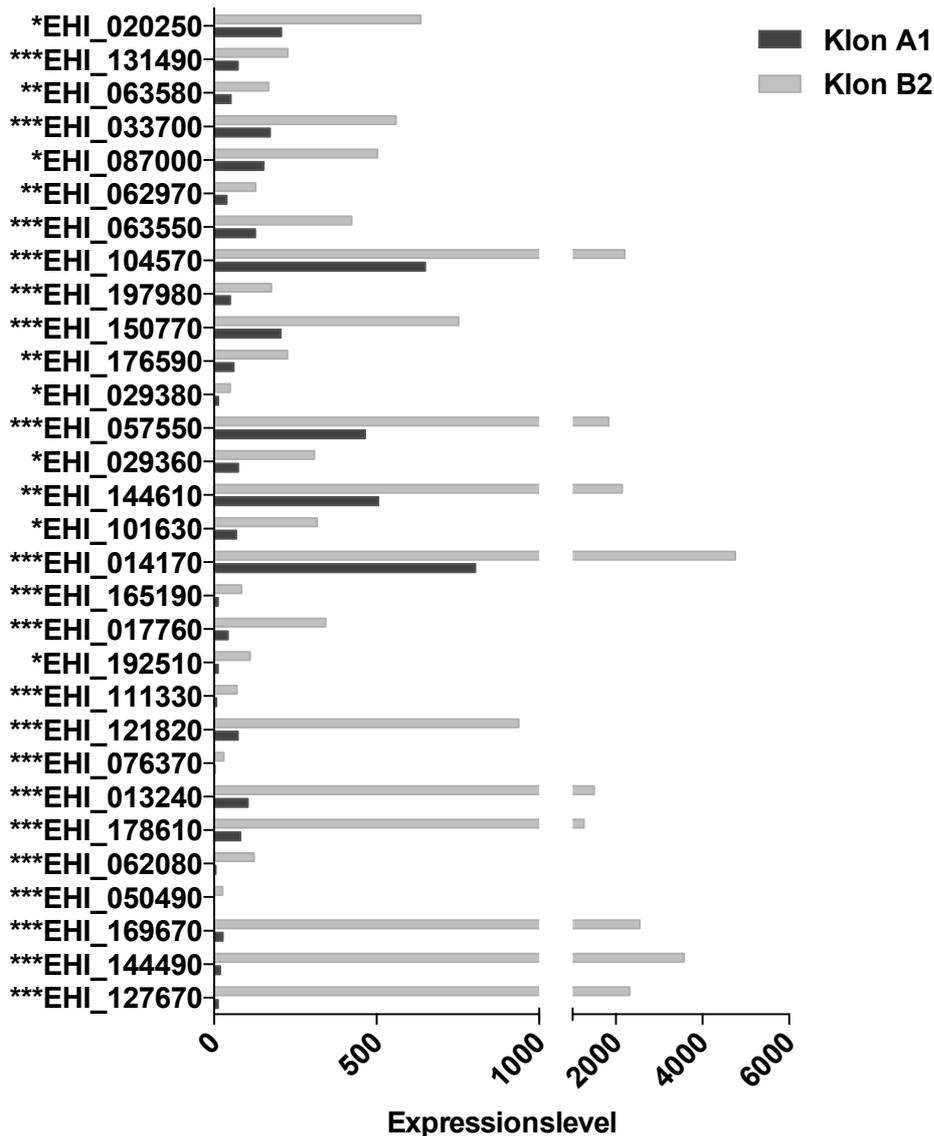
*In vitro* kultivierte Trophozoiten der *E. histolytica* Klone A1 und B2 wurden mittels mRNA-Seq analysiert. Dargestellt ist das relative Expressionslevel signifikant regulierter Gene. \*\*\*padj  $\leq$  0,001; \*\*padj  $\leq$  0,01; \*padj  $\leq$  0,05.

**Tabelle 4.2: Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene des pathogenen Klons B2 mit einem  $\text{padj} \leq 0,05$  und einem *Fold Change (FC)* von  $\geq 3,0$  im Vergleich zum apathogenen Klon A1.**

	Gen <sup>1</sup>	Gen-ID	Expressionslevel		FC	Putative biologische Funktion
			Klon B2	Klon A1		
1	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_127670	2314.73	12.01	192.59	unbekannt
2	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_144490	3579.49	19.75	181.19	GTP Bindung
3	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_169670	2551.64	27.28	93.5	Transport
4	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_050490	25.89	0.46	55.61	Kinase Aktivität
5	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_062080	123.01	5.33	23.04	ATPase Aktivität
6	<i>Tyrosine kinase</i>	EHI_178610	1265.3	81.56	15.51	Transport
7	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_013240	1500.57	104.17	14.4	AIG-GTPase
8	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_076370	29.83	2.31	12.86	Lyase Aktivität
9	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_121820	937.251	73.14	12.81	unbekannt
10	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_111330	70.77	7.35	9.62	Kinase Aktivität
11	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_192510	110.82	12.8	8.65	unbekannt
12	<i>Tyrosine kinase</i>	EHI_017760	343.35	43.45	7.9	Kinase-Aktivität
13	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_165190	84.71	12.04	7.03	DNA/RNA Metabolismus
14	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_014170	4757.56	803.79	5.91	unbekannt
15	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_101630	316.38	68.53	4.61	DNA/RNA Metabolismus
16	<i>Methionine gamma-lyase</i>	EHI_144610	2146.29	505.62	4.24	unbekannt
17	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_029360	308.73	74.75	4.13	AIG-GTPase
18	<i>Methionine gamma-lyase</i>	EHI_057550	1835.39	465.22	3.94	unbekannt
19	<i>Thioredoxin</i>	EHI_029380	49.86	12.94	3.85	unbekannt
20	<i>AIG1 family protein</i>	EHI_176590	226.19	60.29	3.75	unbekannt
21	<i>Heat shock protein 70</i>	EHI_150770	752.48	205.27	3.66	2-Alkenal Reduktase (NAD(P)) Aktivität
22	<i>Myb family DNA-binding protein</i>	EHI_197980	176.61	49.70	3.55	DNA Bindung
23	<i>Ubiquitin ligase.</i>	EHI_104570	2203.52	649.79	3.39	Ubiquitin-Ligase Aktivität
24	<i>Myb-like DNA-binding domain containing protein</i>	EHI_063550	423.11	126.66	3.34	DNA-Bindung
25	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_062970	128.26	38.68	3.31	unbekannt
26	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_087000	502.04	153.12	3.27	unbekannt
27	<i>RecF/RecN/SMC domain containing protein</i>	EHI_033700	560.27	172.86	3.24	ATP Bindung

28	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_063580	167.63	52.23	3.20	Metabolismus
29	<i>Leucine rich repeat protein. BspA family</i>	EHI_131490	226.62	73.84	3.06	Nitroreduktase Aktivität
30	<i>Lecithin:cholesterol acyltransferase domain-containing protein</i>	EHI_020250	635.65	207.17	3.06	O-Acyltransferase Aktivität

<sup>1</sup> = Gen übernommen von NCBI



**Abbildung 4.3: Expressionsprofil der Gene, die in dem pathogenen Klon B2 signifikant höher exprimiert sind als in dem apathogenen Klon A1.**

*In vitro* kultivierte Trophoziten der *E. histolytica* Klone A1 und B2 wurden mittels mRNA-Seq analysiert. Dargestellt ist das relative Expressionslevel signifikant regulierter Gene. \*\*\**padj* ≤ 0,001; \*\**padj* ≤ 0,01; \**padj* ≤ 0,05.

#### 4.2.1.1 Validierung der mRNA-Seq-Daten mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR)

Die Ergebnisse der Transkriptom-Analysen wurden stichprobenartig mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) verifiziert. Insgesamt wurden 28 der als differentiell exprimierten Gene mit dieser unabhängigen Methode in mindestens zwei biologischen Proben analysiert, wobei die Expressionslevel relativ zur Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -*actin* gemessen und gegen den entsprechend anderen *E. histolytica* Klon kalibriert wurden. Der Grenzwert für eine differentielle Genexpression wurde auf  $\geq 2,5$  festgelegt.

Insgesamt wurden 17 Gene analysiert, die in dem Klon A1 höher exprimiert sind als in dem Klon B2 (Tabelle 4.3). Abgesehen von zwei Ausnahmen (EHI\_056490, EHI\_164900) konnten die mittels mRNA-Seq gewonnenen Daten bestätigt werden. Von den 11 differentiell stärker exprimierten Genen im Klon B2, die in der qPCR untersucht wurden (Tabelle 4.4), lag nur ein Gen (EHI\_017760) außerhalb des definierten Grenzwertes für eine differentielle Genexpression. Demnach konnte die differentielle Expression von 25 der 28 untersuchten Genen mit Hilfe der qPCR-Methode bestätigt werden.

Mit dem Ziel die Einflüsse der identifizierten Gene auf die Pathogenität genauer zu studieren, sollte dies in weiterführenden Experimenten untersucht werden (siehe 4.2.1.2).

**Tabelle 4.3: Verifizierung der differentiellen Genexpression von 17 Genen mittels qPCR, die laut mRNA-Seq in dem Klon A1 signifikant höher exprimiert sind ( $FC \geq 3,0$ ) als in dem Klon B2.**

Gen <sup>1</sup>	Gen-ID	mRNA-Seq-Daten ( $FC \geq 3,0$ )	qPCR-Daten <sup>2</sup> (relative Expression $\geq 2,5$ )		
			Klon A1	Klon B2 (Kalibrator)	
1	<i>EhC2-3 (C2 domain containing protein)</i>	EHI_015290	223,47	254,6 $\pm$ 229,6**	1
2	<i>EhMP8-2 (cell surface protease gp63)</i>	EHI_042870	149,12	134,7 $\pm$ 54,93**	1
3	<i>EhRab7D (Rab family GTPase)</i>	EHI_082070	94,48	22,54 $\pm$ 15,64***	1
4	<i>EhC2-5 (C2 domain containing protein)</i>	EHI_059860	77,14	490,2 $\pm$ 88,81*	1
5	<i>EhC2-2 (C2 domain containing protein)</i>	EHI_118130	60,31	66,15 $\pm$ 3,3*	1
6	<i>EhRab7E (Rab family GTPase)</i>	EHI_169280	50,61	42,07 $\pm$ 28,1****	1
7	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_074080	32,95	229,3 $\pm$ 99,95***	1
8	<i>EhRab7G (Rab family GTPase)</i>	EHI_187090	25,44	28,19 $\pm$ 24,52	1
9	<i>EhPSAT (Phosphoserine aminotransferase)</i>	EHI_005657	7,06	2,87 $\pm$ 0,4****	1
10	<i>EhCAAX (CAAX prenyl protease)</i>	EHI_075660	5,84	2,5 $\pm$ 0,83 **	1

11	<i>Protein phosphatase domain-containing protein</i>	EHI_075690	5,50	5,6 ± 2,8***	1
12	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_075640	5,09	2,8 ± 0,3*	1
13	<i>20 kDa antigen</i>	EHI_056490	5,04	n.d.	1
14	<i>Casein kinase II regulatory subunit family protein</i>	EHI_075700	4,94	2,7 ± 1*	1
15	<i>Actobindin</i>	EHI_164900	4,76	n.d.	1
16	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_086690	4,46	3,3 ± 0,13*	1
17	<i>Replication factor C subunit 4</i>	EHI_086540	3,08	2,5 ± 0,23*	1

<sup>1</sup> = Gen übernommen von NCBI; <sup>2</sup> Die Normalisierung erfolgte über  $\beta$ -actin  
n.d. = nicht differentiell (relative Expression  $\leq 2,5$ ), \*\*\*\* = p-Wert  $\leq 0,0001$ , \*\*\* = p-Wert  $\leq 0,001$ , \*\* = p-Wert  $\leq 0,01$ , \* = p-Wert  $\leq 0,05$

**Tabelle 4.4: Verifizierung der differentiellen Genexpression von 11 Genen mittels qPCR, die laut mRNA-Seq in dem Klon B2 signifikant höher exprimiert sind ( $FC \geq 3,0$ ) als in dem Klon A1.**

Gen <sup>1</sup>	Gen-ID	mRNA-Seq-Daten ( $FC \geq 3,0$ )	qPCR-Daten <sup>2</sup> (relative Expression $\geq 2,5$ )		
			Klon A1 (Kalibrator)	Klon B2	
1	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_127670	192,59	1	13.5 ± 5*
2	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_144490	181,19	1	38 ± 6.4*
3	<i>EhC2-DIL1 (Hypothetical protein)</i>	EHI_169670	93,5	1	58.5 ± 58****
4	<i>Tyrosine kinase</i>	EHI_178610	15,51	1	14.8 ± 9**
5	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_013240	14,4	1	6.85 ± 0.07*
6	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_121820	12,81	1	6 ± 1.3**
7	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_111330	9,62	1	9.4 ± 1.2 **
8	<i>Tyrosine kinase</i>	EHI_017760	25,44	1	n.d.
9	<i>Hypothetical protein</i>	EHI_165190	7,06	1	4.8 ± 2.6**
10	<i>EhC2-DIL2 (Hypothetical protein)</i>	EHI_014170	5,84	1	57.4 ± 38.1****
11	<i>Methionine gamma-lyase</i>	EHI_144610	4,24	1	2.6 ± 0.4*

<sup>1</sup> = Gen übernommen von NCBI; <sup>2</sup> Die Normalisierung erfolgte über  $\beta$ -actin  
n.d. = nicht differentiell (relative Expression  $\leq 2,5$ ), \*\*\*\* = p-Wert  $\leq 0,0001$ , \*\*\* = p-Wert  $\leq 0,001$ , \*\* = p-Wert  $\leq 0,01$ , \* = p-Wert  $\leq 0,05$

#### 4.2.1.2 Einfluss der identifizierten Gene auf die Amöbenleberabszessbildung im Mausmodell

Um zu überprüfen, ob die anhand der Transkriptom-Analyse identifizierten Gene einen Einfluss auf die Amöbenleberabszessentwicklung und somit auf die Pathogenität haben, wurden im Folgenden einige ausgewählte Gene näher untersucht. Hierfür wurden freundlicherweise von Dr. Jenny Matthiesen (BNITM) Transfektanten generiert, bei denen die Expression der jeweiligen Gene inhibiert ist (*silencer*). Von Herrn Martin Meyer (BNITM) wurden ebenfalls freundlicherweise Transfektanten zur Verfügung gestellt bei denen die jeweiligen Gene hingegen überexprimiert sind (Überexprimierer). Im Rahmen dieser Arbeit sollte dann der Einfluss der *silencer* und der Überexprimierer auf die ALA-Bildung im Tiermodell untersucht werden. Hierfür wurden C57BL/6 Mäusen je  $2 \times 10^5$  Trophozoiten der entsprechenden Transfektanten intrahepatisch injiziert und an Tag 7 nach Infektion die Abszessgröße vermessen. Als Kontrollen dienten Transfektanten, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden (pNSi = leerer *silencer*-Vektor; pNC = leerer Überexpressions-Vektor).

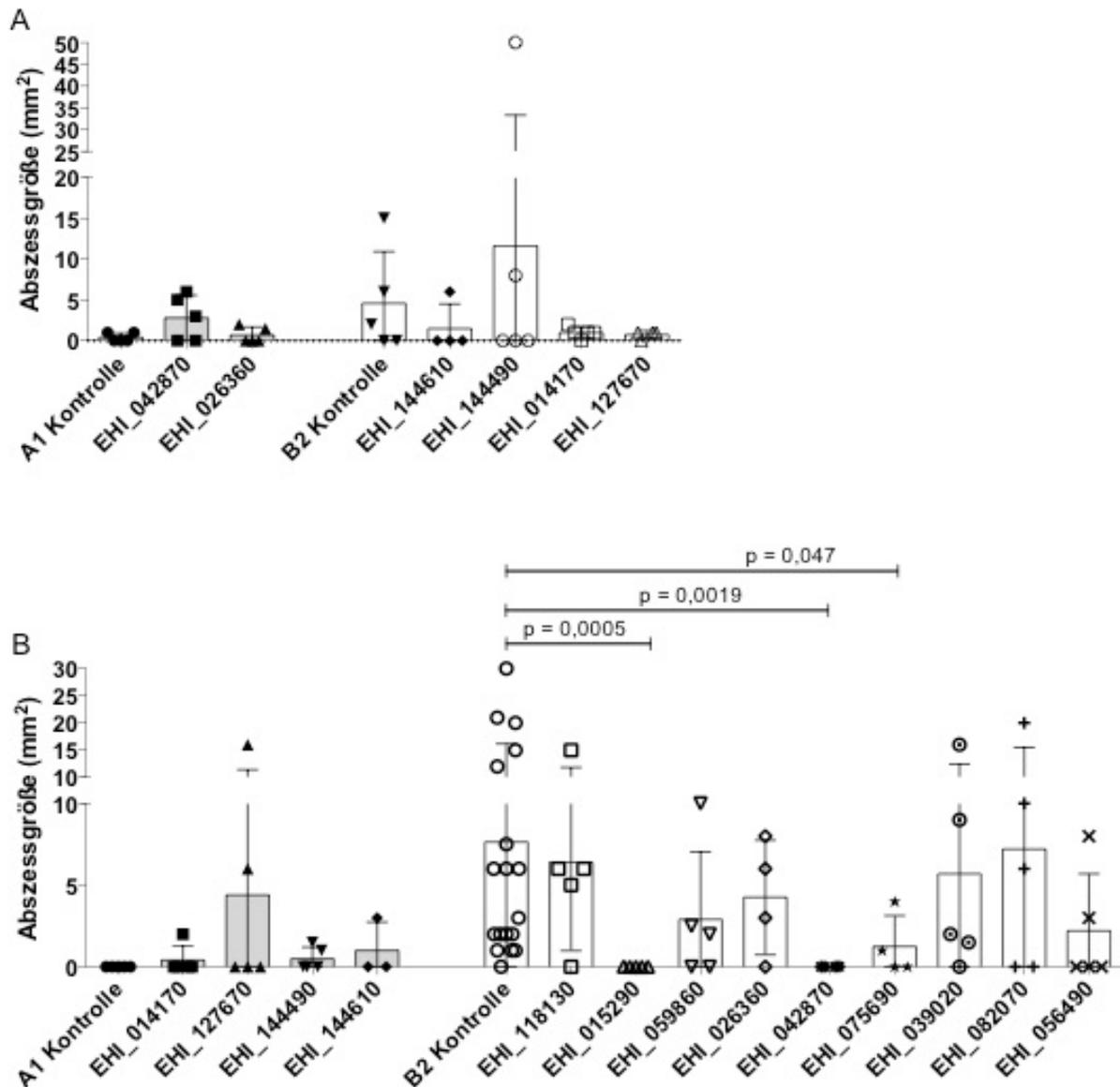
Von den Genen die in dem apathogenen Klon A1 höher exprimiert sind als in dem pathogenen Klon B2 konnten zwei Transfektanten im Tiermodell analysiert werden, bei denen die jeweiligen Gene (EHI\_042870, EHI\_026360) in dem Klon A1 inhibiert worden sind. Dabei wurden keine signifikanten Veränderungen des Phänotyps festgestellt, jedoch scheint die Inhibition von EHI\_042870 in dem eigentlich apathogenen Klon A1 eine tendenziell erhöhte Abszessbildung im Vergleich zu der Kontrolle zu induzieren (Abbildung 4.4 A). Die Überexpression dieses Gens in dem pathogenen Klon B2 führt sogar zu einem signifikanten (\*\*p = 0,0019) Verlust des pathogenen Phänotyps. Ebenfalls konnte ein hoch signifikanter (\*\*p = 0,0005) Einfluss auf die Pathogenität durch die Überexpression von EHI\_015290 festgestellt werden, ebenso wie für die Überexpression von EHI\_075690 (\*p = 0,047). Für sieben weitere Gene die in dem apathogenen Klon A1 höher exprimiert sind, konnte durch Überexpression dieser Gene in dem pathogenen Klon B2 keine weiteren signifikanten Veränderungen des Phänotyps festgestellt werden (Abbildung 4.4 B).

Jedoch konnten bereits vier Transfektanten des pathogenen Klons B2 generiert werden, in denen Gene inhibiert sind, die unter Kulturbedingungen signifikant höher exprimiert sind als in dem apathogenen Klon A1. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen des Phänotyps von pathogen in apathogen festgestellt werden. Allerdings sind für die *silencer* der Gene EHI\_014170 und EHI\_127670 tendenzielle Veränderungen bezüglich des Verlustes ihres pathogenen Phänotyps festgestellt worden (Abbildung 4.4 A). Die Überexpression des Gens EHI\_127670 in dem apathogenen Klon A1 scheint diese Tendenz zu bestätigen. Hier konnten in zwei von fünf infizierten Tieren an Tag 7 noch Amöbenleberabszesse identi-

fiziert werde. Für drei weitere Überexprimierer des Klons A1 konnten weder signifikante noch tendenzielle Unterschiede festgestellt werden.

Von 13 bereits untersuchten Genen, die anhand der Transkriptom-Analyse als differentiell exprimiert identifiziert worden sind, konnte somit für drei Gene ein signifikanter Einfluss auf die Pathogenität festgestellt werden. Die Überexpression der Gene EHI\_042870, EHI\_015290 und EHI\_075690 in dem pathogenen Klon B2 führt zu einer Umkehr des Phänotyps von pathogen zu apathogen. EHI\_015290 (EhC2-3) gehört zu den C2-Domänen-Proteinen, ist an der Signaltransduktion beteiligt und wies mit einem *Fold Change* von >200 die höchste differentielle Expression auf. Die an der Zelladhäsion beteiligte Metalloprotease EhMP8-2 (EHI\_042870) wurde mit einem *Fold Change* von knapp 150 als das am zweithöchsten differentielle exprimierte Gen identifiziert. Die putative Funktion des hypothetische Proteins EHI\_075690 (*Fold Change* = 5,5) ist bisher unbekannt.

Allen drei Genen konnte somit aufgrund dieser Pathogenitätsstudie eine relevante Rolle bei der Virulenzentstehung zugeordnet werden.

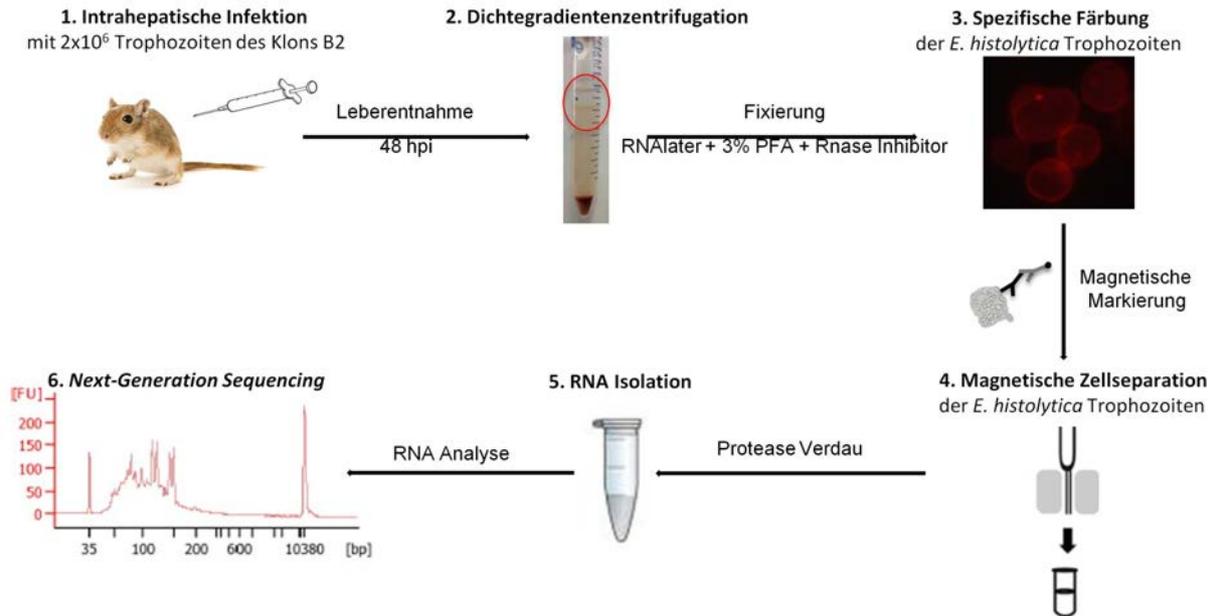


**Abbildung 4.4: Graphische Darstellung der Amöbenleberabszessbildung in *Mus musculus* durch in Klon A1 und Klon B2 transfizierte *silencer*- und Überexpressionskonstrukte.**

**A**, Gene die unter Kulturbedingungen hoch exprimiert sind wurden in den entsprechenden Klonen inhibiert (*silencer*), C57BL/6 Mäuse intrahepatisch injiziert und 7 Tage nach Infektion wurden die Abszessgrößen vermessen. Als Kontrollen dienen in den Klon A1 oder den Klon B2 transfizierte pNSi (leerer *silencer*-Vektor). **B**, Überexpressionskonstrukte wurden in den Klon A1 oder den Klon B2 transfiziert und auf ihre ALA-Bildung 7 Tage nach Infektion im Mausmodell untersucht. Als Kontrollen dienen in den Klon A1 oder den Klon B2 transfizierte pNC (leerer Überexpressions-Vektor). Die Signifikanzberechnung erfolgte über den *Mann-Whitney U* Test (\*\**padj* ≤ 0,001; \*\**padj* ≤ 0,01; \**padj* ≤ 0,05).

#### 4.2.2 Etablierung einer Methode zur Reisolierung von *E. histolytica* Trophozoiten aus der Leber für weiterführende RNA-Analysen

Der für die Pathogenität von *E. histolytica* verantwortliche Mechanismus, der zur Ausbildung von Amöbenleberabszessen führt, konnte bisher nur unzureichend aufgeklärt werden. Mit der Transkriptom-Analyse *in vitro* axenisch kultivierter *E. histolytica* Trophozoiten der sich in ihrer Pathogenität unterscheidenden Klone A1 und B2 (siehe 4.2.1) konnten bereits Gene identifiziert werden, die mögliche Virulenzfaktoren darstellen. Um die Ursache der Pathogenität von *E. histolytica* weiterführend zu untersuchen, bietet sich die Expressionsanalyse von Trophozoiten *ex vivo* an. Dafür musste eine Methode etabliert werden, welche es ermöglicht Trophozoiten in ausreichender Menge direkt aus der Leber infizierter Tiere zu reisolieren und zeitnah für die Genexpressionsanalyse zu konservieren. Zudem mussten auch die Quantität und Qualität der isolierten RNA dem erforderlichen Standard entsprechen, um eine Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Seq durchführen zu können. Hierfür wurden verschiedene Methoden kombiniert, modifiziert und bereits bestehende Protokolle optimiert, um qualitativ hochwertige RNA von direkt aus der Leber reisolierten Trophozoiten zu gewinnen (Abbildung 4.5). Zunächst wurden mongolischen Wüstenrennmäusen je  $2 \times 10^6$  axenisch kultivierte *E. histolytica* Trophozoiten des pathogenen Klons B2 intrahepatisch injiziert. Die Leber wurde 48 Stunden nach Infektion entnommen, über einem Zellsieb gemahlen und die daraus resultierende Zellsuspension einer, auf *E. histolytica* optimierten Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Nach der Zentrifugation reichern sich die intakten und viablen Trophozoiten in der Leberlymphozyten-Fraktion an. Diese Fraktion wurde anschließend in dem RNA-Stabilisationsreagenz *RNA/later* inkubiert, um das Genexpressionsprofil zu konservieren. Zur Vermeidung einer Lyse der Trophozoiten wurden der in *RNA/later* konservierten Zellsuspension 3% PFA hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte eine Amöben-spezifische Immunmarkierung mit nachfolgender magnetischer Markierung. Aus den nach der magnetischen Zellseparation (MACS) im Eluat angereicherten Trophozoiten wurde dann die RNA isoliert. Die isolierte Gesamt-RNA konnte jetzt für verschiedene weiterführende RNA-Analysen eingesetzt werden. In diesem Versuch wurde ausschließlich mit Trophozoiten des pathogenen *E. histolytica* Klons B2 gearbeitet. In den folgenden Abschnitten sollen einzelne Schritte, die für die Etablierung des gesamten Protokolls von entscheidender Bedeutung waren, weiterführend erläutert werden.



**Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Reisolierung von *E. histolytica* Trophozoiten aus der Leber für weiterführende RNA-Analysen.**

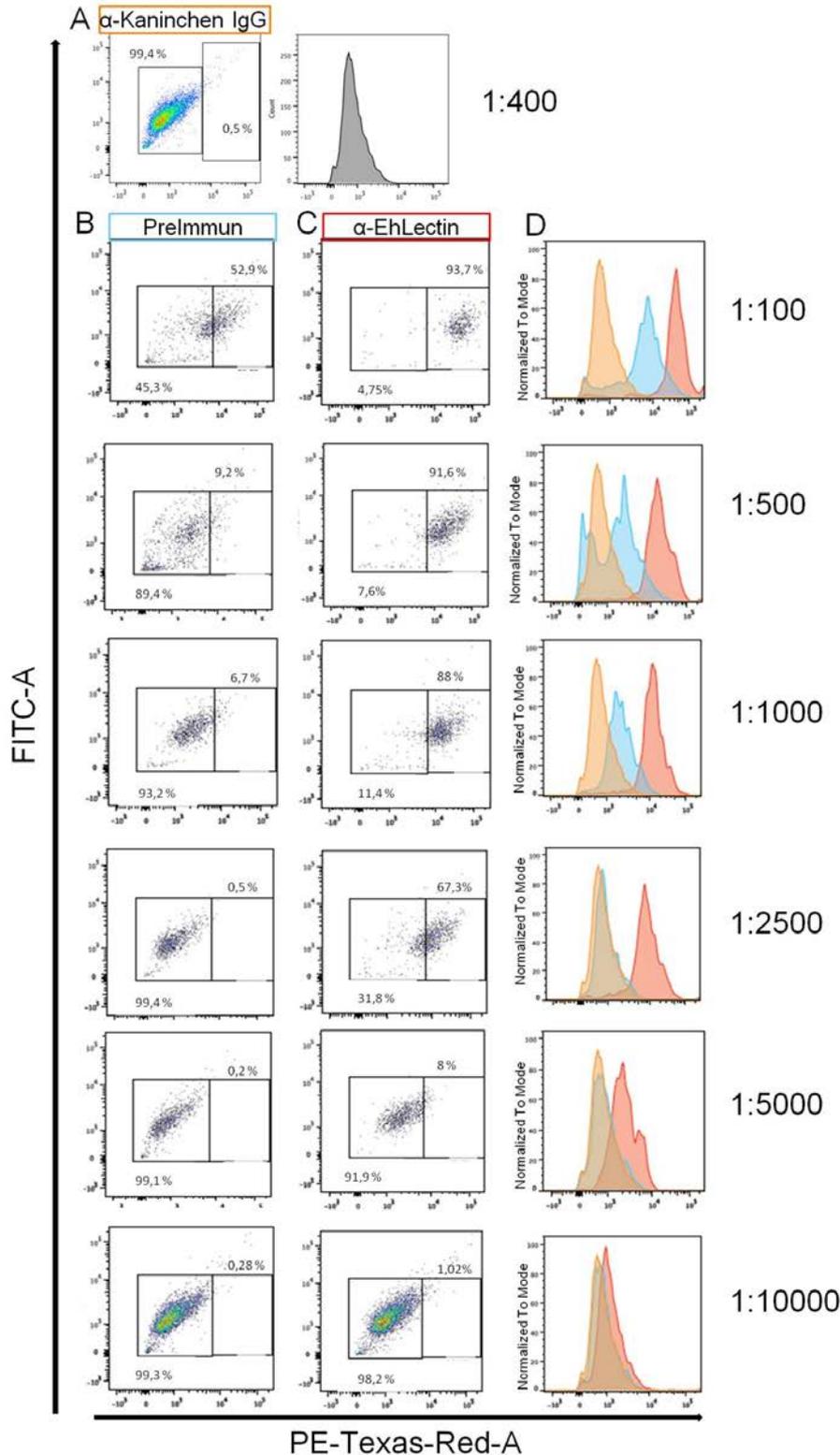
Mongolischen Wüstenrennmäusen wurden  $2 \times 10^6$  Trophozoiten des *E. histolytica* Klons B2 intrahepatisch injiziert (1). 48 Stunden nach Infektion wurde die Leber entnommen und über eine Dichtegradientenzentrifugation die Fraktion von Lymphozyten und Trophozoiten von der restlichen Zellsuspension isoliert (2). Diese Fraktion wurde fixiert und mit einem Amöben-spezifischen Antikörper ( $\alpha$ -EhLectin) gefärbt (3). Mit Hilfe eines an magnetischen *Microbeads* konjugierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Antikörpers wurden die Trophozoiten in der magnetischen Zellseparationssäule von den Leberlymphozyten isoliert (4). Die Gesamt-RNA wurde isoliert (5) und analysiert, um sie für mRNA-Seq einzusetzen (6).

#### 4.2.2.1 Untersuchung zur Spezifität und Kreuzreaktivität des Amöben-spezifischen Antikörpers $\alpha$ -EhLectin mittels Durchflusszytometrie

Die Adhärenz von *E. histolytica* an Mucine des Dickdarms und an Wirtszellen wird überwiegend über ein auf der Oberfläche befindliches 170 kDa großes Lectin vermittelt (Tannich *et al.*, 1991). Für diese Studie stand ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper ( $\alpha$ -EhLectin) sowie das entsprechende Pre-Immunsrum zur Verfügung (Biller *et al.* 2014). Zur Analyse der Spezifität und Kreuzreaktivität dieses Amöben-spezifischen Antikörpers wurde zunächst die Antikörperverdünnung austitriert. Dazu wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Trophozoiten des *E. histolytica* Klons B2 entweder nur mit dem Sekundär-Antikörper (Abbildung 4.6 A), dem Pre-Immunsrum (Abbildung 4.6 B) oder dem  $\alpha$ -EhLectin Antikörper (Abbildung 4.6 C) gefärbt und mittels FACS analysiert.

Der Versuch zur Antikörpertitration hat gezeigt, dass nur bei einer Verdünnung von 1:2500 eine spezifische Markierung der *E. histolytica*-Zellen im FACS gemessen werden konnte. Bei dieser Verdünnung sind 67,3% der gefärbten Trophozoiten im PE-Texas-Red-Kanal positiv gefärbt, wohingegen nur 0,5% der Trophozoiten nach Färbung mit dem Preimmun-Serum

oder dem Sekundär-Antikörper PE-Texas-Red-positiv sind (Abbildung 4.6). Wurde der  $\alpha$ -EhLectin Antikörper bzw. das entsprechende Pre-Immunsrum stärker konzentriert eingesetzt, kam es zu unerwünschten unspezifischen Färbungen (1:100, 1:500, 1:1000); bei höheren Verdünnungen des Antikörpers konnte nur noch eine schwache Anfärbung der Trophozoiten detektiert werden (1:5000 und 1:10000).

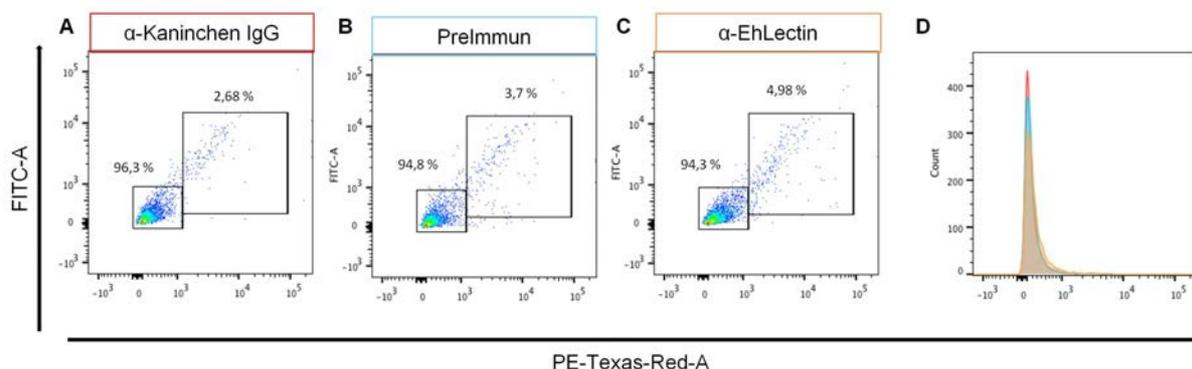


**Abbildung 4.6: Analyse der Spezifität des  $\alpha$ -EhLectin Antikörpers.**

Titration des  $\alpha$ -EhLectin Antikörpers zur spezifischen Markierung von *E. histolytica* Trophozoiten. Die Analyse von jeweils  $1 \times 10^3$  Trophozoiten erfolgte im FACS, wobei FITC gegen PE-Texas-Red aufgetragen wurde. Die Färbung der Trophozoiten erfolgte entweder nur mit dem Sekundär-Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen IgG (orange) (**A**), der für das Gating genutzt wurde, oder mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Pre-Immunsersums (blau) (**B**) bzw. des  $\alpha$ -EhLectin Antikörpers (rot) (**C**). Die Überlagerungen der Histogramme aller Färbungen belegen eine optimale Markierung von *E. histolytica* Trophozoiten bei einer Antikörperverdünnung von 1:2500.

Um eine Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -EhLectin Antikörpers mit murinen Leberlymphozyten auszuschließen, wurden diese ebenfalls dem Färbeprotokoll mit dem  $\alpha$ -EhLectin Antikörper (Verdünnung 1:2500), dem Preimmun-Serum (Verdünnung 1:2500) und dem Sekundär-Antikörper unterzogen und mittels FACS analysiert. Der Analyse zufolge ist eine Kreuzreaktivität mit Leberlymphozyten auszuschließen, da keine solche positiv angefärbte Zellpopulation im PE-Texas-Red-Kanal detektiert werden konnte (Abb. 4.7).

Somit konnte mit den Untersuchungen zur Spezifität und Kreuzreaktivität des  $\alpha$ -EhLectin Antikörpers gezeigt werden, dass dieser *E. histolytica* Trophozoiten spezifisch anfärbt und für die Separation mittels Immunomarkierung von Amöben und Leberlymphozyten geeignet ist.



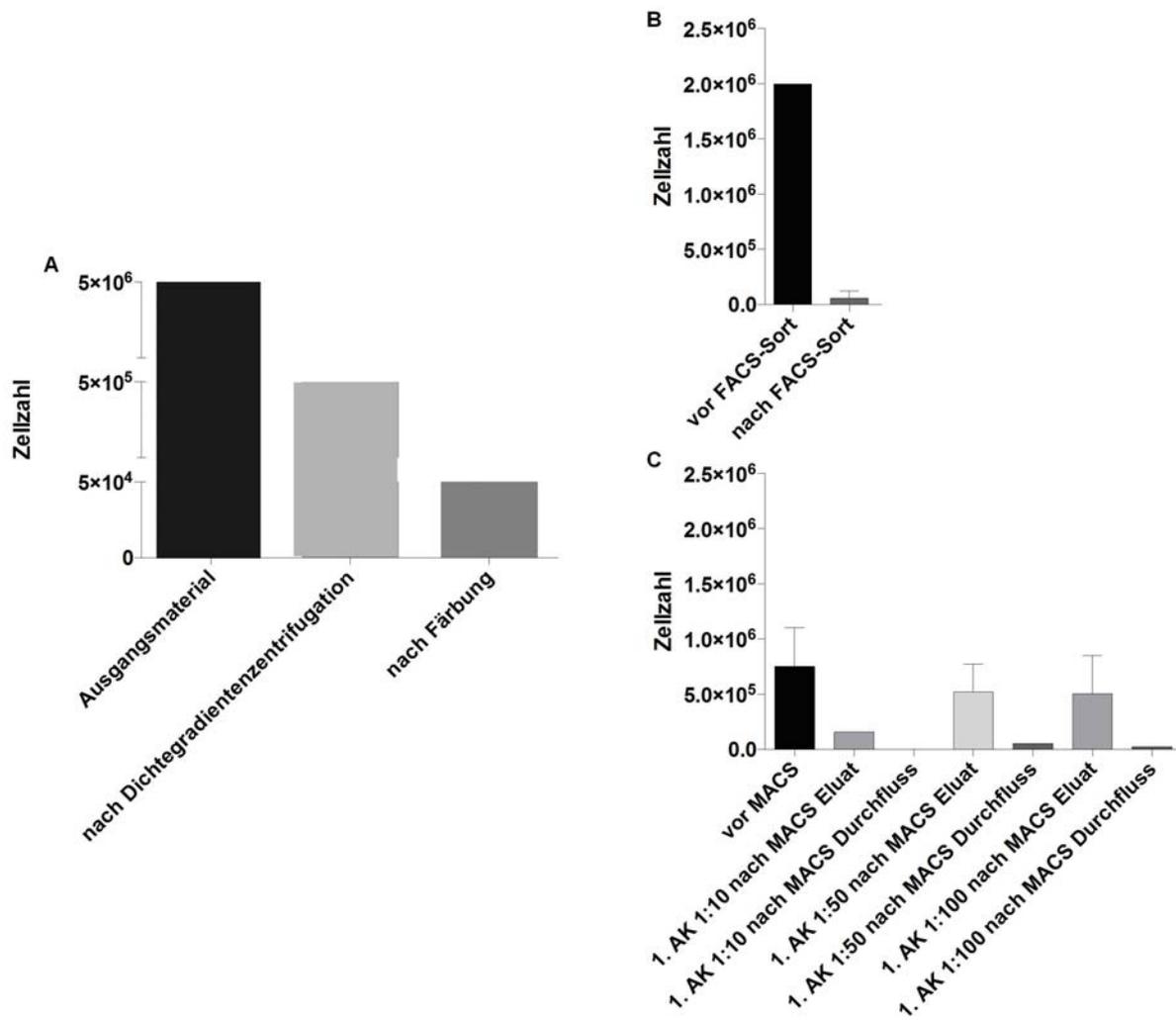
#### Abbildung 4.7: Ausschluss unspezifischer Kreuzreaktionen des $\alpha$ EhLectin-Antikörpers mit murinen Leberlymphozyten.

FACS-Analyse muriner Leberlymphozyten gefärbt mit dem Sekundär-Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen IgG (rot) (A), dem Pre-Immunsersum (blau) (B) oder dem  $\alpha$ -EhLectin Antikörper (orange) (C), wobei der Amöben-spezifische Antikörper bzw. das Pre-Immunsersum in der zuvor austitrierte Verdünnung von 1:2500 eingesetzt wurden. Die Überlagerung der Histogramme aller Färbungen zeigt, dass Leberlymphozyten nicht mit dem  $\alpha$ -EhLectin Antikörper markiert werden.

#### 4.2.2.2 Optimierung der Zellausbeute bei der Reisolierung von *E. histolytica*-Trophozoiten

Die Reisolierung von *E. histolytica*-Trophozoiten aus der Leber infizierter mongolischer Wüstenrennmäuse erfordert eine Kombination verschiedener Methoden (vgl. 4.2.2). Dabei sind Verluste bei der Zellzahl nach den einzelnen Versuchsschritten unvermeidbar. Um die Anzahl an Tieren, die für die *ex vivo*-Expressionsanalyse von reisolierten Trophozoiten erforderlich ist, kalkulieren zu können und RNA in ausreichender Menge und Qualität zu erhalten, wurde die Verlustrate der Trophozoiten-Anzahl nach den einzelnen Versuchsschritten bestimmt. Dabei wurde ausschließlich mit axenisch kultivierten *E.*

*histolytica*-Trophozoiten des Klons B2 gearbeitet. Auf den Einsatz von Leberlymphozyten wurde hier verzichtet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Im ersten Schritt wurde der Verlust der Zellzahl nach der Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation und dem Färbeprotokoll mit dem  $\alpha$ -EhLectin Antikörper bestimmt (Abbildung 4.8 A). Beide Versuchsschritte sind für die Durchführung der Reisolierung von Amöben aus der Leber essentiell. Bereits nach der Dichtegradientenzentrifugation war ein Verlust von 90% der Ausgangszellzahl zu verzeichnen, weitere 90% der Trophozoiten wurden durch die Immunmarkierung und die dafür erforderlichen Waschschrte verloren. Der Verlust von insgesamt 99% Trophozoiten bezogen auf die Ausgangszellzahl konnte nicht optimiert werden.



**Abbildung 4.8: Graphische Darstellung der Verlustraten nach den einzelnen Teilschritten des Versuchsablaufs zur Reisolierung von *E. histolytica* Trophozoiten.**

**A**, Verlustaten der Trophozoiten nach Dichtegradientenzentrifugation und amöbenspezifischer Färbung. **B**, Verlustaten der Trophozoiten nach FACS-Sort. **C**, Verlustaten der Trophozoiten nach MACS mit unterschiedlichen Konzentrationen des amöbenspezifischen Primär-Antikörpers (1. AK)  $\alpha$ -EhLectin (Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:100).

Zur Separation von *E. histolytica*-Trophoziten und Leberlymphozyten wurden die Methoden der magnetischen Zellseparation (MACS) und der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS-Sort) ausprobiert. Im Vergleich zeigte sich, dass gegenüber dem FACS-Sort die Verluste der zu reisolierenden Trophozoiten mittels MACS deutlich geringer ausfallen. Bei einer Ausgangsmenge von  $2 \times 10^6$  Trophozoiten konnten mittels FACS-Sort eine Ausbeute von nur  $6 \times 10^4$  Trophozoiten erzielt werden, was einem Verlust von 97% der eingesetzten Zellen entspricht (Abbildung 4.8 B). Für die MACS-Analysen (Abbildung 4.8 C) wurden drei unterschiedliche Verdünnungen (1:10, 1:50, 1:100) des Primär-Antikörpers  $\alpha$ -EhLectin eingesetzt. Die zuvor mittels FACS bestimmte Antikörper-Verdünnung konnte auf Grund der unterschiedlichen Sensitivitäten der Methoden nicht für MACS übernommen werden. Die Zellzahl wurde jeweils für die positive Fraktion (Eluat) und für die negative Fraktion

(Durchfluss) bestimmt. Bei einer eingesetzten Zellzahl von  $7,5 \times 10^5$  Trophozoiten vor MACS konnten bei der 1:10 Verdünnung des Primär-Antikörpers  $1,6 \times 10^5$  Trophozoiten im Eluat und keine Trophozoiten im Durchfluss gezählt werden. Bei der 1:50 Verdünnung wurden  $5,2 \times 10^5$  Trophozoiten im Eluat und  $2,5 \times 10^4$  Trophozoiten im Durchfluss gezählt. Bei der 1:100 Verdünnung wurden  $5 \times 10^5$  Trophozoiten im Eluat und  $1,2 \times 10^4$  Trophozoiten im Durchfluss gezählt. Das bedeutet, dass durch die magnetische Zellseparation Verluste von 79% bei einer 1:10 Verdünnung des  $\alpha$ -EhLectin Antikörpers, 31% bei der 1:50 Verdünnung und 33% bei der 1:100 Verdünnung festgestellt worden sind. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Methode der magnetischen Zellseparation der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung, welche zudem deutlich zeitintensiver und somit nachteilig für die Qualität der zu isolierenden RNA ist, vorgezogen und im folgenden mit einer 1:50-Verdünnung von  $\alpha$ -EhLectin weitergearbeitet. Ausgehend von der Verlustrate von insgesamt > 99 % wurde berechnet, dass für die folgenden RNA-Analysen das Zellmaterial von mindestens zwei bis fünf mongolischen Wüstenrennmäusen zu einer biologischen Probe zusammengeführt werden müssen.

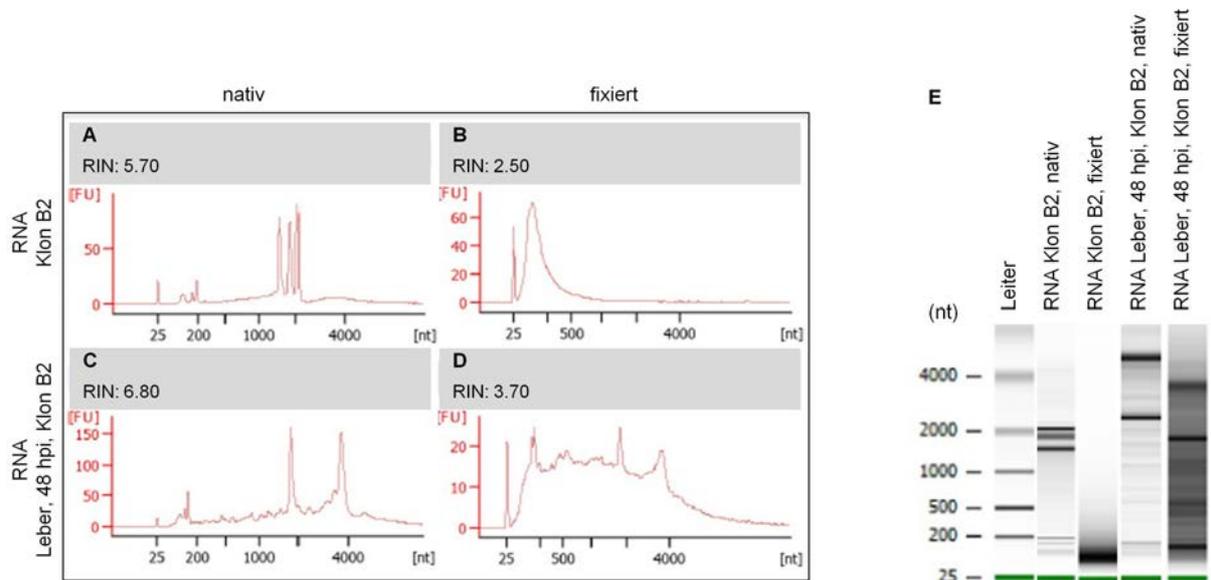
#### **4.2.2.3 Quantitative und qualitative Analysen der RNA aus der Leber reisolierter *E. histolytica* Trophozoiten**

Quantitativ und qualitativ hochwertige RNA aus fixierten Zellen oder Geweben für molekulare Analysen zu isolieren, stellt gegenwärtig eine große Herausforderung dar. Verantwortlich dafür ist das eingesetzte PFA, welches zu Vernetzungen von Proteinen und Nukleinsäuren und chemischen Modifikationen der RNA führt (Masuda *et al.*, 1999). Um den Prozess der Vernetzung umzukehren wird die Probe vor der RNA-Isolierung einem hochtemperierten Protease-Verdau unterzogen, welcher zur Fragmentierung der RNA und schnell zu einer totalen Degradation der RNA führt. Um die optimalen Bedingungen für die Fixierung, De-Fixierung und RNA-Isolierung PFA-behandelter Proben herauszufinden, wurde zunächst eine RNA-Isolierung aus axenisch kultivierten und aus der Leber reisolierten Trophozoiten (48 Stunden nach Infektion) mit nativen und PFA-fixierten Proben durchgeführt. In der anschließenden Qualitätsanalyse im Bioanalyzer gibt der sogenannte RIN-Wert (RNA *Integrity Numbre*) Aufschluss über die Qualität der RNA, wobei der Maximalwert von 10 vollständig intakte RNA definiert RNA, die aus nativen Trophozoiten des Klons B2 isoliert wurde, weist drei Amöben-typische, distinkte ribosomale RNA (rRNA)-Banden mit einer Fragmentlänge im Bereich von ungefähr 1500 bis 2000 Nukleotiden (nt) sowie kleinere Fragmente im Bereich von ungefähr 120 bis 200 Nukleotiden auf (Abbildung 4.9 A,E). Der RIN-Wert liegt bei 5,7, was erfahrungsgemäß im Normbereich für RNA aus nativen Trophozoiten liegt (Daten hier nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu sind in der RNA von fixierten Trophozoiten des Klons B2 nach dem Prozess der Reisolierung (vgl. 4.2.2) keine

distinkten rRNA-Banden mehr sichtbar (Abbildung 4.9 B,E). Demnach hat das Prozedere der Reisolierung, insbesondere der Fixierung, einen profunden Einfluss auf das Ausmaß der Fragmentierung und somit auf die Qualität der RNA. Die durchschnittliche Fragmentlänge der RNA liegt im Bereich von ungefähr 25 bis 500 Nukleotiden und aufgrund der starken Fragmentierung konnten nur RIN-Werte von maximal 2,5 erzielt werden.

Die Gesamt-RNA aus nativen murinen Lebern, 48 Stunden nach intrahepatischer Injektion mit Trophozoiten des Klons B2 zeigt distinkte eukaryotische 18S und 28S rRNA-Banden mit einer Fragmentlänge im Bereich von ungefähr 2000 bis 4000 Nukleotiden sowie eine schwache 5S-Bande im Bereich von ungefähr 120 bis 160 Nukleotiden (Abbildung 4.9 C,E). Der RIN-Wert dieser Probe liegt bei 6,8. In den meisten RNA-Eluaten die aus Lebergewebe isoliert werden, können RIN-Werte in den Bereichen von ungefähr 6 bis maximal 7,9 erzielt werden (Daten hier nicht gezeigt). Trotz der Infektion mit Trophozoiten des Klons B2 sind in dem RNA-Eluat keine Amöben-spezifischen rRNA-Banden mehr detektierbar. Im Vergleich dazu zeigt das fixierte RNA-Eluat der aus der Leber von *Meriones unguiculatus* reisolierten Trophozoiten ähnliche Einbußen der Qualität auf, wie schon bei dem Vergleich von nativen und fixierten *in vitro* kultivierten Trophozoiten. Die Fragmentlängen liegen im Bereich von ungefähr 25 bis 4200 Nukleotiden (Abbildung 4.9 D). Im virtuellen Gel (Abbildung 4.9 E) sind drei differenziertere rRNA-Banden bei Größen von ungefähr 4000, 2000 und knapp 200 Nukleotiden zu erkennen. Die 4000 und 2000 nt großen Fragmente sind auf das restliche Vorhandensein von Leberlymphozyten im Eluat nach MACS zurückzuführen. Die 200 nt rRNA-Bande könnte ein Indiz für die reisolierten Trophozoiten sein. Es konnte ein maximaler RIN-Wert von 3,7 erreicht werden.

Insgesamt konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass das Protokoll der Reisolierung mit der darin erforderlichen Fixierung der Proben einen maßgeblichen Einfluss auf die Integrität der isolierten RNA hat. Der Grad der Degradation konnte trotz unterschiedlicher Versuchsansätze zu Dauer und Temperatur des Proteaseverdau (Daten nicht gezeigt) nicht weiter optimiert werden. Zudem konnten nur RNA-Mengen von 16 ng/µl bis maximal 76 ng/µl aus dem reisolierten Material von ungefähr  $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  Trophozoiten nach MACS isoliert werden.



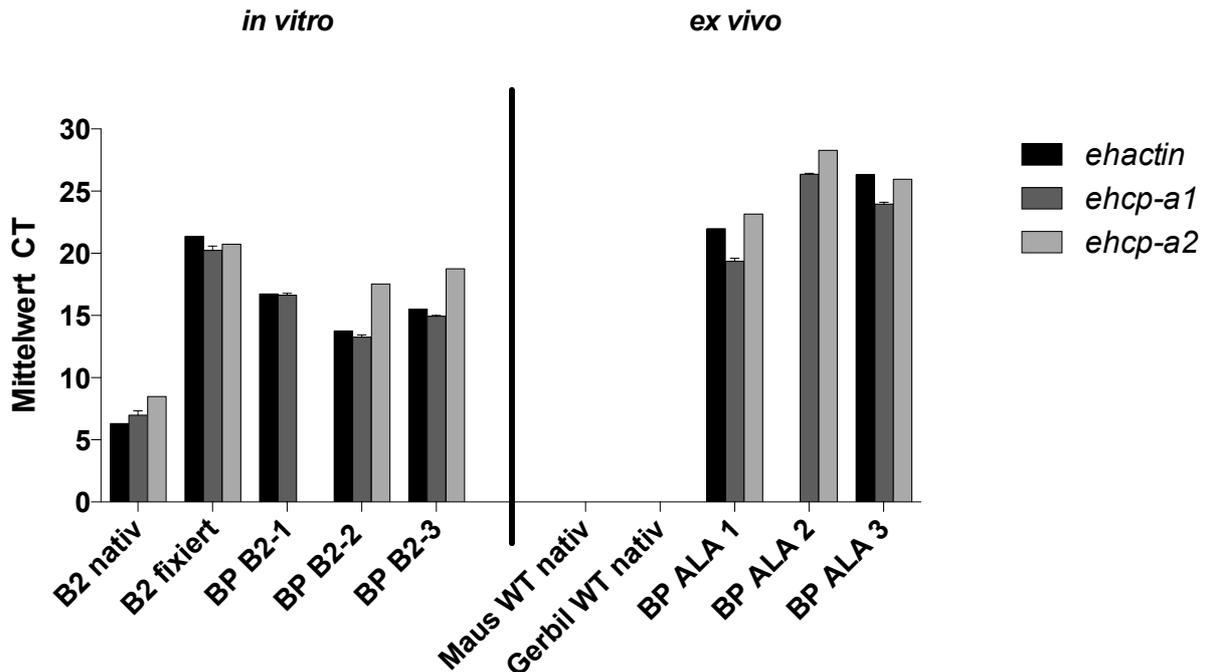
**Abbildung 4.9: Qualitativer Vergleich der RNA isoliert aus nativen und fixierten Proben des *E. histolytica*-Klons B2.**

Um den Einfluss des Reisolierungsprozesses und der Fixierung von *E. histolytica* Trophozoiten auf die Qualität der RNA zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA entweder aus nativen, axenisch kultivierten Trophozoiten (**A**), von axenisch kultivierten, fixierten und mittels des Reisolierungsprotokoll isolierten Trophozoiten (**B**), aus einer nativen murinen Leber 48 Stunden nach intrahepatischer Injektion (hpi) mit Trophozoiten (**C**) oder aus dem fixierten Eluat nach magnetischer Zellseparation von einer 48 Stunden infizierten mongolischen Wüstenrennmaus (**D**) isoliert und in Elektropherogrammen des Bioanalyzers dargestellt. **E**, Das virtuelle Gelbild des Bioanalyzers verdeutlicht den Degradations- und Fragmentierungszustand von RNA aus fixierten Material gegenüber der RNA, die aus nativem Zellmaterial gewonnen wurde.

Wie in dem Elektropherogramm des RNA-Eluats aus der Leber von mongolischen Wüstenrennmäusen reisolierter Trophozoiten (Abbildung 4.9 D) ersichtlich, konnte eine Verunreinigung der Trophozoiten mit Leberlymphozyten nicht gänzlich vermieden werden. Bei der Durchführung des Reisolierungsprotokolls wurde die Probe nach jedem Versuchsschritt einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen. Dabei konnte kein Trophozoit, wie er optisch aus Kulturbedingungen bekannt ist, identifiziert werden. Vielmehr waren Amöben-ähnliche Zellaggregate sichtbar, die sich vor allem in den Eluaten nach dem MACS-Prozedere befanden. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen Zellaggregaten um Trophozoiten des *E. histolytica* Klons B2 handelt, wurde daher eine Amöben-spezifische quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt. Hierfür wurden mongolischen Wüstenrennmäuse mit dem *E. histolytica*-Klon B2 infiziert, die Trophozoiten reisoliert (biologische Probe = BP ALA 1 bis 3) und mittels qPCR analysiert. Die als Positiv-Kontrollen eingesetzten axenisch kultivierten Trophozoiten des Klons B2 (biologische Probe = BP B2-1 bis 3) wurden ebenfalls fixiert und dem Protokoll der Reisolierung unterzogen. Als weitere Positiv-Kontrollen wurde RNA von nativen, als auch von fixierten Trophozoiten des Klons B2

und als Negativ-Kontrollen RNA aus nativen Maus- und Wüstenrennmaus-Lebern verwendet. Für die qPCR wurden neben dem Normalisierungsgen (*ehactin*) auch die Genexpressionen der Cysteinpeptidasen EhCP-A1 und EhCP-A2 analysiert, da diese unter Kulturbedingungen in *E. histolytica* sehr stark exprimiert werden (Bruchhaus *et al.*, 2003). Die Bestimmung der Schwellenwerte (CT = *cycle of threshold*) zeigt, dass in den BP ALA 1 und 3, in den nativen und fixierten Trophozoiten des Klons B2 sowie in allen biologischen Proben B2-1 bis 3 spezifische Transkripte der untersuchten Gene detektiert werden konnten (Abbildung 4.10). In der BP ALA 2 konnte kein Transkript für EhActin nachgewiesen werden, aber es wurden spezifische Amplifikate für die stärker exprimierten Cysteinpeptidasen EhCP-A1 und EhCP-A2 detektiert. Die Detektion Amöben-spezifischer Amplifikate war in den Leberproben erwartungsgemäß nicht möglich.

Alle Proben aus fixiertem Ausgangsmaterial wiesen bei der qPCR-Analyse deutlich höhere CT-Werte auf als die Proben der nativen Trophozoiten. Dies ist auf den starken Fragmentierungsgrad der aus fixiertem Material isolierten RNA zurückzuführen. Trotzdem konnte die qPCR-Analyse die Eignung der RNA aus reisolierten Trophozoiten für molekulare Analysen bestätigen. Zudem stützen die Ergebnisse die Beobachtung, dass Trophozoiten nach 48 Stunden in der Leber mit anderen Immunzellen Aggregate bilden.



**Abbildung 4.10: Nachweis von *E. histolytica*-Transkripten in nativen und fixierten, axenisch kultivierten Trophozoiten (*in vitro*) sowie in aus der Leber reisolierten Trophozoiten (*ex vivo*) mittels qPCR.**

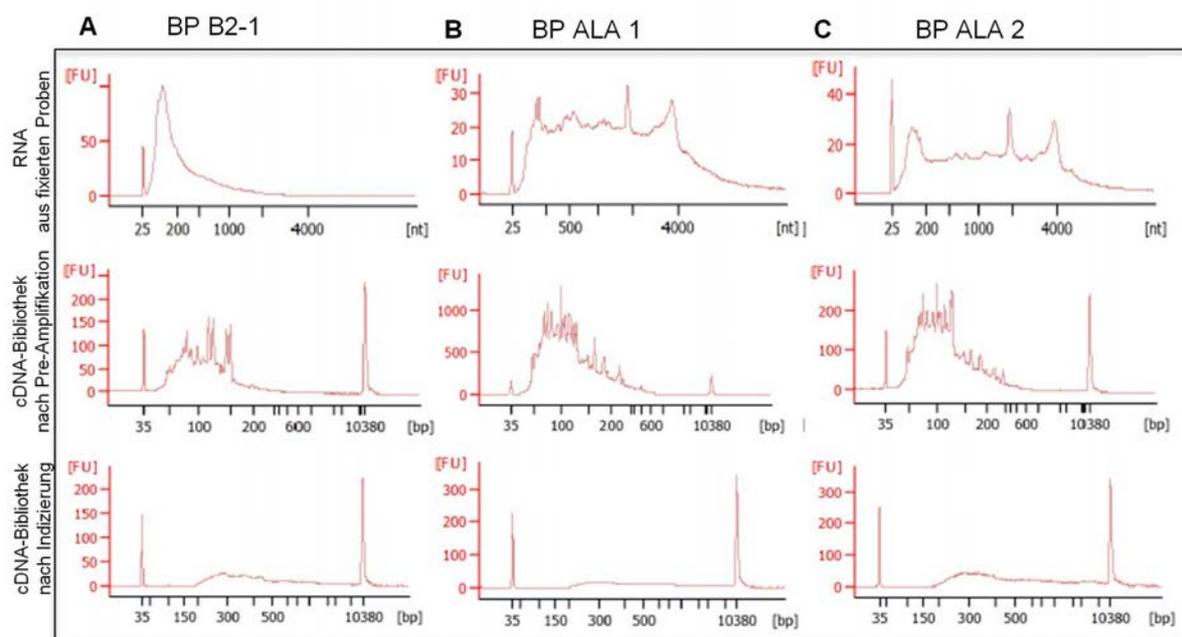
Für die Amöben-spezifische qPCR (*ehactin*, *ehcp-a1*, *ehcp-a2*) wurden als Positivkontrollen native sowie fixierte Trophozoiten des Klons B2 (B2 nativ/fixiert) eingesetzt. Es wurden 3 biologische Proben von *in vitro* kultivierten Trophozoiten (BP B2-1 bis 3) nach dem Protokoll der Reisolierung untersucht. EhCP-A2 wurde für die Probe B2-1 nicht analysiert. Als Negativkontrollen wurde RNA aus Lebern von *Mus musculus* und *Meriones unguiculatus* mitgeführt. Für den Erhalt von drei biologischen Proben aus der Leber reisolierter Trophozoiten (BP ALA 1 bis 3) wurden *Meriones unguiculatus* (Gerbil)  $2 \times 10^6$  Trophozoiten des *E. histolytica* Klons B2 injiziert, die Leber 48 Stunden nach Infektion entfernt und die Trophozoiten aus dieser reisoliert. Dargestellt sind die gemittelten CT-Werte eines Doppelansatzes (CT = cycle of threshold).

Nachdem sichergestellt wurde, dass molekulare Expressionsanalysen mit der RNA aus fixiertem, aus der Leber reisolierten *E. histolytica*-Trophozoiten möglich sind, sollten im nächsten Schritt cDNA-Bibliotheken für Transkriptom-Analysen generiert werden.

Hierfür wurde zunächst nur das reisolierte Material der biologischen Proben ALA 1 und ALA 2 sowie zur Positivkontrolle ein Eluat einer fixierten, dem Reisolierungsprotokoll unterzogene biologischen Probe des Klons B2 eingesetzt. In Abbildung 4.11 sind die mittels Bioanalyser durchgeführten Qualitätskontrollen des RNA-Ausgangsmaterials sowie der daraus resultierenden cDNA-Bibliotheken dargestellt. Nach der Erststrang-Synthese und der Pre-Amplifikation wurde in der Positivkontrolle eine Größenverteilung der cDNA mit distinkte Peaks im Bereich von 44 bis 255 Basenpaaren (bp) detektiert (Abbildung 4.11 A). Der Hauptpeak liegt bei ungefähr 100 bp. Für die biologischen Proben ALA 1 und 2 wurde eine Größenverteilung mit distinkte Peaks im Bereich von 38 bis 600 bp detektiert, die ebenfalls einen Hauptpeak bei ungefähr 100 bp aufweisen (Abbildung 4.11 B und C). Im nächsten

Schritt wurde die generierte cDNA erneut amplifiziert und mit individuellen Barcodes versehen, um eine gemeinsame Analyse (Multiplexing) der Proben in einem mRNA-Seq-Lauf zu ermöglichen. Für alle drei Proben konnte danach eine Größenverteilung der cDNA von ungefähr 200 bis 500 bp festgestellt werden. Die Konzentration der Proben lag zwischen 114 ng/µl bis 120 ng/µl.

Somit konnten erfolgreich cDNA-Bibliotheken aus fixierten, aus der Leber von mongolischen Wüstenrennmäusen reisolierten Amöben generiert werden, um die Genexpression *ex vivo* zu untersuchen und mögliche Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren. Gegenwärtig sind die cDNA-Bibliotheken einsatzbereit für die Cluster-Amplifikation und Sequenzierung über die Illumina Plattformen, aufgrund technischer Probleme konnten die Proben im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit aber leider nicht mehr am Illumina MiSeq® analysiert werden.



#### Abbildung 4.11: Qualitative und quantitative Analyse der RNA und cDNA-Bibliotheken zur *ex vivo* Transkriptomanalyse mittels mRNA-Seq.

Gesamt-RNA wurde aus fixierten Proben nach dem Protokoll der Reisolierung von *E. histolytica* Trophozoiten aus der Leber isoliert und mittels der Clontech's SMART™ (*Switching Mechanism at 5' End of RNA Template*) Technologie wurden cDNA-Bibliotheken generiert. Dargestellt ist die Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer der RNA des Ausgangsmaterials und den daraus erstellten cDNA-Bibliotheken nach Pre-Amplifikation sowie nach Indizierung.

Die Positivkontrolle wurde aus axenisch kultivierten *E. histolytica* Trophozoiten des Klons B2 generiert (BP B2-1) (A). Biologische Proben 1 und 2 von 48 Stunden nach Infektion aus der Leber von *Meriones unguiculatus* reisolierten Trophozoiten des Klons B2 (BP ALA 1 und 2) (B, C).

Allgemein konnte eine erfolgreiche Methode zur Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber infizierter Tiere etabliert werden, welche es ermöglicht quantitativ und qualitativ ausreichende Mengen an RNA zu isolieren um diese für molekulare Analysen einzusetzen.

#### **4.2.3 Wirtsspezifische Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Sequenzierung nach intrahepatischer Infektion in C57BL/6 Mäusen mit den *E. histolytica* Klonen A1 und B2**

Neben den Pathogenitätsfaktoren des Parasiten können auch wirtsspezifische Faktoren bei einem Ausbruch der Amöbiasis eine wichtige Rolle spielen, da das klinische Bild bei einer *E. histolytica*-Infektion im humanen Wirt sehr variabel verlaufen kann. In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass sich nach Infektion mit denen sich in ihrer Pathogenität unterscheidenden *E. histolytica* Klonen A1 und B2 unterschiedliche Verläufe in der ALA-Bildung entwickeln. Obwohl der Klon A1 in der Lage ist eine Abszessbildung hervorzurufen, ist diese im Vergleich zu der Pathogenität von Klon B2 deutlich geringer ausgeprägt (vgl. 4.1). Nach dem Vergleich der Genexpressionsprofile der *in vitro* kultivierten Trophozoiten der Klone A1 und B2 (vgl. 4.2.1), sollte daher in diesem Versuch eine vergleichende Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Seq von mit A1 oder B2 intrahepatisch infizierten C57BL/6 Mäusen in der frühen Phase der ALA-Bildung durchgeführt werden, um weitere Faktoren zu identifizieren die für die Virulenzentstehung relevant sein könnten. Dafür wurden 6 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden nach Infektion die Lebern der infizierten Tiere entfernt, aus diesen die RNA isoliert und für die mRNA-Seq eingesetzt. Der Versuch wurde mit zwei biologischen Replikaten der jeweils unterschiedlich infizierten murinen Lebern durchgeführt.

Die Transkriptom-Analyse ergab, dass von insgesamt 23420 nachgewiesenen Gensequenzen, über den untersuchten Zeitraum von 24 Stunden, 40 als signifikant differentiell exprimiert angesehen werden können ( $p_{adj} \leq 0,05$ ). 6 Stunden nach Infektion konnten dabei keine Gene als signifikant differentiell exprimiert gefunden werden. 12 Stunden nach Infektion konnten insgesamt 24 Gene als signifikant differentiell exprimiert gefunden werden, wovon 23 Gene eine höhere Expression nach Infektion mit dem apathogenen Klon A1 aufweisen im Vergleich zu den Tieren, die mit dem pathogenen Klon B2 infiziert wurden (Tabelle 4.5). Interessanterweise zeigen auch von 16 signifikant differentiell exprimierten Genen, 24 Stunden nach Infektion, 14 eine erhöhte Expression nach Infektion mit A1 (Tabelle 4.5) auf und nur 2 Gene eine erhöhte Expression nach Infektion mit B2 (Tabelle 4.6), im Vergleich zu den jeweils mit dem anderen Klon infizierten Tieren.

Von den insgesamt 40 signifikant differentiell exprimierten Genen konnten 32 Genen putative biologische Funktionen wie z.B. Protein-Bindung oder Enzym-Aktivität und die Beteiligung an entsprechenden biologischen Prozessen wie z.B. Transport, Signaltransduktion, Regulation, Biosynthese oder Metabolismus zugeordnet werden, wohingegen die übrigen 8 Gene für

Proteine unbekannter Funktion kodieren (Tabellen 4.5 und 4.6). Besonders auffällig bei der Auswertung der GO-Termini ist, dass von den 14 Genen, die 24 Stunden nach Infektion mit dem apathogenen Klon A1 höher exprimiert sind als nach Infektion mit dem pathogenen Klon B2, 8 Genen eine Beteiligung am Cholesterol-, Lipid- und Steroid-Metabolismus sowie deren Biosynthese zugeordnet werden konnte. Zudem weisen diese Gene ein stark erhöhtes Expressionslevel in einem Bereich von ungefähr 700 bis > 30000 auf.

Die Gegenüberstellung der Genexpressionsprofile (Abbildung 4.12) hat gezeigt, dass insgesamt kaum Überlappungen der differentiell exprimierten Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten gefunden werden konnten. Die allgemein am stärksten exprimierten Gene (Expressionslevel ca. 24000 bis > 120000) sind die Serum-Amyloide-A 1 und 2 (Saa1, Saa2), welche zur Familie der Apolipoproteine gehören. Beide Gene sind neben der Zell-Chemotaxis auch an der Akut-Phase-Reaktion beteiligt. Dabei induzieren sie unter anderem die Leukozytenadhäsion und die Bildung proinflammatorischer Zytokine.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt insgesamt auf, dass sich erst 12 Stunden nach Infektion signifikante Unterschiede in der Genexpression von murinen Lebern nach Infektion mit den *E. histolytica* Klonen A1 oder B2 entwickeln. Dabei sind nach der Infektion mit dem Klon A1 deutlich mehr Gene höher exprimiert, als nach Infektion mit dem Klon B2. Von insgesamt 40 signifikant differentiell exprimierten Genen, wurde für 37 Gene eine erhöhte Expression nach Infektion mit dem apathogenen Klon A1 festgestellt.

**Tabelle 4.5: Übersicht über die signifikant höher exprimierten Gene, 12 und 24 Stunden nach intrahepatischer Injektion (*hpi*) in *Mus musculus* mit dem apathogenen Klon A1 mit einem  $\text{padj} \leq 0,05$  im Vergleich zur Infektion mit dem pathogenen Klon B2. (*FC* = *Fold Change*)**

Gen <sup>1</sup>	Expressionslevel		<i>FC</i>	Putative biologische Funktion	Putativer biologischer Prozess	
	12 <i>hpi</i> Klon A1	12 <i>hpi</i> Klon B2				
1	<i>Iqce</i>	42,65	1,38	31,25	unbekannt	unbekannt
2	<i>Kcnj10</i>	21,67	0,69	31,25	Protein-Bindung	Transport, Regulation des Membranpotentials
3	<i>Ankrd54</i>	18,72	0,69	25	Protein-Bindung	Regulation der Signaltransduktion
4	<i>Zfp873</i>	31,14	1,36	22,73	Transkriptionsfaktor-Aktivität	Regulation der Transkription
5	<i>311005</i> <i>6K07Rik</i>	37,73	2,78	13,7	unbekannt	unbekannt
6	<i>Lrrc14b</i>	27,99	2,04	13,7	unbekannt	unbekannt
7	<i>Zfp524</i>	59,39	6,91	8,33	DNA-Bindung	Regulation der Transkription
8	<i>Gfod2</i>	35,68	4,14	8,33	Enzym-Aktivität	Oxidation-Reduktion

9	<i>Rbl1</i>	63,62	8,25	7,69	Protein-Bindung	Regulation der Lipidkinase Aktivität
10	<i>Tgm1</i>	211,54	29,47	7,14	Enzym-Aktivität	Protein-Metabolismus
11	<i>Ube2u</i>	57,77	8,24	7,14	Enzym-Aktivität	Signaltransduktion
12	<i>Coa7</i>	132,82	22,61	5,88	unbekannt	unbekannt
13	<i>Rn4.5s</i>	1240,66	220,49	5,56	Poly(A)-Bindung	unbekannt
14	<i>Itga5</i>	126,27	28,1	4,55	Protein-Bindung	Zelladhäsion, Zellregulation
15	<i>Rpph1</i>	4732,92	1044,84	4,54	unbekannt	unbekannt
16	<i>Dhx57</i>	193,88	48,18	4,0	ATP-Bindung	RNA-Prozessierung
17	<i>Bace1</i>	431,19	116,21	3,7	Enzymbindung, Enzymaktivität	Beta-amyloid Metabolismus, Proteolyse
18	<i>Saa2</i>	85119,03	24279,66	3,57	Protein-Bindung, Chemotaktischer Lockstoff	Zell-Chemotaxis, Akute-Phase-Reaktion
19	<i>Atp6v0a4</i>	45,39	0	0	ATPase-Bindung	Transport
20	<i>Dock3</i>	23,04	0	0	Protein-Bindung	Signaltransduktion
21	<i>Cbx8</i>	20,31	0	0	Protein-Bindung	Regulation
22	<i>Pisd-ps2</i>	18,49	0	0	unbekannt	unbekannt
23	<i>Pde4a</i>	16,90	0	0	Enzym-Aktivität	Signaltransduktion
<b>Gen<sup>1</sup></b>		<b>Expressionslevel</b>		<b>FC</b>	<b>Putative biologische Funktion</b>	<b>Putativer biologischer Prozess</b>
		<b>24 hpi Klon A1</b>	<b>24 hpi Klon B2</b>			
1	<i>Nsdhl</i>	1986,12	323,68	6,25	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und – Biosynthese
2	<i>Dhcr7</i>	684,26	143,33	4,76	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und - Biosynthese
3	<i>Hmgcs1</i>	30357,24	6601,35	4,55	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und - Biosynthese
4	<i>Idi1</i>	18787,68	4050,18	4,55	Magnesium-Bindung, Enzym-Aktivität	Isoprenoid-Biosynthese
5	<i>Rdh11</i>	1169,47	255,15	4,55	Enzym-Aktivität	Metabolismus, Oxidation-Reduktion
6	<i>Fdps</i>	11079,73	2538,4	4,35	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und - Biosynthese
7	<i>Pmvk</i>	1199,96	292,29	4,17	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und – Biosynthese
8	<i>Cyp51</i>	11796,82	2941,37	4	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-,

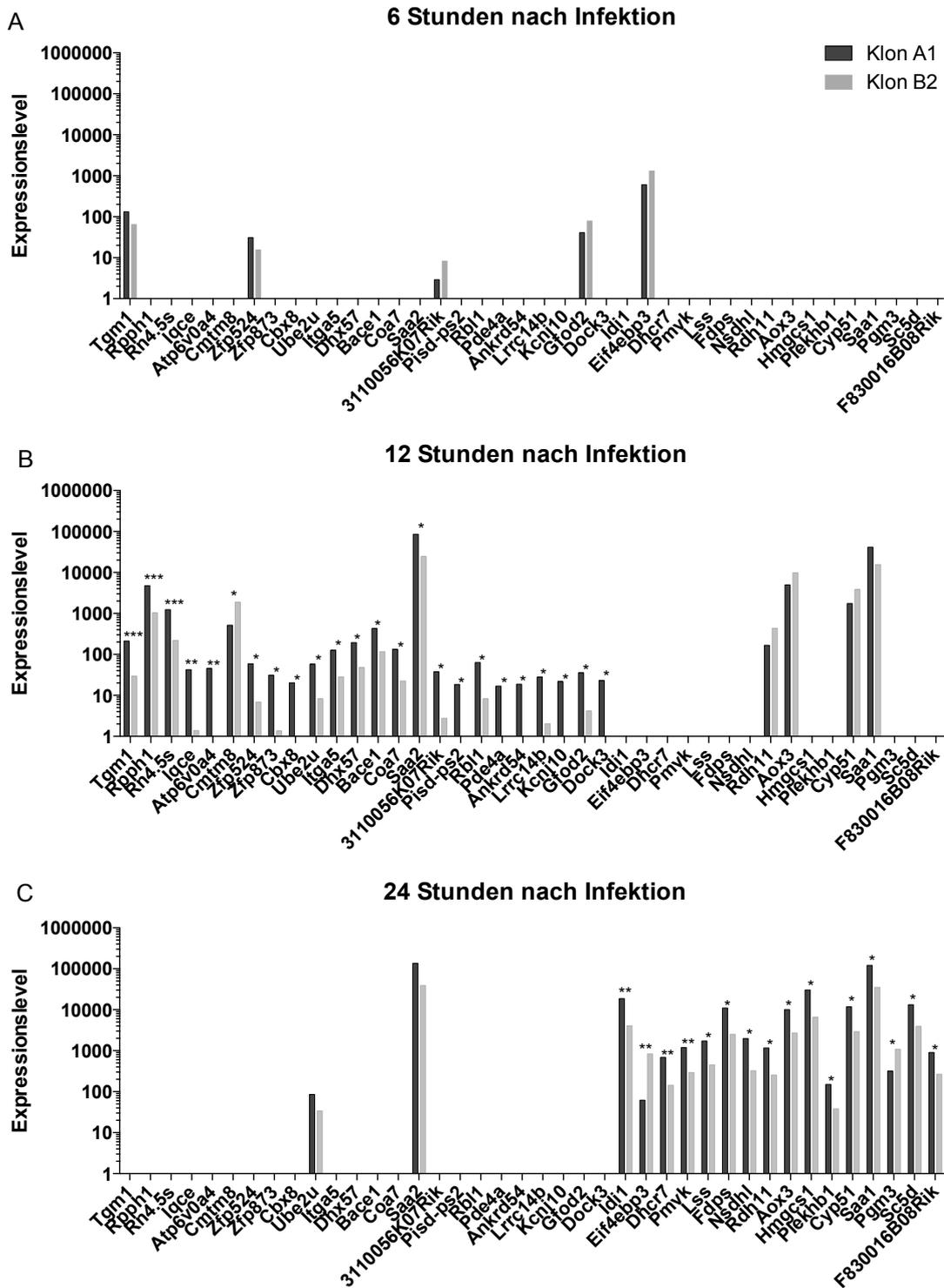
						Steroid-Metabolismus und – Biosynthese
<b>9</b>	<i>Plekhb1</i>	150,91	38,1	4	Protein-Bindung	Multizelluläre Entwicklung
<b>10</b>	<i>Lss</i>	1727,28	447,98	3,85	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und – Biosynthese
<b>11</b>	<i>Aox3</i>	10069,79	2704,44	3,7	Katalytische-Aktivität	Oxidation-Reduktion
<b>12</b>	<i>F83001 6B08Rik</i>	908,08	267,55	3,45	unbekannt	unbekannt
<b>13</b>	<i>Saa1</i>	121594,07	35243,8	3,33	Protein-Bindung, Chemotaktischer Lockstoff	Zell-Chemotaxis, Akute-Phase-Reaktion, Cholesterol-Metabolismus
<b>14</b>	<i>Sc5d</i>	13275,76	3951,21	3,33	Enzym-Aktivität	Cholesterol-, Lipid-, Steroid-Metabolismus und – Biosynthese, Oxidation-Reduktion

<sup>1</sup> = Gen übernommen von NCBI

**Tabelle 4.6: Übersicht über die signifikant höher exprimierte Gene, 12 und 24 Stunden nach intrahepatischer Injektion (*hpi*) in *Mus musculus* mit dem pathogenen Klon B2 mit einem  $\text{padj} \leq 0,05$  im Vergleich zur Infektion mit dem apathogenen Klon A1. (*FC* = *Fold Change*)**

Gen <sup>1</sup>	Expressionslevel		<i>FC</i>	Putative biologische Funktion	Putativer biologischer Prozess	
	12 <i>hpi</i> Klon B2	12 <i>hpi</i> Klon A1				
<b>1</b>	<i>Cmtm8</i>	1893,39	512,88	3,69	Zytokin-Aktivität	Chemotaxis
Gen <sup>1</sup>	Expressionslevel		<i>FC</i>	Putative biologische Funktion	Putativer biologischer Prozess	
	24 <i>hpi</i> Klon B2	24 <i>hpi</i> Klon A1				
<b>1</b>	<i>Eif4ebp3</i>	835,55	62,19	13,43	Eukaryotischer Initiations-Faktor 4E-Bindung	Regulation der Translation
<b>2</b>	<i>Pgm3</i>	1095,98	316,44	3,46	Enzym-Aktivität	Embryonalentwicklung, Spermatogenese, Metabolismus, Protein-Glycosylierung

<sup>1</sup> = Gen übernommen von NCBI



**Abbildung 4.12: Genexpressionsprofil nach intrahepatischer Injektion in *Mus musculus* mit den Klonen A1 und B2 in der frühen Phase der Amöbenleberabszessentstehung.**

Dargestellt ist das relative Expressionslevel von 40 Genen, die in einem Zeitraum von 24 Stunden nach Infektion als signifikant reguliert identifiziert worden sind. **A**, 6 Stunden nach Infektion konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. **B**, Nach 12 Stunden konnten 24 Gene als signifikant exprimiert identifiziert werden. **C**, Diese sind 24 Stunden nach Infektion kaum noch exprimiert, jedoch weisen 16 weitere Gene eine signifikante differentielle Genexpression nach Infektion mit dem Klon A1 oder B2 auf. \*\*\* $p_{adj} \leq 0,001$ ; \*\* $p_{adj} \leq 0,01$ ; \* $p_{adj} \leq 0,05$ .

### **4.3 *In vivo* Visualisierung von *Entamoeba histolytica* Trophozoiten mittels Magnetresonanztomographie**

Der Einsatz Superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel (SPIO) zur Markierung unterschiedlicher Zellpopulationen ist eine etablierte Methode zur nicht-invasiven *in vivo*-Detektion in der Magnetresonanztomographie (MRT). SPIO-Partikel führen im MRT bei einer sehr hohen räumlichen Auflösung zu Suszeptibilitätsartefakten die als schwarze Signalauslöschungen (negativer Kontrast) detektiert werden und so die Analyse auf Einzelzellebene ermöglichen. Die *in vivo*-Visualisierung der Migration von SPIO-markierten pathogenen Parasiten nach experimenteller Tierinfektion stellt somit eine neue Methode zur Analyse auf Einzelzellebene dar.

In Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) konnte bereits erfolgreich ein System zur *in vitro*-Analyse von SPIO-markierten Trophozoiten entwickelt werden. Voraussetzung für diese Untersuchungen ist die Internalisierung der SPIO-Partikel durch die Amöben. Da unterschiedliche SPIO-Typen stark in ihrer Zusammensetzung und Größe variieren wurde in vorangegangenen Versuchen der Einfluss verschiedener SPIOs auf das Wachstumsverhalten, die Erythrophagozytosefähigkeit und die Zytopathogenität von *E. histolytica* Trophozoiten *in vitro* untersucht (Fehling *et al.*, 2015). Dabei stellten sich nano-screenMAG-PEG/P (Chemicell) mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 100 bis 200 nm als die am besten geeigneten SPIOs heraus. Diese wurden für die Untersuchung des nicht-invasiven Tracking eines pathogenen Parasiten *in vivo* eingesetzt. Im Rahmen dieser Studie sollte die Effizienz der magnetischen Markierung von *E. histolytica* im immunkompetenten Mausmodell analysiert werden und als Basis für weitere Studien zur *in vivo*-Motilität und Streuung von *E. histolytica* dienen. Alle Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Mareen Zaruba (BNITM) durchgeführt. Für die Versuche wurde ausschließlich der pathogene *E. histolytica* Klon B2 verwendet.

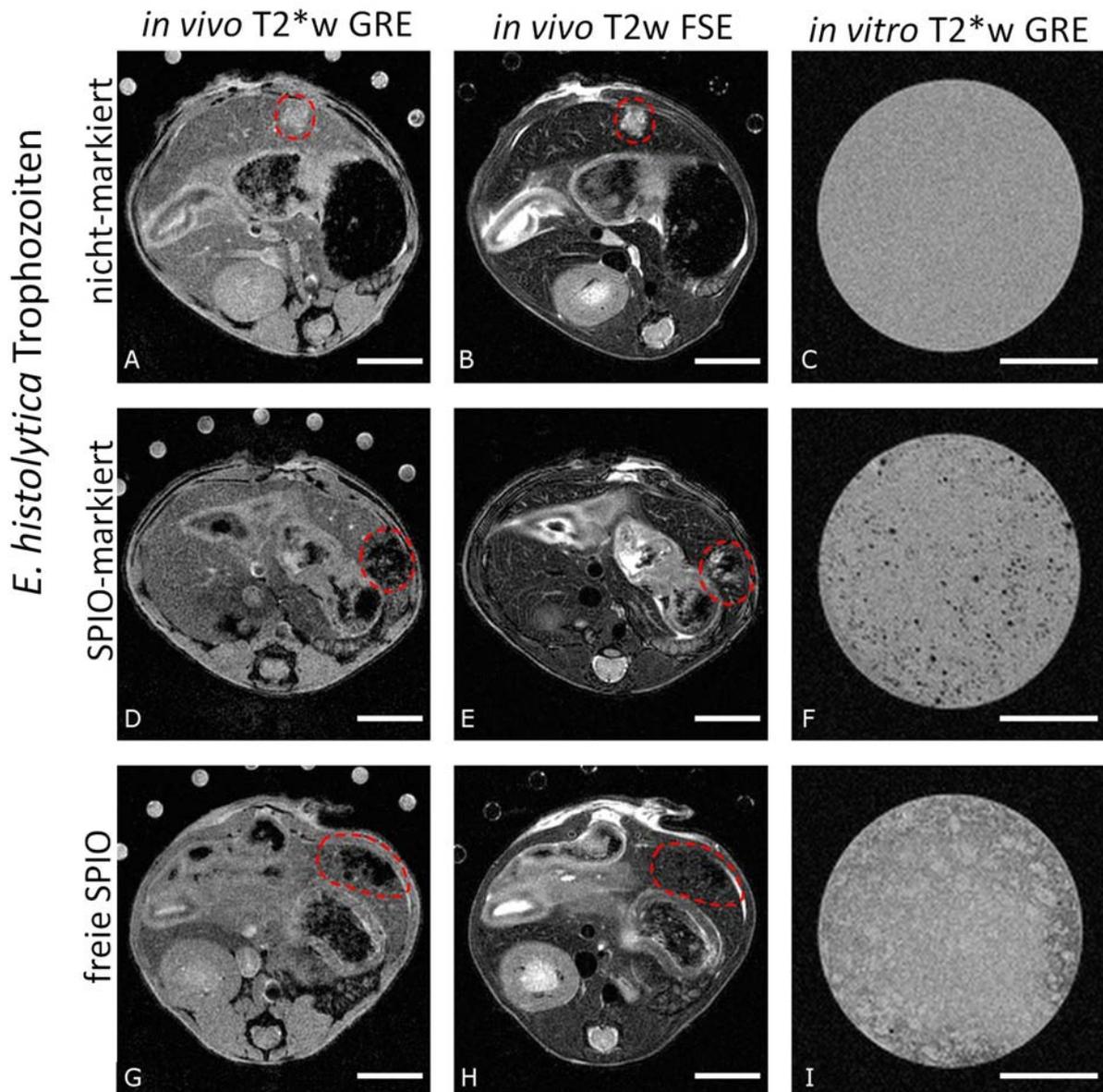
#### **4.3.1 Vergleichende *in vivo* und *in vitro* Darstellung von *E. histolytica* Trophozoiten des pathogenen Klons B2 nach SPIO-Markierung mittels MRT**

Die Darstellung SPIO-markierter Trophozoiten *in vivo* mittels MR-Bildgebung wird durch die Eigenschaft von *E. histolytica* SPIO-Partikel zu internalisieren ermöglicht. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  Trophozoiten für 18 Stunden mit  $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  SPIO (100 nm)-Partikeln unter anaeroben Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Immunkompetenten C57Bl/6 Mäusen wurden intrahepatisch  $1,25 \times 10^5$  nicht-markierte und SPIO-markierte Trophozoiten sowie freie SPIO-Partikel injiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Tiere mittels MRT untersucht. Um die *in vivo* Daten

mit den *in vitro* Daten vergleichen zu können, wurden zusätzlich den Proben entsprechende Agarosegel-Phantome angefertigt und ebenfalls im MRT untersucht (Abbildung 4.13). Zur Darstellung der Abszessstrukturen wurden die Bilder in der T2 gewichteten FSE Sequenz (T2w FSE) aufgenommen, die Detektion der SPIO-bedingten Signalauslöschung erfolgte in der T2 gewichteten\* GRE Sequenz (T2w\* GRE).

Wie zu erwarten induziert die Injektion von nicht-markierten Trophozoiten in die Leber keinen negativen Kontrast in der T2\*w GRE Sequenz (Abbildung 4.13 A), obwohl in der T2w FSE Sequenz ein deutlich hyperintenser Herd im linken lateralen Leberlappen zu erkennen ist. Dieser stellt die Abszessstruktur dar, welche aufgrund eines parenchymalen Ödems und einer zentralen ALA-Nekrose sichtbar ist (Abbildung 4.13 B). Dieser *in vivo*-Beobachtung entsprechend konnte auch keine Signalauslöschung *in vitro* detektiert werden (Abbildung 4.13 C). Nach Injektion von SPIO-markierten Trophozoiten sind in der T2\*w GRE Sequenz SPIO-bedingte Signalauslöschungen detektierbar (Abbildung 4.13 D) und in der T2w FSE Sequenz die charakteristischen hyperintensiven Abszessstrukturen zu erkennen (Abbildung 4.13 E). In dem analogen Agarosegel-Phantom sind ebenfalls SPIO-bedingte Signalauslöschungen zu erkennen (Abbildung 4.13 F). Freie SPIO-Partikel induzieren im linken Leberlappen zwar einen fokalen negativen Kontrast (Abbildung 4.13 G) aber in der T2w FSE Sequenz keine hyperintensiven Abszessstrukturen (Abbildung 4.13 H). Die in Agarosegel eingebetteten freien SPIO-Partikel rufen nur einen schwachen homogenen negativen Kontrast hervor (Abbildung 4.13 I).

Somit wird nach Injektion nicht-markierter Trophozoiten des pathogenen *E. histolytica* Klons B2 eine Abszessbildung, jedoch keine SPIO-bedingte Signalauslöschung induziert. SPIO-markierte Trophozoiten induzieren neben der Abszessbildung auch einen negativen Kontrast der internalisierten SPIO-Partikel, wohingegen nach Injektion freier SPIO-Partikel keine Abszessstrukturen, jedoch Signalauslöschungen detektiert werden können.



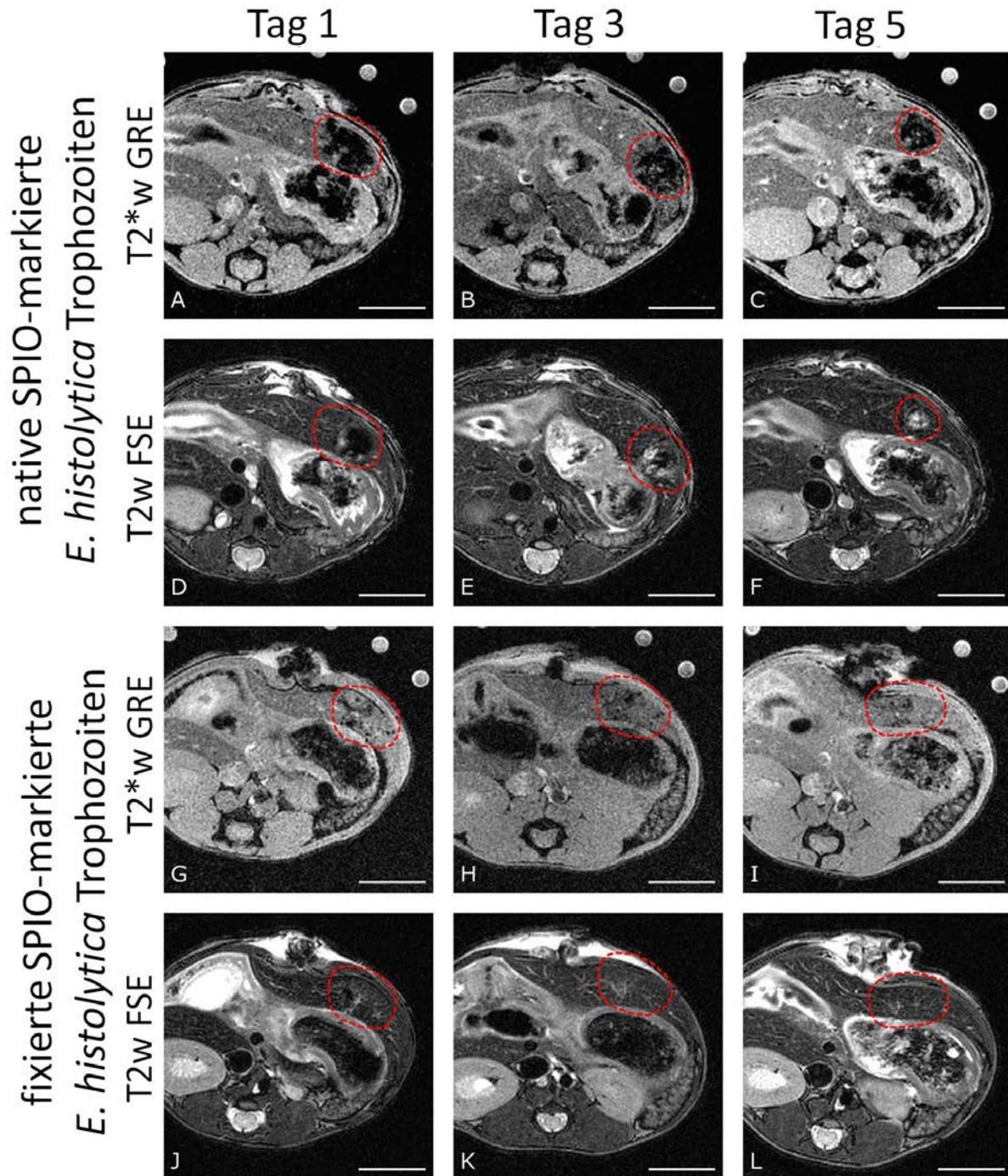
**Abbildung 4.13: Exemplarische Darstellung der MR-Bildgebung von Mauslebern nach intrahepatischer Injektion von nicht-markierten und SPIO-markierten *E. histolytica* Trophozoiten sowie freien SPIO-Partikeln zusammen mit den entsprechenden in Agarosegel eingebetteten Korrelaten.**

C57BL/6-Mäuse wurden drei Tage nach Infektion mit der T2\*w GRE (A, D, G) und der T2w FSE (B, E, H) Sequenz analysiert. Die Agarosegel-Phantome wurden ausschließlich in der T2\*w GRE Sequenz dargestellt (C, F, I). Nicht-markierte *E. histolytica*-Trophozoiten induzieren in T2\*w GRE Sequenz keinen negativen Kontrast (A), weisen in der T2w FSE Sequenz aber Abszessstrukturen auf (B). Nicht-markierte *E. histolytica*-Trophozoiten induzieren *in vitro* ebenfalls keinen negativen Kontrast in der T2\*w GRE Sequenz (C). SPIO-markierte Trophozoiten führen dagegen zu einer SPIO-bedingten Signalauslöschung und weisen eine weite Ausbreitung der Partikel im linken lateralen Leberlappen auf (D), welcher mit dem hyperintensiven Abszessbereich übereinstimmt (E). SPIO-bedingte Signalauslöschung in Agarosegel-eingebetteten SPIO-markierten Trophozoiten (F). Die intraparenchymale Injektion freier SPIO-Partikel führt zu einer Signalauslöschung im linken Leberlappen (G), jedoch nicht zur Induktion von Abszessstrukturen in der T2w FSE Sequenz (H). In Agarosegel-eingebettete freie SPIO-Partikel induzieren einen schwachen homogenen negativen Kontrast (I). Die eingefügten Maßstabsleisten entsprechen 5 mm.

#### 4.3.2 Einfluss von SPIO-Partikeln auf die Abszessentwicklung

Die Markierung von *E. histolytica* Trophozoiten mit SPIO-Partikeln zeigt *in vitro* keinen Einfluss auf die Wachstumsrate oder die phagozytischen Fähigkeiten der Parasiten. Ob SPIO-Partikel *in vivo* einen Einfluss auf die Abszessentwicklung und somit auf die Pathogenität von *E. histolytica* haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dazu wurden immunkompetenten C57Bl/6-Mäusen entweder  $1,25 \times 10^5$  SPIO-markierte, viable Trophozoiten oder mit Formalin fixierte SPIO-markierte Trophozoiten intrahepatisch injiziert. An den Tagen 1, 3 und 5 nach Injektion erfolgte die Analyse mittels MRT. Die Aufnahmen in der T2\*w GRE Sequenz zeigen eine deutliche Ausbreitung des negativen Kontrasts im linken lateralen Leberlappen nach Infektion mit SPIO-markierten, viablen Trophozoiten (Abbildung 4.14 A-C) sowie deutliche hyperintense Abszessstrukturen in der T2w FSE Sequenz (Abbildung 4.14 D-F). Die dunkle Strukturveränderung im Zentrum der Abszesse (Abbildung 4.14 D,E) ist auf eine injektionsbedingte Artefaktblutung zurückzuführen. Nach Infektion mit fixierten SPIO-markierten Trophozoiten ist in den T2\*w GRE Aufnahmen hingegen nur eine punktuelle, schwache Ausbreitung des negativen durch die SPIOs hervorgerufenen Kontrasts zu erkennen (Abbildung 4.14 G-I), Abszessstrukturen konnten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.14 J-L).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich sagen, dass eine Formalinfixierung der Trophozoiten die Entstehung des ALAs verhindert. Die Markierung der Trophozoiten mit SPIO-Partikeln zeigt keinen Einfluss auf die Pathogenität der Amöben.

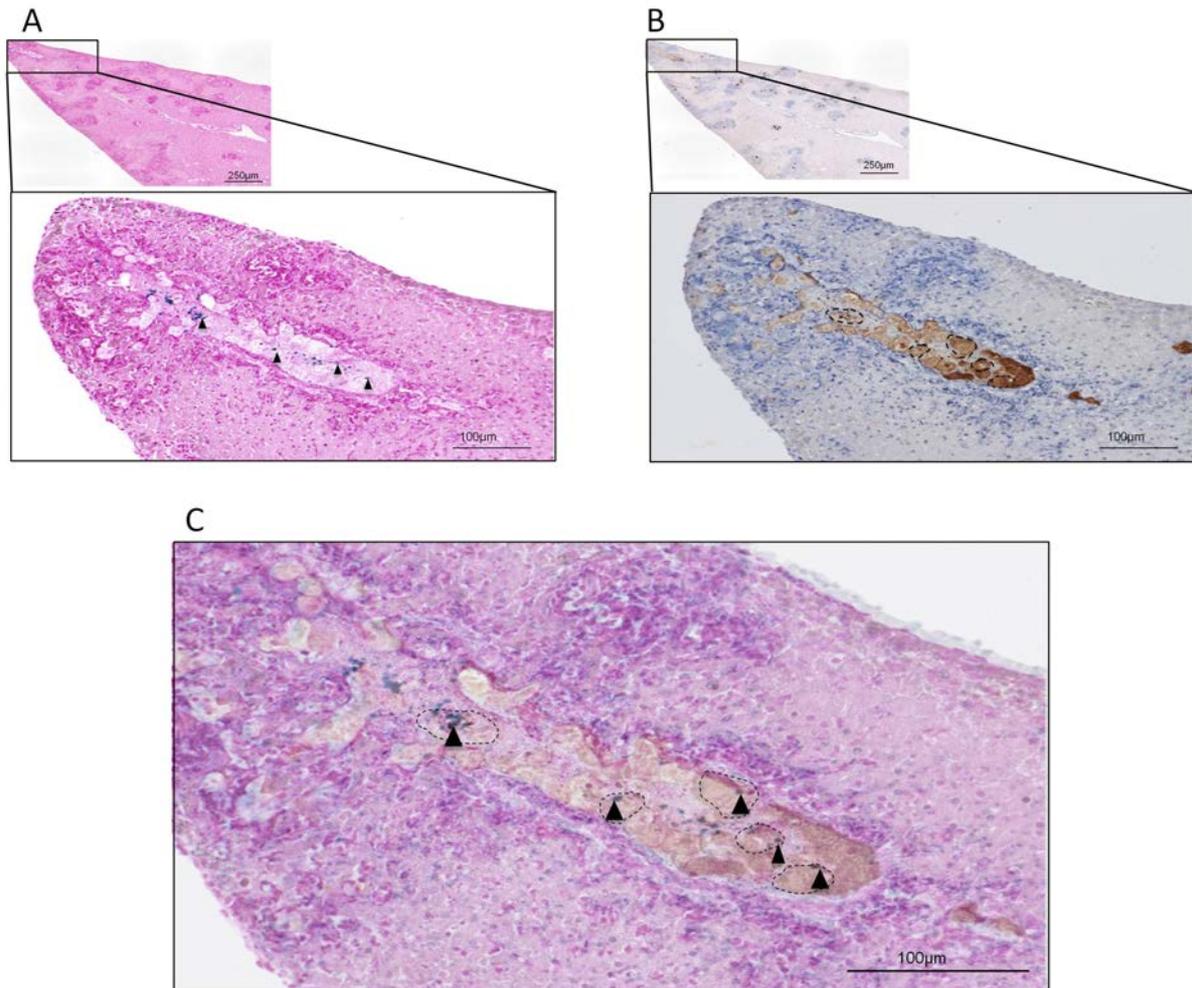


**Abbildung 4.14: Ausbreitung von viablen und Formalin-fixierten SPIO-markierten *E. histolytica* Trophozoiten und deren Einfluss auf die Abszessentwicklung an den Tagen 1, 3 und 5 nach intrahepatischer Infektion.**

**A-C**, Ausdehnung SPIO-bedingter Signalauslöschung in der Leber einer C57Bl/6 Maus nach intrahepatischer Injektion von markierten Trophozoiten in der T2\*w GRE Sequenz. **D-F**, Entwicklung hyperintenser Abszessbereiche im linken lateralen Leberlappen derselben Maus aufgenommen in der T2w FSE Sequenz. **G-I**, Ausbreitung des negativen Kontrasts in einer Mäuseleber nach intrahepatischer Injektion von Formalin-fixierten SPIO-markierten *E. histolytica*-Trophozoiten in der T2\*w GRE Sequenz. **J-L**, Abwesenheit von hyperintensiven Abszessstrukturen im linken lateralen Leberlappen derselben Maus in der T2w FSE Sequenz. Die eingefügten Maßstabsleisten entsprechen 5 mm.

### **4.3.3 Histologische Darstellung von SPIO-markierten *E. histolytica* Trophozoiten im Amöbenleberabszess**

Die Injektion von SPIO-markierten Trophozoiten in eine murine Leber zeigt eine deutliche Ausbreitung der Signalauslöschung im MRT (Abbildung 4.15). Um zu bestätigen, dass es sich bei dieser Verteilung des negativen Kontrasts um Trophozoiten handelt die SPIO-Partikel internalisiert haben, sollte ein histologischer Lokalisationsnachweis erbracht werden. Dazu wurde 24 Stunden nach intrahepatischer Infektion mit  $1,25 \times 10^5$  SPIO-markierten Trophozoiten des *E. histolytica* Klons B2 die Leber entnommen, Gewebsschnitte angefertigt und diese mit unterschiedlichen Färbemethoden analysiert. Die Berliner-Blau-Färbung dient dem Nachweis von SPIO-Partikeln im Gewebe. Im Präparat stellen sich die Zellkerne rot und die Eisenablagerungen blau dar (Abbildung 4.15 A). Zur Detektion der Trophozoiten wurden die Leberschnitte mit einem Serumpool aus Amöben-spezifischen Antikörpern gefärbt, welche im Präparat braun dargestellt sind (Abbildung 4.15 B). Diese Visualisierung verdeutlicht, dass multiple Herde von einzelnen Trophozoiten und Immunzellen über den gesamten Leberlappen verteilt sind. Die höhere Auflösung fokussiert sich auf einen Bereich, in dem die Trophozoiten sich in Clustern zusammenlagern und von einem Saum aus Immunzellen (blau gefärbt) umgeben sind (Abbildung 4.15 B). Die SPIO-Partikel sind ausschließlich in demselben Bereich des Leberlappens detektierbar (Abbildung 4.15 A). Eine Überlagerung der beiden Färbungen belegt eindeutig, dass die SPIO-Partikel innerhalb der Trophozoiten lokalisiert sind (Abbildung 4.15 C).



**Abbildung 4.15: Kolokalisierung von SPIO-Partikeln und *E. histolytica* Trophozoiten in der Mausleber 24 Stunden nach intrahepatischer Infektion.**

**A**, Die Berliner-Blau-Färbung der Leber weist SPIOs (blau, gekennzeichnet mit Pfeilen) und Zellkerne (rot) nach. **B**, Immunhistologische Färbung von *E. histolytica* (braun, gekennzeichnet mit gestrichelten Kreisen) mit einem Serumpool aus amöbenspezifischen Antikörpern (Verdünnung 1:50000) und Hämalaun-Gegenfärbung zur Visualisierung der Zellkerne (blau). **C**, Die Überlagerung der immunhistologischen Färbung von *E. histolytica* und der Berliner-Blau-Färbung zeigt Trophozoiten (gestrichelter Kreise) mit internalisierten SPIO-Partikeln (Pfeile).

## 5. Diskussion

Das klinische Bild einer Infektion mit dem humanpathogenen Protozoon *E. histolytica* ist sehr variabel. Dabei stellen die invasiven Verlaufsformen eine große Herausforderung für den Parasiten dar, da sie in unterschiedlichen Milieus überleben müssen und dabei den Abwehrmechanismen ihres Wirtes ausgesetzt sind. Unabhängig von der Tatsache, dass die Prävalenz des Parasiten bei Frauen und Kindern höher ist, stellen ca. 80% der Patienten, die einen Amöbenleberabszess entwickeln, Männer mittleren Alters dar (Blessmann *et al.*, 2002). Demnach ist anzunehmen, dass neben Pathogenitätsfaktoren des Parasiten, Wirtsfaktoren wie die geschlechtsspezifische Immunantwort eine Rolle bei der Amöbenleberabszessentwicklung spielen. Trotzdem sind die Ursachen, weshalb eine Infektion mit *E. histolytica* entweder asymptomatisch oder invasiv verlaufen kann und dabei von schwerwiegenden klinischen Manifestationen wie z.B. dem Amöbenleberabszess begleitet wird, weitestgehend ungeklärt. Auch die jüngste Entdeckung des für die Gewebeerstörung durch *E. histolytica* verantwortlichen Mechanismus, der amöboiden Trogozytose, begründet zwar wie es zum programmierten Tod der Wirtszellen kommt (Ralston *et al.*, 2014), jedoch nicht welcher Faktor den Parasiten dazu befähigt invasiv zu werden. Zudem wurde in dieser Studie nur das pathogene Isolat HM-1:IMSS analysiert und somit bleibt die Frage offen, ob auch apathogene Amöben diesem Mechanismus nutzen.

Auf der Seite des Parasiten konnten bisher drei Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden, die Cysteinpeptidasen, *Amoebapores* und Lectine (Clark *et al.*, 2007). Jedoch wurden diese sowohl in pathogenen als auch in apathogenen *E. histolytica*-Isolaten gefunden (Davis *et al.*, 2007). Diverse in der Literatur beschriebene vergleichende Transkriptom-Studien, in denen pathogene und apathogene Isolate einander gegenübergestellt worden sind, weisen jedoch Defizite auf, da die analysierten Isolate unterschiedliche genetische Hintergründe besitzen (Clark *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2007; MacFarlane *et al.*, 2006; Ehrenkauer *et al.*, 2007). Studien, die sich mit den wirtsspezifischen Mechanismen während einer Amöbeninfektion befassen, konnten ebenfalls Faktoren wie Leber-residente Kupferzellen und inflammatorische TNF $\alpha$  produzierende Ly6C-exprimierende Monozyten identifizieren, die bei der Gewebeerstörung involviert sind (Helk *et al.*, 2013), jedoch wurden auch diese Analysen ausschließlich mit pathogenen Isolaten durchgeführt, so dass der Vergleich zu inapparenten Verlaufsform der Amöbiasis fehlt (Ventura-Juárez *et al.*, 2003, Lotter *et al.*, 2006; Marie *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2011; Helk *et al.*, 2013). Demnach mangelt es an Studien, die pathogene und apathogene Amöben vergleichend analysieren, und die Pathogenitätsfaktoren des Parasiten als auch die durch sie ausgelösten Mechanismen im Wirt gegenüberstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Ansatz zur Identifizierung neuer putativer Pathogenitätsfaktoren des Parasiten als auch des Wirtes, verfolgt, indem die beiden syngeneten, sich in ihrer Pathogenität unterscheidenden *E. histolytica* Klone A1 und B2 in einem direkten Vergleich gegenübergestellt wurden. Dabei wurden Transkriptionsprofile der beiden klonalen Zelllinien und von murinen, mit den entsprechenden Klonen infizierten Lebern erstellt. Zusätzlich wurden zwei neue Methoden zur Analyse der Genexpression und der Motilität der Amöben *in vivo* etabliert. Das Zusammenführen der Befunde aus diesen Untersuchungen ermöglicht es den molekularen Mechanismus der Pathogenität näher zu charakterisieren.

### **5.1 Charakterisierung der Pathogenität der *E. histolytica* Klone A1 und B2 in zwei Tiermodellen der Amöbiasis**

Die Fähigkeit von *E. histolytica* im Tiermodell Abszesse zu induzieren ist ein wichtiger Indikator für die Pathogenität. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Zelllinien A und B hinsichtlich ihrer Pathogenität im Tiermodell unterscheiden. So ist nur die Zelllinie B im Tiermodell dazu befähigt Amöbenleberabszesse zu induzieren wohingegen die Zelllinie A diese Fähigkeit verloren hat (Biller *et al.*, 2009). Der Vergleich der Transkriptome und Proteome beider Zelllinien führte bereits zur Identifizierung einer Vielzahl potentieller Pathogenitätsfaktoren (Biller *et al.*, 2010). Die Analyse der aus den Zelllinien generierten Klone hat gezeigt, dass alle Klone, die aus Zelllinie A generiert wurden für apathogen befunden werden können, und alle Klone, die aus Zelllinie B generiert wurden, Variationen in ihrem Grad der Virulenz aufzeigen, die sich von avirulent bis hin zu hochgradig virulent darstellen (Dissertation Matthiesen, 2012; Abbildung 1.2). Mithilfe von Subklonierungen konnte gezeigt werden, dass der entsprechende Phänotyp der Klone stabil bleibt. Bei diesen Untersuchungen wurden die Abszessgrößen in *Meriones unguiculatus* an Tag 7 nach Infektion bestimmt. Aufgrund der bereits erzielten Ergebnisse wurden für diese Arbeit der apathogene Klon A1 und der hoch-pathogene Klon B2 ausgesucht, um diese näher zu charakterisieren. Zur Bestätigung der Ergebnisse im immunkompetenten Mausmodell und zur Erstellung von Zeitverläufen der ALA-Bildung wurden sowohl C57BL/6-Mäuse als auch *Meriones unguiculatus* mit den Klonen A1 und B2 infiziert und diese an Tag 3, Tag 5, Tag 7 und Tag 10 nach Infektion mittels Magnetresonanztomographie (MRT) analysiert. Dieses bildgebende Verfahren ermöglicht die Analyse der Abszessentwicklung in demselben Individuum über einen längeren Zeitraum. Dabei zeigte sich, dass die Klone A1 und B2 in beiden Amöbiasis-Tiermodellen unterschiedliche Fähigkeiten zur ALA-Induktion aufweisen. Obwohl der Klon A1 in der Lage ist eine Abszessbildung hervorzurufen, sind die Abszesse in Vergleich zu Klon B2 deutlich kleiner ausgeprägt. In beiden Tiermodellen konnten nach Infektion mit dem Klon A1 an Tag 7 und Tag 10 nur sehr kleine bis gar keine Abszessen mehr detektiert werden.

Somit konnten die aus vorherigen Versuchen gewonnenen Daten in beiden Tiermodellen verifiziert werden, jedoch wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass der zuvor als apathogen definierte Klon A1, an Tag 3 und Tag 5 nach Infektion in der Lage ist einen Amöbenleberabszess zu induzieren, sich jedoch durch eine deutlich schnellere Regeneration des Lebewebes gegenüber von den mit B2 infizierten Tieren unterscheidet. Deshalb wird die Definition apathogen für den Klon A1 im Folgenden beibehalten.

Basierend auf der Analyse der Abszessgrößen im Zeitverlauf zweier Amöbiasis-Tiermodelle konnten die unterschiedlichen pathogenen Eigenschaften der Klone A1 und B2 näher charakterisiert werden. Zudem konnte sichergestellt werden, dass, abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung, beide Tiermodelle für die Untersuchungen von potentiellen Pathogenitätsfaktoren geeignet sind und somit eine solide Basis für weiterführende Analysen darstellen.

## 5.2 Vergleichende Transkriptom-Analysen

Die sich in ihrer Pathogenität unterscheidenden syngenen *E. histolytica*-Klone A1 und B2 stellen ein ideales Werkzeug dar, um die Ursache der Pathogenität von *E. histolytica* aufzuklären. Vergleichende Transkriptom-Analysen zwischen dem apathogenen Klon A1 und dem pathogenen Klon B2 bieten die Möglichkeit, Informationen über pathobiologische Mechanismen zu gewinnen. Dafür wurde in dieser Arbeit die Technologie der mRNA-Sequenzierung (mRNA-Seq) gewählt, um (1) die Transkriptome des Klons A1 und des Klons B2 und (2) Transkriptome muriner Lebern nach intrahepatischer Infektion mit den beiden Klonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der ALA-Bildung miteinander zu vergleichen. Dabei wurden Transkripte identifizieren, die differentiell exprimiert werden und somit als mögliche Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* oder des Wirtes in Betracht gezogen werden können. Zusätzlich wurde ein Protokoll etabliert, welches es ermöglicht die Genexpression aus der Leber reisolierter Trophozoiten zu analysieren und somit eine Möglichkeit zur Analyse der Genexpression *in vivo* darstellt.

### 5.2.1 mRNA-Seq der *in vitro* kultivierten *E. histolytica* Klone A1 und B2

Die durchgeführte mRNA-Seq zeigte insgesamt 142 signifikant differentiell exprimierte Transkripte zwischen den *in vitro* kultivierten *E. histolytica* Klonen A1 und B2. Zur weiteren Eingrenzung der Anzahl wurde der *Fold Change* auf  $\geq 3$  gesetzt, so dass eine Liste von insgesamt 76 Kandidatengenen erstellt werden konnte. Von diesen 76 Genen zeigen 46 Gene eine höhere Expression in dem Klon A1 und 30 Gene eine höhere Expression in dem Klon B2. Anhand einer stichprobenartigen Verifizierung von 28 ausgesuchten Genen, konnte eine

differentielle Expression für 25 Gene mit der unabhängigen Methode der qPCR die mittels mRNA-Seq erzielten Ergebnisse bestätigen. 54 dieser differentiell exprimierten Gene konnten putative biologische Funktionen der entsprechenden Proteine wie z.B. eine Beteiligung an der Stressantwort, dem Proteintransport, am Metabolismus oder eine Enzymaktivität zugeordnet werden, wohingegen die übrigen 22 Gene für Proteine unbekannter Funktion kodieren (Tabellen 4.1 und 4.2).

Die Gene, die in dem Klon A1 höher exprimiert vorliegen, sind laut GO-Termini hauptsächlich am Proteintransport, der Signaltransduktion oder der Stressantwort beteiligt. Die höchsten *Fold-Change*-Werte wurden dabei für Gene gefunden, die C2-Domänen-Proteine (EhC2-3, EhC2-5, EhC2-2) und den GTPasen der Rab-Familie (EhRab7D, EhRab7E, EhRab7G) kodieren. Die C2-Domäne ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Membran-*Targeting*-Modul, welches in Proteinen gefunden wird, die maßgeblich am Membrantransport und bei der Signaltransduktion involviert sind (Biller *et al.*, 2010). Rab-Proteine sind essentiell für die Regulation des Vesikel-Transports in endozytischen und exozytischen Sekretionswegen eukaryotischer Zellen (Zerial und McBride, 2001). Insbesondere Rab7 wurde als eines der wichtigsten Moleküle, welches in der lysosomalen Biogenese involviert ist, beschrieben (Mullins und Bonifacio, 2001). *E. histolytica* besitzt mehr als 90 *rab* Gene und stellt somit einen Organismus mit diversen und komplexen Rab-Funktionen dar (Saito-Nakano *et al.*, 2005). Für *E. histolytica* sind neun EhRab7 Isotypen (EhRab7A-I) bekannt, die untereinander 40-65% Homologie aufweisen. EhRab7A und EhRab7B konnte bereits eine wichtige Rolle bei der Biogenese der Phagosomen zugeschrieben werden (Saito-Nakano *et al.*, 2007). Demnach stehen die Prozesse mit Rab7-Beteiligung in einem engen Zusammenhang mit der Antigenpräsentation, der Zellsignalisierung, dem Zellüberleben und der Bekämpfung von mikrobiellen Infektionen. Dementsprechend führen Mutationen oder Dysfunktionen von Rab7 zu Beeinträchtigungen von Transportmechanismen, was verschiedene Krankheiten wie Neuropathie, Krebserkrankungen oder Störungen des Lipidmetabolismus zur Folge haben kann (Zhang *et al.*, 2009). Interessanterweise weist der pathogenen Klon B2 mit relativen Expressionen von < 10 einige der geringsten Expressionswerte für diese Gene auf. Ein weiteres Gen, welches in dem Klon A1 fast 150-fach höher exprimiert ist als in dem Klon B2, ist das Transkript der Zelloberflächen-Protease gp63 (EhMP8-2). Für *E. histolytica* konnten die EhMP8-2 noch nicht näher charakterisiert werden. Erste Studien von EhMP8-1, die ebenfalls zu den Zelloberflächen-Proteasen gp63 zählt, zeigten jedoch bereits eine Beteiligung bei der Regulation der Zelladhärenz, der Zellmotilität und der Phagozytose (Teixeira *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte für die EhMP8-1 bereits gezeigt werden, dass Vakzinierung von Tieren mit rekombinanten Fragmenten von EhMP8-1 signifikant die Abszessbildung reduziert und somit ein potentielles Ziel für die Therapie oder Prävention der invasiven Amöbiasis darstellen könnte (Roncolato *et al.*, 2015). In Leishmanien existiert das Homolog *Leishmanolysin*, welches haupt-

sächlich als stark glykolisiertes Protein an der äußeren Membran der Promastigoten Leishmanienformen auftritt. Dort übernimmt es eine Rolle bei der Resistenz der Parasiten gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse. Des Weiteren ist es auch an der Rezeptor-vermittelten Aufnahme des Parasiten mittels Phagozytose durch die Wirtszellen, den Makrophagen, beteiligt und wird ebenfalls als potentieller Vakzinkandidat gehandelt (Yao *et al.*, 2003; Singh und Sundar, 2012). Jedoch können Homologe dieses Proteins in den meisten Eukaryoten nachgewiesen werden (Yao *et al.*, 2003; Gomis-Ruth, 2009).

Die C2-Domänen-Proteine, die Rab-Proteine als auch die Zelloberflächen-Protease gp63 wurden bei der zuvor durchgeführten vergleichenden Transkriptom-Analyse der Zelllinien A und B ebenfalls als differentiell erhöht in der Zelllinie A gefunden werden (Biller *et al.*, 2010). Somit konnten die mittels *Microarray* erzielten Daten für die Zelllinie A mit dem aus dieser Zelllinie generierten Klon A1 mittels mRNA-Seq bestätigt werden. Dabei scheint die niedrigere Pathogenität der Zelllinie A bzw. des daraus resultierenden Klons A1 einem anderem Mechanismus zu Grunde zu liegen als die des apathogenen Isolats Rahman, da kaum Überschneidungen in den differentiell exprimierten Genen gefunden wurden (Biller *et al.*, 2010).

Die Gene, die in dem pathogenen Klon B2 höher exprimiert sind als in dem apathogenen Klon A1 und die höchsten *Fold-Change*-Werte (> 5-fach) aufweisen, kodieren hauptsächlich für hypothetische Proteine und für zwei Tyrosin-Kinasen. Tyrosin-Kinasen gehören zu den wichtigsten Regulatoren der intrazellulären Signaltransduktion bei einer Entzündungsantwort wie z.B. der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen (Sim *et al.*, 2010). So konnte z.B. bereits gezeigt werden, dass Tyrosin-Kinasen in der reaktiven-Sauerstoff-Spezies-vermittelten Aktivierung von MAP-Kinasen während der durch *E. histolytica* induzierten Apoptose von Neutrophilen involviert sind (Sim *et al.*, 2010). Die erhöhte Expression von Tyrosin-Kinasen in dem pathogenen Klon B2 könnte also ein Indiz für eine Abwehrstrategie des Parasiten gegenüber der Immunantwort des Wirtes sein, die ihm im Vergleich zu dem apathogenen Klon A1 ein längeres Überleben in der Wirtsleber gewährleisten könnte. Erstaunlicherweise konnte in B2 keiner der bekannten Pathogenitätsfaktoren, die Cysteinpeptidasen, *Amoebapores* oder Lectine, differentiell erhöht gefunden werden. In den *Microarray*-Analysen von Biller und Kollegen wurden dagegen signifikant erhöhte Transkriptmengen der Cysteinpeptidase A4 in der Zelllinie B nachgewiesen. Da es sich bei der Zelllinie B jedoch wie bereits erwähnt um eine Mischkultur handelt und die daraus abgeleiteten Klone B1-12 eine große Varianz in ihren pathogenen Eigenschaften aufweisen, wären weiterführende Analysen der Transkriptomprofile von weiteren Klonen von Interesse. Insbesondere der als apathogen definierte Klon B8, der an Tag 7 nach Infektion in *Meriones unguiculatus* keinen Amöbenleberabszess mehr verursacht, könnte für die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren verwendet werden.

### 5.2.1.1 Einfluss der identifizierten Gene auf die Amöbenleberabszessbildung im Mausmodell

Zur Untersuchung der Einflüsse der identifizierten Gene auf die Amöbenleberabszessbildung und somit auf die Pathogenität wurden transgene Klone, in welchen die Expression der Kandidatengene entweder inhibiert (*silencer*) oder erhöht (Überexprimierer) wurde, freundlicherweise von Dr. J. Matthiesen und Herrn M. Meyer zur Verfügung gestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Amöbenleberabszessbildung an Tag 7 nach intrahepatischer Infektion im immunkompetenten Mausmodell analysiert. Dabei wurde die Expression eines Gens, welches z.B. in dem apathogenen Klon A1 gegenüber dem pathogenen Klon B2 als signifikant erhöht gefunden wurde inhibiert, um einen pathogenen Phänotyp herbeizuführen. *Vice versa* würde die Überexpression dieses Gens in dem pathogenen Klon B2 zu einer Umwandlung in einen apathogenen Phänotyp führen.

Die Analyse von 13 Genen, die in der Transkriptom-Analyse in einem der Klone als differenziell erhöht exprimiert identifiziert worden sind, ergab einen signifikanten Einfluss von drei Genen auf die Pathogenität. Die Überexpression der Gene *ehmp8-2*, *ehc2-3* und des hypothetischen Proteins EHI\_075690 in dem pathogenen Klon B2 führte zu einer Umkehr des Phänotyps von pathogen zu apathogen. Interessanterweise zeigten diese drei Gene in der Transkriptom-Analyse mit die höchsten *Fold-Change*-Werte. Somit könnte dem C2-Domänen-Protein EhC2-3, der Zelloberflächen-Protease gp63 (EhMP8-2) und einem hypothetischen Protein unbekannter Funktion eine entscheidende Rolle bei der Pathogenität von *E. histolytica* zufallen. Allerdings ist bisher unklar, ob die spezifische Überexpression dieser drei Gene einen direkten Einfluss auf die ALA-Formation hat oder ob sie an der Prozessierung eines Pathogenitätsfaktors beteiligt sind und dadurch die ALA-Bildung indirekt beeinflussen. So konnte bereits schon in vorherigen Studien festgestellt werden, dass z.B. die Überexpression der Gene *ehcp-a1* und *ehcp-a2* zu einer gesteigerten Cysteinpeptidaseaktivität von EhCP-A1 und EhCP-A2 führt, dies jedoch keinen Einfluss auf die ALA-Formation ausübt. Wohingegen die Überexpression von *ehcp-a5* zu einer gesteigerten Aktivität der EhCP-A1, -A2 und -A5 führt, und diese Transfektante im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle 3-fach größere Abszesse induziert, was für eine Prozessierung anderer Cysteinproteasen durch EhCP-A5 spricht (Tillack *et al.*, 2006).

Daher lässt sich gegenwärtig noch keine abschließende Aussage darüber treffen, ob das EhC2-3-Protein, die EhMP8-2-Protease und das hypothetische Protein direkt als Pathogenitätsfaktoren anzusehen sind oder ob ein Zusammenspiel verschiedener Proteine, deren Expression, Prozessierung, Transport oder Lokalisation sie regulieren, für die Abszess-Entstehung ausschlaggebend sind. Die Überprüfung weiterer transgener Klone, in denen

Kandidatengene überexprimiert oder runterreguliert sind, ist im Mausmodell erforderlich, um die an der Pathogenität von *E. histolytica* beteiligten Mechanismen aufzudecken.

### **5.2.2 Reisolierung von *E. histolytica* Trophozoiten aus der Leber für weiterführende molekulare Analysen**

Im Gegensatz zu anderen protozoischen Parasiten, wie z.B. Leishmanien oder Plasmodien, ist die Gewebeinvasion von *E. histolytica* kein Bestandteil des obligatorischen Lebenszyklus. Die Invasion des Parasiten in die Darmmukosa bzw. der Befall anderer innerer Organe bildet für diesen eine Art „Sackgasse“, da der Übertragungsweg mittels Ausscheidung von Zysten unterbrochen ist. Bei invasiven Verlaufsformen müssen die Parasiten unterschiedliche Milieubedingungen im Wirt überleben können und sind zusätzlich den humanen Abwehrmechanismen ausgesetzt. Es ist daher naheliegend, dass die Fähigkeit zur Gewebeinvasion von *E. histolytica* von komplexen adaptiven Prozesse begleitet wird. Demnach sollte eine Änderung des Genexpressionsprofils gegenüber *in vitro* kultivierten Amöben zu beobachten sein. Auch wenn durch vergleichende Transkriptom-Studien von *in vitro* kultivierten Isolaten, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden, bereits eine Reihe von putativen Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden konnte, können diese Studien nur Hinweise liefern, inwiefern diese Faktoren den Trophozoiten helfen, mit den gegebenen Verhältnissen in der Leber umzugehen. Gegenwärtig mangelt es an entsprechenden *in vivo*-Studien. Ein Grund hierfür könnte das Fehlen geeigneter Methoden sein, um Trophozoiten *ex vivo* aus der Leber zu reisolieren ohne die Genexpression entscheidend zu beeinflussen. So wurde z. B. in früheren Studien versucht, Trophozoiten aus der Leber zu reisolieren, indem man die Leber 7 Tage nach der Infektion mit *E. histolytica* entnommen, in Scheiben geschnitten und in Zellkulturflaschen mit kompletten Amöbenmedium transferiert hat. Nach drei Tagen wurden die Trophozoiten für Genexpressionsanalysen geerntet und *in vitro* kultivierten Trophozoiten gegenübergestellt (Bruchhaus *et al.*, 2002). Obwohl drei Tage nach Leberentnahme eine Veränderung des Genexpressionsprofils wahrscheinlich ist, konnten Bruchhaus und Kollegen mittels Differential-Display-PCR von insgesamt 3000 Amplikons 55 identifizieren, die nur in den aus Amöbenleberabszessen reisolierten Trophozoiten zu finden waren und nicht in den *in vitro* kultivierten Trophozoiten. Ebenso konnte von Gilchrist und Kollegen gezeigt werden, dass Trophozoiten, die aus dem Caecum von infizierten Mäusen reisoliert wurden, eine 20 bis 35-fach höhere Genexpression der EhCP-A1 gegenüber *in vitro* kultivierten Trophozoiten hatten (Gilchrist *et al.*, 2006). Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass *E. histolytica* während der Organinvasion substantielle Veränderungen der Genexpression vornimmt. Zur Untersuchung dieser Thematik wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur zeitnahen Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber infizierter Tiere etabliert, wobei das Genexpressionsprofil für wei-

terführende molekulare Analysen konserviert wurde. So konnten Trophozoiten des Klons B2 48 Stunden nach intrahepatischer Infektion erfolgreich aus der Leber reisoliert werden. Ein stark limitierender Faktor dieses Prozederes der Reisolierung sind allerdings die gravierenden Verluste von > 99% der in die Leber injizierten Trophozoiten, was sich trotz zahlreicher Optimierungsansätze nicht weiter verbessern ließ. Die Konservierung des Genexpressionsprofil der reisolierten Trophozoiten erfolgte mittels Fixierung mit PFA. Dies hat eine Vernetzungen von Proteinen und Nukleinsäuren zur Folge, wobei es auch zu chemischen Modifikationen der RNA kommt (Masuda *et al.*, 1999). Die Analysen der aus den fixierten Zellen isolierten RNA haben gezeigt, dass die Fixierung einen maßgeblichen Einfluss auf die Qualität der RNA gegenüber RNA aus nativen Zellen hat. Die Ergebnisse entsprechen Studien anderer Arbeitsgruppen, die versucht haben RNA für molekulare Analysen aus fixiertem Material zu isolieren (Evers *et al.*, 2011; von Ahlfen *et al.*, 2007; Hrvatin *et al.*, 2014). Trotz ihres stark fragmentierten Zustandes konnte jedoch gezeigt werden, dass die isolierte RNA für molekulare Analysen wie die qPCR geeignet ist ebenso wie für die Generierung von cDNA-Bibliotheken. Gegenwärtig die größte Herausforderung für die Analyse der Proben stellt die Illumina Plattform dar. Die stark fragmentierten RNA-Proben haben eine ähnlich kurze Fragmentlänge wie miRNAs und werden daher ebenfalls zu den sogenannten *low diversity* Proben gezählt. Zusätzlich scheinen die bei der Herstellung der cDNA-Bibliotheken verwendeten Barcodes zur Identifizierung einzelner Proben in einem Multiplex-Lauf zu einer nicht ausreichenden initialen Sequenz-Diversität zu führen, was für den Illumina *cluster calling*-Algorithmus ein Problem darstellt. Die Illumina Standardprotokolle zur Datenanalyse nutzen nur Sequenz-Bilder, die zu den ersten vier Positionen in einem *read* korrespondieren, um die Koordinaten der verschiedenen Cluster auf einer *flow*-Zelle zu bestimmen. Dieser Schlüsselschritt kann bei geringen Sequenz-Diversitäten in den initialen vier Positionen zu Sequenz-Bildern führen, die von dem *cluster calling*-Algorithmus nicht erkannt werden. Diese Problematik wurde schon mehrfach beschrieben, obwohl die Proben nachweislich ein gewisses Maß an Diversität aufwiesen (Mitra *et al.*, 2015). Zur Lösung dieser Problematik wird gegenwärtig z.B. über eine Doppel-Indizierung solcher Proben oder eine Rehybridisierungen der *flow*-Zellen diskutiert (Kirchner *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2015). Auch die in dieser Arbeit generierten NGS-Bibliotheken aus fixierten RNA-Proben konnten aufgrund von technischen Problemen bei der Clusterbildung noch nicht über die Illumina-Plattformen analysiert werden.

### 5.2.3 Wirtsspezifische Transkriptom-Analyse mittels mRNA-Sequenzierung nach intrahepatischer Infektion von C57BL/6 Mäusen mit den *E. histolytica* Klonen A1 und B2

Bislang lag der Fokus der meisten Pathogenitätsstudien auf den Faktoren, die den Parasiten für die Invasion und die Zerstörung des Lebergewebes verantwortlich machen. Offensichtlich sind aber auch Wirtsfaktoren von Bedeutung, denn obwohl die Prävalenz des Erregers bei Frauen und Kindern höher ist, entwickeln Männer mittleren Alters 7 bis 10 Mal häufiger einen ALA (Blessmann *et al.*, 2002). Zur Untersuchung des Einflusses von Wirtsfaktoren auf die ALA-Bildung wurde sich ebenfalls der *E. histolytica* Klone A1 und B2 bedient, die sich in zwei Amöbiasis-Tiermodellen hinsichtlich ihrer Pathogenität unterscheiden. Neben dem Vergleich der Transkriptome der *in vitro*-kultivierten Amöbenklone A1 und B2 wurde daher in dieser Arbeit auch eine vergleichende Transkriptom-Analyse von mit A1 oder B2 intrahepatisch infizierten murinen Lebern in der frühen Phase der ALA-Bildung durchgeführt.

Die durchgeführte mRNA-Seq ergab, dass von insgesamt 23420 gefundenen Transkripten, über den untersuchten Zeitraum von 24 Stunden, 40 Gene signifikant differentiell in den infizierten Lebern exprimiert werden. Während 6 Stunden nach Infektion noch kein signifikanter Unterschied der Genexpression in A1- und B2-infizierten Lebern beobachtet werden konnte, zeigten sich 12 Stunden nach Infektion 24 als differentiell exprimiert, 24 Stunden nach Infektion wiesen 16 Gene ein signifikant unterschiedliches Expressionslevel auf. Auffälligerweise wiesen 37 der insgesamt 40 differentiell exprimierten Gene ein erhöhtes Transkriptlevel nach der Infektion mit dem apathogenen Klon A1 auf. Unter Einbeziehung der Ergebnisse des Zeitverlaufs der ALA-Größe und der dabei beobachteten schnelleren Regenerierung des Lebergewebes nach der Infektion mit dem Klon A1, lässt sich vermuten, dass der Klon A1 im Vergleich zu dem Klon B2 früher vom Immunsystem des Wirts erkannt wird und offensichtlich eine sehr viel stärkere Abwehrreaktion im Wirt hervorruft. Die Tatsache, dass im immunkompetenten Mausmodell 92,5 % der differentiell exprimierten Gene nach Infektion mit A1 höher reguliert sind, als nach Infektion mit B2, stützt diese Vermutung. Des Weiteren wurde bei der Klassifizierung der Gene nach ihren GO-Termini festgestellt, dass der Klon A1 24 Stunden nach Infektion vor allem die Transkription von Genen hochreguliert war, die für Proteine kodieren, welche am Cholesterol-, Lipid- und Steroid-Metabolismus sowie deren Biosynthese beteiligt sind. Die am stärksten exprimierten Gene stellen dabei die Serum-Amyloide-A 1 und 2 (*saa1*, *saa2*) dar, welche zur Familie der Apolipoproteine gehören und wie in dieser Studie gefunden zumeist zusammen exprimiert werden (Thorn *et al.*, 2004). Apolipoproteine beeinflussen neben ihrer Funktion im Lipidstoffwechsel auch wichtige immunologische Prozesse. Die Serum-Amyloide-A 1 und 2 gehören zu wichtigsten Akute-Phase-Proteinen, die als Antwort auf Inflammation, Trauma oder Infektion systemisch in der Leber sezerniert werden. Sie können aber auch lokal in verschiedenen anderen Geweben wie in

Knochen, Knorpelgewebe und in verschiedenen Gefäßen sowie im Serum bei Osteoarthritis und Atherosklerose Patienten gefunden werden (Kovacevic *et al.*, 2008; Vallon *et al.*, 2001; Meek *et al.*, 1994; Eklund *et al.*, 2012). Ihre Transkription wird über Glukokortikoide und Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL6 induziert (Kovacevic *et al.*, 2008; Vallon *et al.*, 2001; Thorn *et al.*, 2004; Hagihara *et al.*, 2004). Dabei spielen die Glukokortikoide eine wichtige Rolle bei der Akute-Phase-Reaktion, indem sie die Zytokinsekretion von Monozyten und Makrophagen inhibieren und somit zur Beendigung der Akute-Phase-Reaktion führen (Baybutt *et al.*, 1990). Die Serum-Amyloide-A 1 und 2 können demnach regulierend in die Akute-Phase-Reaktion eingreifen, wirken als Mediatoren und Inhibitoren einer Entzündung und können so eine lokale Begrenzung auf den Entzündungsherd bewirken, was die Wiederherstellung des geschädigten Gewebes fördert. Die signifikant erhöhte Expression dieser Gene nach Infektion mit dem apathogenen Klon A1 könnte somit ein entscheidender Faktor für die deutliche schnellere Geweberegeneration der Leber sein. Diese Annahme wird außerdem dadurch gestützt, dass das Zusammenspiel von Monozyten und Kupffer-Zellen bei einer Amöbeninfektion in der Leber zu einer Immunpathologie und damit zu einer Schädigung der Leber führt (Helk *et al.*, 2013), wobei Apolipoproteine die Aktivierung inflammatorischer Monozyten verhindern können. Des Weiteren werden Apolipoproteine in Abhängigkeit von Geschlechtshormonen in der Leber synthetisiert, was in Verbindung mit dem Geschlechtsdimorphismus der ALA-Bildung stehen könnte. So wurden z.B. in Frauen die an Diabetes Typ-2 leiden, signifikant höhere Serum-Amyloide-A Level gemessen als in Männern die an Diabetes Typ-2 erkrankt sind (Sjöholm *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang interessant ist, dass auch die Rab7-Proteine, die in dem Klon A1 auf einem signifikant erhöhtem Expressionslevel gefunden worden sind, ebenfalls eine Rolle beim Lipidmetabolismus zugeschrieben wird (Zhang *et al.*, 2009). Inwiefern der Lipidstoffwechsel des Wirtes und des Parasiten jedoch zusammenhängen, ist gegenwärtig nicht bekannt. Trotzdem sollte sowohl den Apolipoproteinen und als auch den Rab7-Proteinen mehr Aufmerksamkeit bei Pathogenitätsstudien von *E. histolytica* gewidmet werden.

Nach Infektion mit dem pathogenen Klon B2 wurden insgesamt nur drei Gene mit einer erhöhten Expression im Vergleich zu mit dem Klon A1 infizierten Tieren gefunden. Das höchste Expressionslevel wurde dabei für das Gen *cmtm8* gefunden. Dieses gehört zu der sogenannten Chemokin-ähnlichen Faktor-Superfamilie Mitglied 8 (CKLFSF8). CKLFSF8 kombiniert Eigenschaften von Chemokinen und Tetraspaninen und beinhaltet eine MARVEL-Domäne. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CMTM8 einen Zelltod durch Apoptose über einen Mitochondrien-vermittelten Verlauf induzieren kann (Jin *et al.*, 2007). CMTM-Proteine sind außerdem an vielen essentiellen zellulären Prozessen wie z.B. der Tumor-Suppression beteiligt (Lind *et al.*, 2008; Buffart *et al.*, 2008). Für die beiden anderen Gene, deren Expres-

sion in murinen Lebern nach Infektion mit dem B2-Klon erhöht ist, *eif4ebp3* und *pgm3*, ist bislang kaum etwas bekannt.

Insgesamt fiel bei dieser Transkriptom-Analyse jedoch auf, dass sich die Geneexpression der infizierten Mauslebern kaum miteinander korrelieren lassen, d.h. an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten sind jeweils andere Gene angeschaltet. Des Weiteren war das Signifikanzniveau allgemein sehr gering, wobei die Analyse einer dritten biologischen Probe dieses Problem beheben sollte. Außerdem sollten noch weitere, spätere Zeitpunkte nach dem Setzen der Infektion analysiert werden, da sich die relativen Genexpressionslevel ab der 24 Stunden-Probe deutlich erhöht haben.

### **5.3 *In vivo* Visualisierung von *Entamoeba histolytica* Trophozoiten mittels Magnetresonanztomographie**

Für die Pathogenität von *E. histolytica* ist ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren des Parasiten sowie des Wirtes verantwortlich ist. Aber auch weitere Faktoren wie z. B. die Motilität der Parasiten könnten zu einer gesteigerten Invasion in die Darmmukosa und Migration zur Leber führen und somit für die Symptomatik einer invasiven Amöbiasis von Bedeutung sein. Jedoch ist die Rolle der Motilität bei der extra-intestinalen Ausbreitung der Parasiten und der Moleküle, die das chemotaktische Verhalten von Amöben *in vivo* steuern, bislang nur unzureichend untersucht. Zudem stellt die nicht-invasive Visualisierung von pathogenen Mikroorganismen innerhalb ihres Wirts nach wie vor eine große Herausforderung für die Wissenschaft dar. In ersten Untersuchungen wurde zwar bereits versucht die Ausbreitung der Trophozoiten in den Organen zu untersuchen, jedoch sind diese Ergebnisse entweder auf *in vitro*-Daten limitiert oder aufgrund der Beschränkung invasiver Methoden auf ein kleines Sichtfeld begrenzt (Rigothier *et al.*, 2002; Labruyere und Guillen, 2006). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit eine nicht-invasive Methode zur *in vivo*-Visualisierung von *E. histolytica* Trophozoiten mittels MRT entwickelt werden, welches ein geeignetes Werkzeug darstellt, um in zukünftigen Studien die Motilität und das Migrationsverhalten des Parasiten auf Einzelzellebene genauer zu untersuchen.

*In vitro* und *in vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass *E. histolytica*-Trophozoiten effizient mit Superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel (SPIO) markiert werden können (Fehling *et al.*, 2015). *E. histolytica* ist aufgrund seiner Eigenschaft Partikel zu phagozytieren ein geeigneter Kandidat für die Markierung mit SPIO-Partikeln, da der Parasit dabei nicht zwischen der Aufnahme von natürlichen Zielen, wie Bakterien oder Wirtszellen, und artifiziellen Partikeln unterscheidet (Ralston *et al.*, 2014). In dieser Studie wurden SPIO-Partikel verwendet, die eine Polyethylen-Glycol-Schicht besitzen. Diese gewährleisteten die bestmögliche intrazelluläre Aufnahme und üben dabei nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität und Pathoge-

nität von *E. histolytica* aus (Fehling *et al.*, 2015). Die Bildgebung der SPIO-markierten Trophozoiten mit den verwendeten MR-Sequenzen, die eine fokale Signalauslöschung in der Umgebung der markierten Amöben zeigt, ist vergleichbar mit in diversen Studien mittels SPIO-markierter Säugerzellen erzielten Ergebnissen (Bulte *et al.*, 2001; Arab *et al.*, 2003; Bos *et al.*, 2004; Daldrup-Link *et al.*, 2005; Kustermann *et al.*, 2005; Toso *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Motilität von SPIO-markierten Trophozoiten eine kritische Komponente in der ALA-Entwicklung zu sein scheint. Fixierte SPIO-markierte Trophozoiten haben die Fähigkeit verloren, Abszesse zu induzieren, während bei viablen SPIO-markierten Trophozoiten deutliche Abszesse detektiert werden konnten. Die Motilität der Trophozoiten scheint somit einen Einfluss auf die Pathogenität zu haben und sollte daher in weiterführenden Studien näher untersucht werden. In diesen Untersuchungen wurde nur mit dem pathogenen Klon B2 gearbeitet. Die Visualisierung von SPIO-markierten Trophozoiten des Klons A1, als auch von genetisch modifizierten Trophozoiten die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden, könnten hier aufschlussreiche Erkenntnisse bringen, die dabei helfen könnten die Rolle der Motilität bei der Pathogenität von *E. histolytica* aufzuklären. Des Weiteren könnten Versuche mit Immunzell-depletierten oder entsprechenden *knockout*-Mäusen weitere Einblicke in die Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszellen geben.

Allerdings zeigt die hier etablierte Methode auch gewisse Defizite auf. Das immunkompetente Mausmodell des ALA stellt ein Modell für eine akute, lokale Inflammation der Leber dar und induziert die Rekrutierung von angeborenen Immunzellen, wie Neutrophilen und Makrophagen, die ebenfalls phagozytierende Eigenschaften aufweisen. Sobald SPIO-Partikel aus den Trophozoiten gelangen, weil diese entweder von Wirtszellen zerstört werden oder aktiv von den Amöben ausgeschieden werden, besteht die Möglichkeit der Aufnahme der ausgeschiedenen Partikel durch Neutrophile und Makrophagen, die vermehrt am Infektionsherd auftreten. Aufgrund der aktiven Sekretion der SPIO-Partikel von *E. histolytica* sind zudem nur kurze Studien über einen Zeitraum von drei Tagen möglich.

Obwohl die Markierung und *in vivo*-Visualisierung für SPIO-markierte Bakterien (*Staphylococcus aureus*) bereits gezeigt werden konnte (Hoerr *et al.*, 2013), sind die hier gezeigten Ergebnisse die ersten Daten über SPIO-markierte pathogene Parasiten, die mittels MRT visualisiert werden konnten.

## 5.4 Ausblick

Um ein besseres Verständnis für die Ursache der Pathogenität von *E. histolytica* zu erhalten, sind intensivere Studien des komplexen Zusammenspiels von Parasit und Wirt zwingend erforderlich. In dieser Arbeit wurden Proteine und Stoffwechselwege des Erregers und des Wirts identifiziert, die für die ALA-Entwicklung verantwortlich sein könnten. So konnten auf

Transkriptom-Ebene zahlreiche Moleküle identifiziert werden, die als putative Pathogenitätsfaktoren des Erregers und des Wirtes in Betracht gezogen werden können. Erste Pathogenitätsstudien mit transgenen Amöben zeigten sich als hilfreiche Strategie, um die Funktionen der identifizierten Gene näher zu charakterisieren. Weitere Studien aller zwischen dem apathogenen Amöbenklon A1 und dem pathogenen Klon B2 als differentiell reguliert identifizierten Gene sollten durchgeführt werden, um deren Beteiligung an den pathobiologischen Eigenschaften von *E. histolytica* genauer aufzuklären. Auf Grund der ersten Vergleiche auf Transkriptom-Ebene von mit apathogenen und pathogenen Amöben infizierten Mauslebern konnten biologische Prozesse, vor allem der Lipidmetabolismus, identifiziert werden, die bei der ALA-Bildung eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Eine Validierung dieser Daten und weiterführende Studien zur näheren Charakterisierung der Involvierung des Lipidstoffwechsels, müssen jedoch noch durchgeführt werden. Pathogenitätsstudien mit Apolipoprotein-*knockout*-Mäusen könnten hier z.B. dazu beitragen die Immunpathologie des ALA näher zu charakterisieren.

Als Basis für zukünftige Studien zur Pathogenität von *E. histolytica* konnten des Weiteren zwei Methoden erfolgreich etabliert werden, die es ermöglichen, detaillierte Erkenntnisse über die Genexpression und die Motilität der Amöben *in vivo* zu erhalten. Die Reisolierung von Trophozoiten aus der Leber bietet die Möglichkeit, Transkriptom-Profile zu erstellen, über die weitere Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden könnten, die während der Amöbenleberabszessentstehung von Bedeutung sein könnten. Ebenso können durch die Möglichkeit der nicht-invasiven *in vivo*-Visualisierung von SPIO-markierten Trophozoiten Studien zur Motilität des Erregers sowie zur Interaktion von Parasit und Wirt durchgeführt werden.

## Zusammenfassung

Amöbiasis gehört nach Malaria und Schistosomiasis zu den weltweit häufigsten Parasitosen des Menschen. Sie wird durch das intestinale Protozoon *Entamoeba histolytica* hervorgerufen. Bei einem Großteil der Erkrankten besiedelt der Parasit asymptomatisch den Darm, während sich bei einer geringen Anzahl eine invasive Amöbiasis entwickelt. Bei der invasiven Form der Amöbiasis kann es zur Ausbildung von Amöbenleberabszessen (ALA) durch *E. histolytica* kommen. Dabei ist ein komplexes Zusammenspiel aus Pathogenitätsfaktoren des Parasiten als auch Faktoren des Wirts maßgeblich für die Virulenzentstehung verantwortlich. Die bisher bekannten Pathogenitätsfaktoren des Erregers wurden jedoch sowohl in pathogenen als auch in apathogenen Amöben nachgewiesen. Wirtsspezifische Untersuchungen bezogen sich bisher nur auf pathogene Isolate, so dass der Vergleich zu inapparenten Verlaufsformen fehlt. Die für die Virulenzentstehung relevanten Mechanismen konnten somit bisher noch nicht identifiziert werden. Für diese Arbeit standen *E. histolytica* Klone zur Verfügung welche aus den HM-1:IMSS Isolat abstammenden Zelllinien A und B generiert wurden. Die aus der Zelllinie A erzeugten Klone wurden für apathogen befunden, da 7 Tage nach Infektion von *Meriones unguiculatus* keine Amöbenleberabszesse detektiert werden konnten. Die aus der Zelllinie B generierten Klone, weisen hingegen eine überraschend große Diversität in ihren Pathogenitätseigenschaften auf. Für diese Arbeit wurden der apathogene Klon A1 und der hoch-pathogene Klon B2 ausgewählt, um diese in einem direkten Vergleich gegenüberzustellen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, über diese direkte Gegenüberstellung putative Faktoren auf Erreger- als auch auf Wirtsseite zu identifizieren, die in die Virulenzentstehung involviert sein könnten.

Zur näheren Charakterisierung der Pathogenität der *E. histolytica* Klone A1 und B2 wurde der zeitliche Verlauf der Infektion in zwei Tiermodellen der Amöbiasis *in vivo* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *E. histolytica* Klone A1 und B2 in beiden Amöbiasis-Tiermodellen unterschiedliche Fähigkeiten zur ALA-Induktion aufweisen. Obwohl der Klon A1 in der Lage ist eine Abszessbildung hervorzurufen, ist diese im Vergleich zu Klon B2 deutlich geringer ausgeprägt. Somit konnte sichergestellt werden, dass sich beide Tiermodelle für die Untersuchung von potentiellen Pathogenitätsfaktoren eignen und eine solide Basis für weiterführende Analysen darstellen.

Mit Hilfe der mRNA-Sequenzierung wurden vergleichende Transkriptom-Studien zwischen den beiden Klonen A1 und B2 durchgeführt. Insgesamt konnten von 8386 gefundenen Gensequenzen 76 Gene identifiziert werden, die zwischen den beiden Klonen differentiell exprimiert sind. Der Großteil der in B2 höher regulierten Gene kodiert für hypothetische Proteine. Die Gene, die die höchsten *Fold-Change*-Werte aufweisen wurden höher exprimiert in dem Klon A1 gefunden. Die entsprechenden Gene kodieren für drei C2-Domänen-Proteine,

drei Rab7 GTPasen und die Zelloberflächen-Protease gp63 (EhMP8-2). Weiterführende Analysen des Einflusses der identifizierten Proteine auf die ALA-Bildung mit transgenen Amöben konnten zeigen, dass EhC2-3, EhMP8-2 und ein hypothetisches Protein als putative Pathogenitätsfaktoren des Erregers in Betracht gezogen werden müssen.

Neben den Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* können auch wirtsspezifische Mechanismen bei einem Ausbruch der Amöbiasis eine wichtige Rolle spielen. Aufgrund der in dieser Arbeit erstmals durchgeführten Vergleiche auf Transkriptom-Ebene, von mit apathogenen und pathogenen Amöben infizierten murinen Lebern, konnten biologische Prozesse, vor allem der Lipidmetabolismus, identifiziert werden, die bei der ALA-Bildung eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

Des Weiteren konnten erfolgreich zwei Methoden etabliert werden, die es ermöglichen detaillierte Erkenntnisse über die Genexpression und die Motilität der Amöben *in vivo* zu erhalten. So konnten erfolgreich Trophozoiten aus murinen Lebern *ex vivo* reisoliert werden, aus denen quantitativ und qualitative geeignete RNA für weiterführende molekulare Studien zur Genexpression gewonnen werden konnte. Ebenso konnten erstmals pathogene Parasiten mit Superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (SPIO) markiert werden und *in vivo* mittels Magnetresonanztomographie visualisiert werden. Diese Methode der nicht-invasiven *in vivo*-Visualisierung von SPIO-markierten Trophozoiten mittels MRT auf Einzelzellebene ermöglicht zukünftig Studien zur Motilität des Erregers sowie zur Interaktion von Parasit und Wirt.

In dieser Arbeit wurden Proteine und Stoffwechselwege des Erregers und des Wirts identifiziert, die für die ALA-Entwicklung verantwortlich sein könnten. Aufgrund der vergleichenden Transkriptom-Analysen konnten zahlreiche Moleküle identifiziert werden, die als putative Pathogenitätsfaktoren beider Seiten in Betracht gezogen werden müssen. Die Etablierung zweier Methoden kann zukünftig als Basis für weitere Studien zur Pathogenität dienen und dazu beitragen den Ursprung der Pathogenität von *E. histolytica* aufzuklären.

## Abstract

Amoebiasis is an infectious disease caused by the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. It is one of the most common parasitic diseases occurring in humans, following malaria and schistosomiasis. Most infected individuals harbor the parasite in the gut without clinical signs of disease. In approximately 10% of infected individuals, the parasite penetrates the intestinal mucosa and induces hemorrhagic colitis or the development of extra-intestinal abscesses, most common in the liver (ALA). A complex interplay of pathogenicity factors of the parasite itself as well as host-specific mechanisms determine the clinical outcome of the disease. Nevertheless all proposed pathogenicity factors are present in both, pathogenic and non-pathogenic amoeba. So far, host-specific investigations only deal with pathogenic isolates, meaning there are no comparisons towards asymptomatic infections. Hence, the mechanism of virulence is still unclear. For this work there were syngenic clones available that were generated from the laboratory strain HM-1:IMSS derived cell lines A and B, which consistently differ in virulence. All clones generated from cell line A are incapable to induce abscesses on day 7 post infection in *Meriones unguiculatus*, whereas clones generated from cell line B showed different degrees in virulence ranging from avirulent to highly virulent phenotypes. The non-pathogenic clone A1 and the highly aggressive clone B2 were selected for this work, to make a direct comparison for elucidating the parasitic and host-specific factors that determine the clinical outcome of the disease and therefore are involved in amoeba pathogenicity. For further characterization of the pathogenicity of these two clones, a time course of infection was performed using two different animal models of the disease. Both clones showed the capability to induce abscesses, although clone B2 provokes larger abscesses than clone A1. It could be proven, that both animal model represent a reliable tool for further investigating putative pathogenicity factors.

A comparative transcriptome analysis of clone A1 and clone B2 was performed, using mRNA sequencing. Out of 8386 genes identified in this approach, 76 are differentially transcribed in the two clones. Most of the genes that showed a higher abundance in the pathogenic clone B2 code for hypothetical proteins. Genes with the highest fold change were found with a higher abundance in clone A1. These include three C2 domain containing proteins, three Rab7 GTPases and the cell surface protease gp63 (EhMP8-2). Further investigations with transgenic amoeba showed that EhC2-3, EhMP8-2 and one hypothetical protein have a significant influence on ALA development and are therefore considered to be putative pathogenicity factors of *E. histolytica*.

Besides pathogenicity factors of the parasite, also host-specific mechanisms determine the clinical outcome of the disease. Therefore a comparative transcriptome analysis of murine livers after infection with non-pathogenic and pathogenic amoeba was performed for the first

time. Due to this transcriptomic approach, biological processes, especially like the lipid metabolism, were identified to play an important role in ALA-development.

Furthermore, two methods were established in this work that enable a more detailed study of amoebic gene expression and amoebic motility *in vivo*. The reisolation of amoebic trophozoites from murine livers after infection *ex vivo* succeeded successfully and the isolated RNA could be used for further molecular studies on gene expression. It was also demonstrated for the first time that a pathogenic parasite could be efficiently labelled with superparamagnetic iron oxid nanoparticles (SPIO) and being visualized using *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI). This method represents in future a noninvasive imaging tool to study parasites, as well as host-specific pathomechanisms.

In this work, proteins and metabolic pathways of the parasite as well as of the host could be identified, which might be responsible for ALA-development. Due to the different comparative transcriptomic approaches, a range of molecules was identified, which have to be considered as putative pathogenicity factors of both, parasite and host. The successful establishment of two new techniques could be a solid basis for future studies on amoeba pathogenicity to help clarify the origin of pathogenicity of *E. histolytica*.

## Literaturverzeichnis

- Adl**, S.M., Simpson, A. et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot. Microbiol* **52**(5): 399-451.
- Ahlfen** von, S., Missel, A., Bendrat, K., Schlumpenberger, M. (2007) Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLoS ONE* **2**(12): e1261.
- 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.
- Arbab** A.S., Bashaw L.A., Miller B.R., Jordan, E.K., Bulte, J.W., Frank, J.A. (2003) Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* **76**: 1123–1130.
- Baybutt**, H.N., Holsboer F. (1990) Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinology* **127**(1):476-80.
- 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., Schümann, M., Roeder, T., Tannich, E., Krause, E., Bruchhaus, I. (2014) The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics* **13**(1):132-44.
- Blazquez**, S., Zimmer, C., Guigon, G., Olivo-Marin, J.C., Guillén, N., Labruyère, E. (2006) Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **74**:1407–1411.
- Blessmann**, J., Van, L.P., Nu, P.A.T., Thi, H.D., Müller-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.
- Bos** C, Delmas Y, Desmouliere A, et al. (2004) In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* **233**:781–789.

- Bracha, R., Y. Nuchamowitz, et al.** (2003) Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell* **2**(2): 295-305.
- Bredeston, L.M., Caffaro, C.E., Samuelson, J. und Hirschberg, C.B.** (2005) Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **280**:32168-32176.
- Bruchhaus, I., Roeder, T., Lotter, H., Schwerdtfeger, M., Tannich, E.** (2002) Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol Microbiol* **44**(4):1063-72.
- Bruchhaus, I., Loftus, B.J., Hall, N., Tannich, E.** (2003) The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell*. **2**: 501-509.
- Buffart T.E., Overmeer R.M., Steenbergen R.D., et al.** MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer. *Br J Cancer* **99**:1802–7.
- Bulte J.W., Douglas T., Witwer B., et al.** Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* **19**: 1141–1147.
- Burchard, G.D., Tannich, E.** (2004) Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis. *Deutsches Ärzteblatt* Jg. **101** Heft 45.
- Clark, C.G., Diamond, L.S.** (1993) A redescription of *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN 1903) separating it from *Entamoeba dispar*. Brumpt, 1925 *J Euk. Microbiol.* **40**(3): 340-344
- Clark, C. G., U. C. Alsmark et al.** (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv Parasitol* **65**: 51-190.
- Daldrup-Link, H.E., Rudelius, M., Piontek, G., et al.** (2005) Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment. *Radiology* **234**:197–205.
- 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, 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.

- 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.
- Dingayan**, L.P. (2011) p38 Mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and NADPH Oxidase (NOX) are cytoprotective determinants in the trophozoite-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells. *Cell. Immunol* **272**: 25–32.
- Duggal**, P. et al. (2011) A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children. *J. Clin. Invest* doi: 10.1172/JCI45294.
- Ehrenkauf**, G.M., Haque, R., Hackney, J.A., Eichinger, D.J., 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.
- Eklund**, K.K., Niemi, K., Kovanen, P.T. (2012) Immune functions of serum amyloid A. *Crit.Rev. Immunol* **32**: pp. 335-348
- Evers**, D.L., Fowler, B.R., Mason, J.T. (2011) The Effect of Formaldehyde Fixation on RNA: Optimization of Formaldehyde Adduct Removal. *J Mol Diagn* **13(3)**: 282-8.
- Fehling**, H., Ernst T.M., Bernin, H., Zaruba, M.D., Bruchhaus, I., Adam, G., Ittrich, H., Lotter, H. (2015) Magnetic Resonance Imaging of Pathogenic Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica* Labeled With Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Invest Radiol* **50(10)**: 709-18.
- Gilchrist**, C.A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., et al (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol Biochem Parasitol.* **147**: 163-176.
- Gomis-Ruth**, F.X. (2009) Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem.* **284**:15353–15357.
- Guo**, X., Roberts, M.R., Becker, S.M., Podd, B., Zhang, Y., Chua, S.C. Jr., Myers, M.G. Jr., Duggal, P., Houpt, E.R., Petri, W.A. Jr. (2011) Leptin signaling in intestinal epithelium mediates resistance to enteric infection by *Entamoeba histolytica*. *Mucosal Immunol* **4(3)**: 294-303.
- Hagihara**, K., Nishikawa, T., Isobe, T., Song, J., Sugamata, Y., Yoshizaki, K. (2004) IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**: pp. 363–369.
- Helk**, E., Bernin, H., Ernst, T., et al. (2013) TNF $\alpha$ -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS Pathog* **9**: e1003096.
- Hoerr**, V., Tuchscher, L., Huve, J., et al. (2013) Bacteria tracking by in vivo magnetic resonance imaging. *BMC Biol* **11**: 63.

- 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.
- Hrvatín, S., Deng, F., O'Donnell, C.W., Gifford, G.K., Melton, D.A.** (2014) MARIS: Method for Analyzing RNA following Intracellular Sorting. *PLoS One* **9**(3).
- Hurd, P.J., Nelson, C.J.** (2009) Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Brief Funct Genomic Proteomic* **8**(3): 174-83.
- Jin, C., et al.** (2007) CMTM8 induces caspase-dependent and -independent apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Journal of Cellular Physiology* **211**(1): 112-120.
- Keene, W.E., Petitt, M.G., Allen, S., McKerrow, J.H.** (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J.Exp.Med.* **163**: 536-549.
- Kim, K.A. et al.** (2011) NOX1 participates in ROS-dependent cell death of colon epithelial Caco2 cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **13**: 1052–1061.
- Kim, K.A. et al.** (2013) *Entamoeba histolytica* induces cell death of HT29 colonic epithelial cells via NOX1-derived ROS. *Korean J. Parasitol* **51**: 61–68.
- Kircher, M., Sawyer, S., Meyer, M.** (2012) Double indexing overcomes inaccuracies in multiplex sequencing on the Illumina platform. *Nucleic Acids Research* **40**: e3–e3.
- Kovacevic, A., Hammer, A., Stadelmeyer, E. Windischhofer, W., Sundl, M., Ray, A., Schweighofer, N., Friedl, G., Windhager, R., Sattler, W., Malle, E.** (2008) Expression of serum amyloid A transcripts in human bone tissues, differentiated osteoblast-like stem cells and human osteosarcoma cell lines. *J. Cell. Biochem* **103**: pp. 994–1004.
- Kustermann, E., Roell, W., Breitbach, M., et al.** (2005) Stem cell implantation in ischemic mouse heart: a high-resolution magnetic resonance imaging investigation. *NMR Biomed* **18**: 362-370.
- Labruyere, E., Guillen, N.** (2006) Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch Med Res* **37**: 253-258.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O.L., Horstmann, R.D., Muller-Eberhard, H.J.** (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 7659-7663.
- Leippe, M., Andra, J., et al.** (1994) Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* **14**: 895-904.
- Leippe, M., Muller-Eberhard, H.J.** (1994) The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* **87**: 5-18.
- Lind, G.E., Ahlquist, T., Kolberg, M., et al.** (2008) Hypermethylated MAL gene – a silent marker of early colon tumorigenesis. *J Transl Med* **6**: 13.

- Loftus**, B., Anderson, I., et al. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**: 865-868.
- 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.
- Lorenzi**, H.A., Puiu, D., Miller, J.R., Binkac, L.M., Amedeo, P., Hall, N., Caler, E.V. (2010) New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information. *PLoS Negl. Trop. Dis* **4**: e716.
- Lucius**, R., Loos-Frank, B. (2008) Biologie von Parasiten. *Springer*, 2. Auflage.
- van Lunzen**, J., Tannich, E., Burchard, G.D. (1996) Amöbenruhr und Amöbenleberabszess. *Deutsches Ärzteblatt* **93**: 3410-3416.
- 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.
- Marie**, C.S., Verkerke, H.P., Paul, S.N., Mackey, A.J.; Petri, W.A., Jr. (2012) Leptin protects host cells from *Entamoeba histolytica* cytotoxicity by a STAT3-dependent mechanism. *Infect. Immun*. **80**: 1934–1943.
- Marshall**, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y., Sterling, C.R. (1997) Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev*. **10**: 67-85.
- Masuda**, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., Okubo, K. (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*. **27(22)**: 4436–4443.
- 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.
- Maugis**, B., et al. (2010) Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *J Cell Sci*. **123**: 3884–3892.
- Meek**, R.L., Urieli-Shoval, S., Benditt, E.P. (1994) Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **91**: pp. 3186–3190.
- Mitra**, A., Skrzypczak, M., Ginalski, K., Rowicka, M. (2015) Strategies for Achieving High Sequencing Accuracy for Low Diversity Samples and Avoiding Sample Bleeding Using Illumina Platform. *PLoS One* **10(4)**:e0120520.

- Mullins**, C., Bonifacino, J.S. (2001) The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**: 333–343.
- Olivas-Garcia**, A., Tello, E., Nequiz-Avendano, M., Gonzalez-Canto, A., Lopez-Vancell, R., Garcia de Leon, M.C., et al. (2004) Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscesses in hamsters. *Parasitology*. **129**: 19–25.
- Pease**, J., Sooknanan, R. (2012) A rapid, directional RNA-seq library preparation workflow for Illumina® sequencing. *Nature Methods* **9**
- Petri**, W., Jr. (1996) Amebiasis and the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *J Investig Med* **44**: 24–36.
- Pritt**, B.S., Clark, C.G. (2008) Amebiasis. *Mayo Clin Proc* **83**: 1154–1159.
- Que**, X., Brinin, L.S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B.E., et al (2002) Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*. **119**: 23–32.
- Ralston**, K.S., Petri, W.A., Jr. (2011) Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol* **27(6)**: 254–263.
- Ralston**, K.S., Solga, M.D., Mackey-Lawrence, N.M., Somlata, Bhattacharya, A., Petri, W.A., Jr. (2014) Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature* **508(7497)**: 526–530.
- Rawal**, S., Majumdar, S., Vohra, H. (2005) Activation of MAPK kinase pathway by Gal/GalNAc adherence lectin of *E. histolytica*: gateway to host response. *Mol. Cell. Biochem* **268**: 93–101.
- Rigothier**, M. C., Khun, H., et al. (2002) Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun* **70**: 3208–3215.
- Roncolato**, E.C., Teixeira, J.E., Barbosa, J.E., Zambelli Ramalho, L.N., Huston, C.D. (2015) Immunization with the *Entamoeba histolytica* surface metalloprotease EhMSP-1 protects hamsters from amoebic liver abscess. *Infect Immun* **83**: 713–720.
- Saito-Nakano**, Y., Loftus, B.J., Hall, N., Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* **110**: 244–252.
- Saito-Nakano**, Y., Mitra, B.N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isotypes, EhRab7A and EhRab7B, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **9**: 1796–1808.

- Sandri, S.,** Rodriguez, D., Gomes, E., Monteiro, H.P., Russo, M., Campa, A. (2008) Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J. Leukoc. Biol* **83**: pp. 1174–1180.
- Scholze, H.,** Tannich, E. (1994) Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol* **244**: 512-523.
- Sim, S.,** Yu, J.-R., Lee, Y.A., Shin, M.H. (2010) Involvement of Src Family Tyrosine Kinase in Apoptosis of Human Neutrophils Induced by Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Korean J Parasitol* **48(4)**: 285–290.
- Singh, B.,** Sundar, S. (2012) Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* **30**: 3834–3842.
- Sîrbu, A.,** Kerr, G., Crane, M., Ruskin, H.J. (2012) RNA-Seq vs dual- and single-channel microarray data: sensitivity analysis for differential expression and clustering. *PLoS One* **7(12)**: e50986.
- Sjöholm, K.,** Lundgren, M., Olsson, M., Eriksson, J.W. (2009) Association of serum amyloid A levels with adipocyte size and serum levels of adipokines: differences between men and women. *Cytokine* **48(3)**: 260-6.
- Stanley, S.L., Jr.** (2003) Amoebiasis. *Lancet* **361**: 1025-1034.
- 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., Arnold, H.H. (1989) Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc.Natl.Acad.Sci* **86**: 5118-5122.
- Tanyuksel, M.,** et al. (2007) Two cases of rarely recognized infection with *Entamoeba moshkovskii*. *Am J Trop Med Hyg* **76**: 723–724.
- 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.
- Teixeira, J.E.,** Sateriale, A., Bessoff, K.E., Huston, C.D. (2012) Control of *Entamoeba histolytica* Adherence Involves Metalloprotease 1, an M8 Family Surface Metalloprotease with Homology to Leishmanolysin. *Infect Immun* **80(6)**: 2165–2176.
- Thorn, C.F.,** Lu, Z.Y., Whitehead, A.S. (2004) Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines. *Scand. J. Immunol* **59**: pp. 152–158.

- Toso, C., Vallee, J.P., Morel, P., et al.** (2008) Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant* **8**: 701-706.
- Tovar, J., Fischer, A. und Clark, C.G.** (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasites *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol.* **32**: 1013-1021.
- Vallon, R., Freuler, F., Desta-Tsedu, N., Robeva, A., Dawson, J., Wenner, P., Engelhardt, P., Boes, L., Schnyder, J., Tschopp, C., Urfer, R., Baumann, G.** (2001) Serum amyloid A (apoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. *J. Immunol* **166**: pp. 2801–2807.
- Ventura-Juárez, J., Jarillo-Luna, R.A., Fuentes-Aguilar, E., Pineda-Vázquez, A., Muñoz-Fernández, L., Madrid-Reyes, J.I., Campos-Rodríguez, R.** (2003) Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol* **25(10)**: 503-11.
- Walsh, J.A.** (1986) Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Inf Dis.* **8**: 228–238.
- WHO/PAHA/UNESCO** (1997) report: A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull* **18**: 13-14.
- Yao, C., Donelson, J.E., Wilson, M.E.** (2003) The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* **132**: 1–16.
- Zaki, M., et al.** (2006) *Entamoeba histolytica* cell movement: a central role for self-generated chemokines and chemorepellents. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 18751–18756.
- Zerial, M., McBride, H.** (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 107–117.
- Zhang, M., Chen, L., Wang, S., Wang, T.** (2009) Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Bioscience Reports* **29(3)**: 193-209.
- Zhang, W., Yu, Y., Hertwig, F., Thierry-Mieg, J. et al.** (2015) Comparison of RNA-seq and microarray-based models for clinical endpoint prediction. *Genome Biol* **25**: 16:133.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.P., Bittner, A., Ngo, K., Liu, X.** (2014) Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS One* **9(1)**: e78644.

## Eigene Publikationen

Magnetic Resonance Imaging of Pathogenic Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica* Labeled With Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.

**Fehling, H.**, Ernst, T.M., Bernin, H., Zaruba, M., Bruchhaus, I., Adam, G., Ittrich, H., Lotter, H.  
*Investigative Radiology* 2015 Oct;50(10):709-18. doi: 10.1097/RLI.000000000000000

## Anhang

**Tabelle A1: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ( $\text{padj} \leq 0,05$ ) zwischen den *E. histolytica* Klonen A1 und B2.**

Gen	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj	b2a	b2b	b2c	a1a	a1b	a1c
EHI_015290	223,4750403	7,803969897	9,49261E-56	7,95955E-52	21,38781264	16,09307646	36,02379076	5240,803615	5866,854026	5318,803654
EHI_144490	0,005518842	-7,501418821	2,05431E-48	8,61268E-45	4213,39909	3793,942775	2731,137026	10,95256764	40,39650937	7,91488639
EHI_042870	149,1266157	7,220393958	4,1488E-40	1,15959E-36	4,277562527	4,023269115	13,78688288	1109,495102	1192,682307	991,6887066
EHI_059860	77,14518081	6,269504131	9,31889E-36	1,95347E-32	8,555125055	12,06980734	13,78688288	838,9666812	906,458259	909,2807718
EHI_082070	94,48999425	6,562089662	5,79873E-35	9,72447E-32	8,555125055	4,023269115	10,67371578	713,0121533	784,7760906	699,3034917
EHI_013240	0,069424918	-3,848402627	1,69465E-30	2,36827E-27	1766,633324	1464,469958	1270,616916	142,9310077	53,20515868	116,3953881
EHI_121820	0,078041487	-3,679614927	5,6975E-30	6,8248E-27	876,9003181	1001,79401	933,0606546	94,73971008	40,88914973	83,80467943
EHI_118130	60,31054422	5,914338349	1,87563E-29	1,96589E-26	17,11025011	20,11634557	23,12638419	981,8976889	1246,380106	1411,643267
EHI_169280	50,61648194	5,661535332	2,65583E-24	2,47435E-21	8,555125055	4,023269115	4,447381576	271,6236775	335,4880839	254,6731092
EHI_014170	0,168951705	-2,565317189	1,13158E-18	9,4883E-16	5171,573096	4252,595454	4848,535394	958,8972968	828,6210825	623,8792802
EHI_074080	32,95487355	5,04241993	6,19554E-17	4,72269E-14	4,277562527	4,023269115	17,34478815	236,0278326	324,649996	284,4703285
EHI_187090	25,44754135	4,66945437	7,22923E-17	5,05143E-14	8,555125055	8,04653823	6,671072364	198,7891027	203,9531083	189,4916918
EHI_169670	0,010694866	-6,546937759	2,47412E-11	1,59581E-08	3644,483273	2478,333775	1532,122953	43,81027056	14,77921075	23,27907762
EHI_075690	5,509278448	2,461863381	6,38515E-10	3,82425E-07	162,547376	164,9540337	209,4716722	1068,422973	976,9058303	913,0054242
EHI_178610	0,064459261	-3,955468544	1,65609E-09	9,25753E-07	1728,135261	1078,236123	989,5424006	90,35868303	46,30819367	108,0149202
EHI_111330	0,103930375	-3,266310731	2,64775E-09	1,38759E-06	51,33075033	88,51192053	72,49231969	8,21442573	6,404324656	7,449304838
EHI_126560	4,023287992	2,008375012	6,44037E-09	3,17662E-06	124,0493133	88,51192053	64,93177101	327,4817724	394,6049269	394,3475749
EHI_075640	5,090775068	2,347885323	9,80123E-09	4,56574E-06	175,3800636	168,9773028	248,6086301	1060,208547	1037,993235	920,4547291
EHI_063550	0,299371732	-1,739990091	1,04292E-08	4,60258E-06	384,9806275	390,2571041	494,1040931	113,9067034	157,1522743	108,9460833
EHI_164900	4,765135031	2,252517097	2,01464E-08	8,44638E-06	209,6005638	225,3030704	305,9798524	1167,54371	1255,247633	1107,618513
EHI_086690	4,463364276	2,158131557	3,15484E-08	1,25968E-05	543,250441	667,8626731	875,2446941	3211,84046	3065,208309	3035,12614
EHI_075660	5,846536027	2,547582106	3,67613E-08	1,40111E-05	64,16343791	28,1628838	60,48438943	324,7436305	283,268206	285,4014916
EHI_151890	6,461957438	2,691971248	5,07753E-08	1,85109E-05	8,555125055	32,18615292	10,67371578	104,0493926	119,711607	108,4805017
EHI_137080	5,171369376	2,370546356	6,64906E-08	2,32301E-05	337,9274397	346,0011439	629,7492311	2599,044301	2357,284114	1837,184806
EHI_097480	5,685813409	2,507366755	6,95834E-08	2,33383E-05	111,2166257	84,48865141	59,15017496	548,7236387	557,6688855	342,6680226
EHI_165190	0,142220837	-2,81379524	7,64508E-08	2,46554E-05	85,55125055	92,53518964	76,05022495	18,61936499	5,41904394	12,10512036
EHI_039020	4,509001916	2,172808123	8,88401E-08	2,75898E-05	248,0986266	502,9086394	595,9491312	2055,796946	1943,466213	2074,165816
EHI_017760	0,126569959	-2,981993072	9,93337E-08	2,97469E-05	444,8665029	333,9313365	251,277059	37,78635836	49,75667618	42,83350282
EHI_116830	3,100446176	1,632475844	1,20298E-07	3,47826E-05	248,0986266	535,0947923	277,9613485	1001,612311	1112,381929	1176,059001
EHI_197980	0,281450793	-1,829045384	1,49592E-07	4,18111E-05	171,1025011	144,8376881	213,9190538	48,19129761	57,63892191	43,29908437

Anhang

EHI_026360	5,898494319	2,560346732	2,149E-07	5,81269E-05	102,6615007	140,814419	402,9327708	1251,878481	1293,18094	1267,778567
EHI_050490	0,017982069	-5,797297136	2,59289E-07	6,78736E-05	29,94293769	28,1628838	19,56847893	0	0	1,396744657
EHI_184500	3,987209242	1,995379317	2,67123E-07	6,78736E-05	85,55125055	56,32576761	52,03436444	283,1238735	241,8864159	248,1549674
EHI_093130	0,383237187	-1,383690536	4,539E-07	0,00011194	1578,420573	1725,98245	1987,090088	646,2014907	760,1440727	621,5513724
EHI_056490	5,043361869	2,334385745	4,85021E-07	0,000116197	303,7069394	418,4199879	804,5313271	2912,287735	2120,816742	2666,38555
EHI_104570	0,294890039	-1,761751002	8,65632E-07	0,00020162	2425,377953	2381,775316	1803,413229	832,942769	313,3192678	803,1281779
EHI_150770	0,272799843	-1,874085282	1,06249E-06	0,000240784	620,2465665	631,653251	1005,552974	209,7416703	213,8059154	192,2851811
EHI_127670	0,005192322	-7,589404359	1,34938E-06	0,000297752	3832,696025	2108,193016	1003,329283	11,50019602	14,77921075	9,7772126
EHI_060340	3,482527618	1,800134794	1,59578E-06	0,000339089	162,547376	193,1169175	183,2321209	687,8212478	538,9485518	649,9518471
EHI_033700	0,308542517	-1,696458791	1,6176E-06	0,000339089	598,8587538	418,4199879	663,5493311	228,9086637	86,70470304	202,9935568
EHI_148550	3,634735223	1,861850273	2,00862E-06	0,000410787	34,22050022	60,34903672	24,90533682	116,097217	155,6743532	162,4879618
EHI_126550	3,891004807	1,960142763	2,14987E-06	0,000427557	85,55125055	36,20942203	52,03436444	233,2896907	223,6587226	219,2889112
EHI_086530	2,415151048	1,272113421	2,1926E-06	0,000427557	538,9728785	341,9778748	252,6112735	978,6119186	892,664329	866,447269
EHI_154450	0,388392718	-1,364411942	2,40651E-06	0,000458605	2549,427266	2128,309362	2512,77059	709,726383	1229,137694	853,8765671
EHI_114950	4,70060409	2,232846174	2,48366E-06	0,000462789	47,0531878	12,06980734	22,23690788	110,0733048	161,0933971	111,273991
EHI_075700	4,941074806	2,304824898	2,71386E-06	0,000493895	17,11025011	52,30249849	40,9159105	171,9553119	191,144459	182,042387
EHI_131490	0,325856525	-1,617691213	2,76841E-06	0,000493895	201,0454388	229,3263395	249,4981064	64,07252069	95,07958913	62,38792802
EHI_057550	0,253476253	-1,9800775	3,63493E-06	0,000634978	2168,724201	1935,192444	1402,259411	386,6256377	646,8367903	362,2224478
EHI_086380	2,975139117	1,57295713	4,01885E-06	0,000687716	260,9313142	241,3961469	218,3664354	780,3704443	663,0939221	700,7002363
EHI_086570	4,405932109	2,139447265	4,11776E-06	0,000690549	34,22050022	44,25596026	36,91326708	206,4559	123,1600895	178,7833161
EHI_062080	0,043396828	-4,526266596	4,47289E-06		175,3800636	124,7213426	68,93441442	4,381027056	8,374886089	3,259070867
EHI_076370	0,077702035	-3,685903811	4,589E-06	0,000739977	34,22050022	24,13961469	31,13167103	1,642885146	3,448482507	1,86232621
EHI_037550	3,501150034	1,807828887	4,80126E-06	0,000759596	42,77562527	52,30249849	20,45795525	157,1693456	154,6890725	92,65072892
EHI_193440	2,370469625	1,245172907	5,28965E-06	0,000821365	504,7523782	277,6055689	165,4425946	671,3923963	734,0341337	841,3058652
EHI_022620	3,407705149	1,768800512	5,96621E-06	0,000909576	38,49806275	36,20942203	13,34214473	122,1211292	94,58694877	83,33909788
EHI_028920	4,372233078	2,128370311	6,15412E-06	0,000921469	17,11025011	28,1628838	8,894763152	85,43002759	69,4622905	81,94235322
EHI_176590	0,266550095	-1,9075214	7,83625E-06	0,001152754	149,7146885	273,5822998	255,2797024	65,16777745	46,80083403	68,90606975
EHI_177570	3,14103555	1,651240271	8,79859E-06	0,001237333	98,38393813	177,0238411	126,7503749	473,150922	321,2015135	468,8406232
EHI_005657	7,062160533	2,820109616	8,80471E-06	0,001237333	21,38781264	0	8,894763152	79,40611539	66,013808	68,4404882
EHI_023360	0,365908866	-1,450443723	8,8539E-06	0,001237333	6672,997543	6751,045575	5551,666421	2079,892595	2636,611197	2226,876565
EHI_086520	3,200362617	1,678235379	9,30876E-06	0,001279573	136,8820009	28,1628838	64,04229469	236,575461	242,3790562	254,2075276
EHI_169470	3,250706695	1,70075339	1,00684E-05	0,001361664	2463,876016	4477,898525	4993,075295	11069,21248	14473,77372	13253,71005
EHI_069310	2,385814017	1,254481584	1,02352E-05	0,001362259	94,1063756	160,9307646	58,26069864	250,2661706	219,7175997	277,4866052
EHI_034710	3,824892152	1,93541907	1,06391E-05	0,001393887	21,38781264	36,20942203	12,45266841	87,07291273	88,67526447	92,18514737
EHI_153730	0,445044123	-1,167979718	1,25442E-05	0,001607007	1629,751323	1697,819566	2059,582408	659,8922003	950,7958913	786,8328235
EHI_063580	0,311615782	-1,682159792	1,26491E-05	0,001607007	188,2127512	140,814419	173,8926196	47,09604085	54,68307976	54,93862318
EHI_187080	2,448417093	1,291849345	1,34405E-05	0,001682074	188,2127512	80,4653823	38,69221971	254,6471976	249,7686616	248,1549674

EHI_086510	2,22866646	1,15618072	1,40907E-05	0,001737502	4234,786902	4417,549488	2968,627202	8725,36301	8984,774852	8189,113925
EHI_052890	0,41167446	-1,280424146	1,50133E-05	0,001824448	218,1556889	193,1169175	310,427234	96,38259523	119,711607	81,01119011
EHI_144610	0,235578605	-2,085719572	2,29794E-05	0,002752605	2592,202892	2285,216857	1561,475671	436,4598204	682,7995364	397,6066457
EHI_091560	0,385800354	-1,374073627	2,58143E-05	0,003048629	547,5280035	478,7690247	507,890976	217,956096	179,3210904	194,6130889
EHI_171750	3,915827498	1,969317212	2,85051E-05	0,00331966	29,94293769	44,25596026	33,35536182	154,4312037	109,3661595	157,3665647
EHI_156560	4,274697542	2,095822345	3,06259E-05	0,003517786	34,22050022	8,04653823	11,11845394	86,52528435	70,44757122	71,23397751
EHI_042860	3,503598703	1,80883754	3,11731E-05	0,003532246	25,66537516	36,20942203	14,23162104	98,57310875	84,73414161	83,33909788
EHI_050950	0,467500164	-1,096961225	3,20904E-05	0,00357594	1026,615007	1038,003432	1330,656567	496,6989424	520,7208586	569,8718201
EHI_017350	2,872177641	1,522144981	3,24116E-05	0,00357594	42,77562527	32,18615292	11,11845394	87,62054112	74,88133444	84,73584253
EHI_012020	2,342990748	1,228351257	4,80581E-05	0,005233342	2737,640018	2196,704937	2129,406298	5241,351244	5746,649778	5562,302806
EHI_062970	0,301571099	-1,729429918	4,87982E-05	0,005245808	106,9390632	152,8842264	124,9714223	49,28655438	20,19825469	46,55815524
EHI_020100	2,983828339	1,577164539	5,55182E-05	0,005892665	620,2465665	410,3734497	454,0776589	1688,338302	1083,808788	1657,935908
EHI_123830	3,492901394	1,804425915	5,71067E-05	0,005985492	94,1063756	96,55845876	136,5346144	370,1967862	403,4724533	369,206171
EHI_001130	2,597840333	1,377312763	7,24968E-05	0,007504759	3990,965838	4152,013727	4532,771302	11450,36184	11063,22452	10415,99049
EHI_030400	0,355968451	-1,490178714	8,22655E-05	0,008412146	145,4371259	249,4426851	195,6847893	72,28694642	61,58004477	76,35537459
EHI_149870	0,340022421	-1,556298215	9,02321E-05	0,009115621	307,984502	273,5822998	232,5980564	105,1446493	82,76358017	88,9260765
EHI_086540	3,081544849	1,623653788	9,35171E-05	0,00933501	76,99612549	60,34903672	62,70808022	224,5276366	193,6076608	198,3377413
EHI_049170	2,940389547	1,556007298	0,000108404	0,010650348	175,3800636	124,7213426	175,6715722	478,0795775	473,9200246	446,9582903
EHI_006170	3,801141483	1,926432725	0,000109234	0,010650348	290,8742519	209,209994	273,0692288	1173,567623	691,6670629	1073,63106
EHI_006980	2,405927676	1,266593275	0,000112454	0,010838273	14201,50759	31264,82429	22996,07591	55976,38269	55281,14515	53458,07384
EHI_152560	0,390125921	-1,357988237	0,000124195	0,011833816	248,0986266	160,9307646	222,3690788	82,1442573	90,15318555	74,02746683
EHI_097980	2,038007894	1,02715964	0,000129138	0,012166521	384,9806275	346,0011439	234,377009	550,9141523	774,9232834	641,5713792
EHI_012270	2,16144523	1,111996279	0,000138893	0,012940207	22568,41989	17147,17297	16741,27847	40195,92324	44324,33095	37508,18102
EHI_187230	0,436616356	-1,195561919	0,000145594	0,013415476	560,3606911	398,3036424	514,1173102	170,8600552	289,6725306	182,5079685
EHI_085470	3,66721763	1,874685885	0,000153463	0,013913037	51,33075033	56,32576761	78,71865389	253,0043125	242,3790562	188,0949472
EHI_087000	0,305000281	-1,713117521	0,000155877	0,013913037	414,9235652	659,8161348	431,3960128	160,4551159	144,3436249	154,5730754
EHI_003900	0,481939374	-1,053076422	0,00015728	0,013913037	568,9158162	458,6526791	770,7312271	277,0999613	316,2751099	273,2963712
EHI_124390	2,773158436	1,471530043	0,000157631	0,013913037	466,2543155	209,209994	426,059155	1078,827912	948,3326895	1027,538486
EHI_031640	0,390046889	-1,358280528	0,000172701	0,015084372	128,3268758	197,1401866	245,9402011	76,66797348	59,60948334	86,59816874
EHI_071590	2,307870769	1,206562442	0,000188598	0,016155995	3841,25115	3492,197592	3617,944912	7912,134863	9464,606561	7897,659873
EHI_174890	2,390966629	1,257593994	0,0001927	0,016155995	521,8626284	490,838832	494,9935694	1235,997258	1109,918727	1258,932518
EHI_198700	0,383344263	-1,383287505	0,000192755	0,016155995	252,3761891	201,1634557	218,8111735	95,83496684	91,13846626	70,76839596
EHI_090410	2,165013631	1,114376108	0,000193786	0,016155995	410,6460026	366,1174895	299,7535182	726,7028629	839,9518107	764,0193275
EHI_060860	2,231080944	1,157742856	0,000194604	0,016155995	496,1972532	1211,004004	445,6276339	1530,073699	1526,19983	1746,861985
EHI_025440	0,439061788	-1,187504115	0,000212991	0,017356179	141,1595634	140,814419	207,2479814	49,28655438	105,917677	59,5944387
EHI_065250	0,394196463	-1,343013265	0,000213201	0,017356179	817,0144427	535,0947923	998,4371638	247,5280287	351,7452157	327,3038313
EHI_091490	0,430346382	-1,216429754	0,000226168	0,018186552	594,5811913	696,0255569	605,2886325	298,4574682	274,4006795	243,0335703

Anhang

EHI_072140	2,818897447	1,495130993	0,000227739	0,018186552	25,66537516	48,27922938	17,34478815	92,00156817	85,71942232	79,61444546
EHI_091500	0,411381473	-1,281451272	0,000251929	0,019928503	380,7030649	430,4897953	374,9142668	165,9313997	174,8873272	147,1237706
EHI_159600	2,573411927	1,363682409	0,000259515	0,020336793	526,1401909	527,0482541	629,7492311	1551,431206	1160,168044	1619,292639
EHI_167280	0,424190601	-1,237215439	0,000269686	0,020938151	205,3230013	201,1634557	234,377009	87,62054112	90,6458259	93,58189203
EHI_029370	0,394288752	-1,342675541	0,00027929	0,021484796	243,8210641	378,1872968	280,6297774	115,0019602	122,1748088	118,7232959
EHI_120470	0,436530224	-1,19584655	0,000283783	0,021632027	128,3268758	100,5817279	167,6662854	61,88200716	58,62420262	52,61071542
EHI_026000	2,046142031	1,032906292	0,000303617	0,022935383	55,60831286	44,25596026	12,45266841	77,21560186	82,76358017	69,83723286
EHI_190430	2,151498921	1,105342117	0,000309481	0,023169598	307,984502	346,0011439	255,2797024	734,9172886	562,1026487	659,2634782
EHI_030430	0,43549274	-1,199279426	0,000315444	0,023407059	406,3684401	390,2571041	398,4853892	176,336339	196,0708626	148,0549337
EHI_029360	0,242128749	-2,046153709	0,000360217	0,026494901	282,3191268	414,3967188	229,4848893	72,28694642	79,80773802	72,16514062
EHI_086370	2,378929812	1,250312707	0,000369983	0,026976569	149,7146885	60,34903672	77,82917758	243,69463	242,3790562	198,8033229
EHI_029380	0,259701559	-1,945073421	0,000375403	0,027039646	47,0531878	48,27922938	54,25805522	14,23833793	15,76449146	8,846049495
EHI_098570	2,719539689	1,443362481	0,000377297	0,027039646	4979,082782	9378,240307	11024,61419	20660,92359	25383,29446	22982,96775
EHI_156380	2,182172718	1,125765295	0,000396608	0,028182717	1715,302574	1850,703793	531,0173601	3378,867117	3436,166498	2125,379787
EHI_096170	0,352236921	-1,505381958	0,000413252	0,02911867	162,547376	152,8842264	140,981996	42,71501379	64,04324656	54,00746008
EHI_175930	4,451241659	2,154207827	0,000438692	0,030653595	21,38781264	20,11634557	33,35536182	126,5021562	127,1012124	79,61444546
EHI_101290	0,474534619	-1,075414755	0,000463327	0,032107399	586,0260663	543,1413305	602,1754654	274,3618194	291,1504517	256,0698538
EHI_065650	0,41749534	-1,260167999	0,000467322	0,032118809	911,1208183	1166,748043	812,5366139	464,9364963	349,7746543	392,0196671
EHI_197340	2,25138168	1,17081066	0,000480818	0,032777712	235,265939	168,9773028	169,8899762	432,0787934	519,2429375	341,2712779
EHI_097910	2,777122635	1,473590886	0,000503464	0,033977915	76,99612549	116,6748043	112,0740157	226,1705218	287,7019692	335,2187177
EHI_155060	7,421598345	2,891729925	0,000506669	0,033977915	4,277562527	4,023269115	0	23,00039204	16,25713182	22,34791451
EHI_139020	0,517182358	-0,951255032	0,000512187	0,033977915	2878,799581	2088,076671	2784,950343	1302,260292	1626,698463	1080,149202
EHI_051190	0,436955195	-1,194442739	0,000515178	0,033977915	230,9883765	168,9773028	221,4796025	107,8827912	89,16790483	74,49304838
EHI_101630	0,216616789	-2,20678303	0,000518685	0,033977915	423,4786902	173,0005719	352,677359	61,33437878	92,12374698	52,14513387
EHI_149860	0,501090722	-0,996856269	0,000544451	0,035251127	821,2920053	1094,329199	1050,02679	523,5327332	486,2360335	476,2899281
EHI_198010	0,482755841	-1,05063438	0,000550477	0,035251127	1668,249386	1436,307074	1530,788738	857,0384178	648,8073517	731,8942003
EHI_065330	1,963199644	0,973206893	0,000550733	0,035251127	11344,09582	11969,22562	4754,695643	15214,21171	22983,64327	16905,26617
EHI_075710	3,082436893	1,624071359	0,000561895	0,035693113	34,22050022	80,4653823	67,60019995	205,9082716	166,0198007	189,9572734
EHI_095850	0,538811644	-0,892147067	0,000573134	0,03613331	586,0260663	732,2349789	867,6841454	360,8871037	378,3477951	438,5778223
EHI_105250	0,527144255	-0,92373028	0,000578544	0,036202184	530,4177534	651,7695966	745,3811521	351,0297928	317,753031	347,3238381
EHI_176970	2,124612258	1,087199573	0,000606346	0,037660848	4059,406839	4860,109091	4254,365215	11102,07019	7573,360226	9313,958955
EHI_102270	2,824089748	1,497785937	0,000650509	0,040106765	1154,941882	1315,609001	2195,227546	3861,87535	4802,750852	4511,950824
EHI_029350	2,300350106	1,201853451	0,000696314	0,042453487	1471,481509	1227,09708	1531,233477	3133,529602	3376,557015	3219,962016
EHI_097640	0,535192951	-0,90186898	0,000698698	0,042453487	444,8665029	366,1174895	535,9094799	262,8616233	260,1141091	197,8721598
EHI_192510	0,115533952	-3,113611215	0,00071746	0,043279863	171,1025011	76,44211318	84,9449881	16,42885146	10,34544752	11,63953881
EHI_053100	1,717854774	0,780608077	0,000741766	0,044426464	470,531878	575,3274834	309,9824958	748,6079982	752,2618269	828,2695817
EHI_020250	0,325919634	-1,617411829	0,000815007	0,048157401	842,6798179	527,0482541	537,2436944	176,336339	238,9305737	206,2526277

EHI\_062680 0,337044303 -1,568989855 0,000815546 0,048157401 333,6498771 289,6753763 596,3938693 154,4312037 129,5644142 127,1037638

**Tabelle A2: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ( $\text{padj} \leq 0,05$ ) 12 Stunden nach intrahepatischer Infektion in C57BL/6 Mäusen mit den *E. histolytica* Klonen A1 und B2.**

Gen	A1_12_1	A1_12_2	B2_12_1	B2_12_2	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj
Tgm1	268,1688509	154,9050748	31,26143817	27,67519939	0,139305767	-2,843673115	7,61587E-09	0,000125586
Rpph1	4992,620084	4473,22374	830,466901	1259,221572	0,220760929	-2,179443235	1,53598E-07	0,000975461
Rn4.5s	1752,996381	728,3256151	254,1690843	186,8075959	0,177718442	-2,492334693	1,77464E-07	0,000975461
lqce	45,89466912	39,40567693	0	2,767519939	0,032444416	-4,945885978	2,71411E-07	0,001118891
Atp6v0a4	37,79560986	52,99384139	0	0	0	#DIV/0!	1,91146E-06	0,00630401
Cmtm8	434,6495134	591,085154	1945,005132	1841,78452	3,691782847	1,884317695	5,92166E-06	0,016274683
Zfp524	52,19393743	66,58200586	1,359192964	12,45383973	0,116294868	-3,104140657	8,12425E-06	0,019138405
Zfp873	32,39623703	29,89396181	2,718385928	0	0,043640669	-4,518182983	1,21138E-05	0,022460808
Cbx8	21,59749135	19,02343024	0	0	0	#DIV/0!	1,22588E-05	0,022460808
Ube2u	61,19289216	54,35265784	6,79596482	9,686319787	0,142647507	-2,809473565	1,91289E-05	0,030201281
Itga5	165,580767	86,96425255	29,90224521	26,29143942	0,222509574	-2,168060684	2,01464E-05	0,030201281
Dhx57	198,8768995	188,875486	27,18385928	69,18799848	0,24853969	-2,008451836	2,48157E-05	0,034100932
Bace1	477,8444961	384,5450542	156,3071909	76,10679833	0,269500006	-1,891642789	2,86784E-05	0,036377408
Coa7	171,8800353	93,75833478	24,46547335	20,75639954	0,170238482	-2,554370903	3,69029E-05	0,036983575
Saa2	101642,2938	68595,77183	31288,62203	17270,70818	0,285243668	-1,809733235	3,70457E-05	0,036983575
3110056K07Rik	27,89675966	47,55857561	0	5,535039878	0,073355182	-3,768957298	3,81856E-05	0,036983575
Pisd-ps2	23,3972823	13,58816446	0	0	0	#DIV/0!	4,01742E-05	0,036983575
Rbl1	72,89153331	54,35265784	5,436771856	11,07007976	0,129725777	-2,946462914	4,03702E-05	0,036983575
Pde4a	24,29717777	9,511715122	0	0	0	#DIV/0!	6,11839E-05	0,047831579
Ankrd54	22,49738682	14,94698091	0	1,38375997	0,03695509	-4,758083113	6,20598E-05	0,047831579
Lrrc14b	28,79665513	27,17632892	4,077578892	0	0,072849053	-3,778945968	6,34537E-05	0,047831579
Kcnj10	21,59749135	21,74106314	0	1,38375997	0,031929075	-4,968985418	6,65851E-05	0,047831579
Gfod2	30,59644608	40,76449338	1,359192964	6,918799848	0,116001735	-3,107781707	6,74083E-05	0,047831579
Dock3	18,89780493	27,17632892	0	0	0	#DIV/0!	6,96154E-05	0,047831579

**Tabelle A3: Transkriptom-Analyse; Gene mit einer signifikant differentiellen Expression ( $\text{padj} \leq 0,05$ ) 24 Stunden nach intrahepatischer Infektion in C57BL/6 Mäusen mit den *E. histolytica* Klonen A1 und B2.**

Gen	A1_24_1	A1_24_2	B2_24_1	B2_24_2	FoldChange	log2FoldChange	pval	padj
Idi1	18190,67348	19384,68864	5394,683949	2705,681558	0,215576512	-2,213728096	8,8348E-08	0,001590352
Eif4ebp3	81,7357985	42,65418963	456,1273318	1214,974443	13,43437522	3,747857324	2,63823E-07	0,002374542
Dhcr7	731,1638702	637,3520258	158,8561258	127,7999054	0,20946489	-2,255219654	5,24132E-07	0,003144967
Pmvk	1162,134444	1237,791772	360,9304623	223,6498344	0,243582612	-2,037516943	1,74683E-06	0,007861175
Lss	1811,562516	1643,006574	599,214651	296,7408761	0,259353773	-1,947006738	3,14071E-06	0,011307171
Fdps	10555,0638	11604,4004	3233,773414	1843,032197	0,229103266	-2,125930072	4,11362E-06	0,012341553
Nsdhl	1810,819463	2161,419032	421,0855394	226,2758598	0,162971433	-2,617308997	5,01705E-06	0,0129017
Rdh11	1117,551281	1221,386315	324,7206101	185,5724653	0,218173019	-2,1964554	5,74769E-06	0,012933027
Aox3	8506,467466	11633,10995	3624,4894	1784,384295	0,268569374	-1,896633298	1,16552E-05	0,021446015
Hmgcs1	31750,64245	28963,8353	9542,464116	3660,24181	0,217455645	-2,201206934	1,29873E-05	0,021446015
Plekhb1	158,270228	143,5477536	47,30641982	28,88627998	0,25244586	-1,985954079	1,35304E-05	0,021446015
Cyp51	11775,15635	11818,49162	4011,701207	1871,043135	0,249335938	-2,003837256	1,43499E-05	0,021446015
Saa1	134330,5557	108857,5933	37050,85523	33436,74442	0,289848004	-1,786631543	1,54879E-05	0,021446015
Pgm3	335,1167739	297,7590545	1030,812728	1161,140921	3,463481382	1,792222919	2,28483E-05	0,027692102
Sc5d	12493,68833	14057,83657	4510,462719	3391,949543	0,297625552	-1,748429702	2,35375E-05	0,027692102
F830016B08Rik	938,4755773	877,6919789	343,4095661	191,699858	0,294636595	-1,762991467	2,46138E-05	0,027692102

## Danksagung

Prof. Dr. Iris Bruchhaus und PD Dr. Hannelore Lotter möchte ich ganz besonders dafür danken, dass sie mir dieses interessante Thema anvertraut haben und diese Arbeit stets mit Kompetenz und Herz betreut haben. Die zahlreichen Gespräche haben nicht nur für ständige Motivation und Inspiration gesorgt, sondern auch immer wieder geholfen Probleme während der Arbeit erfolgreich zu meistern.

Prof. Dr. Egbert Tannich danke ich dafür, dass er mir die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Die konstruktiven Diskussionen haben immer wieder dazu beigetragen mir neue Blickwinkel zu eröffnen.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen beiden Amöben-Mitstreitern Dr. Jenny Matthiesen und Martin Meyer. Ihr habt in jeglicher Hinsicht dazubeigetragen, dass ich immer mit Spass und Freude diese Arbeit bewältigen konnte.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe „Molekulare Parasitologie“ am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin für die schöne Zeit und die bereitwilligen Hilfestellungen während der letzten Jahre bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei auch an mein ganzes liebes Labor 6. Die harmonische Art und die konstruktiven Gesprächen haben immer wieder geholfen, auch wenn es mal nicht so gut lief.

Dr. Anna Bachmann muss ich für so vieles danken, dass ich es hier eigentlich gar nicht aufzählen kann. Du hast mir immer geholfen, Dinge die nicht gut laufen mit Humor zu nehmen und lieber konstruktiv anzupacken, als den Kopf in den Sand zu stecken.

Ein weiterer Dank gilt auch der AG Horstmann. Besonders Jürgen Sievertsen und Christa Ehmen haben durch ihr Engagement maßgeblich dazu beigetragen, dass die ganzen NGS-Versuche funktioniert haben.

Ebenso möchte ich den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE), insbesondere Thomas Ernst, für die schöne Zusammenarbeit danken.

Aline Adam gebührt ein großes Dankeschön, für die verlässliche Unterstützung bei den zahlreichen Operationen und für die liebevolle Nachsorge der Versuchstiere.

Das größte Dankeschön geht an meine liebe Familie. Liebe Mama, Lieber Papa, Lieber Momo, Liebes Schwesterherz, ohne Eure Unterstützung und den Glauben an meine Person hätte das hier nie funktioniert. Ihr habt mir immer die Kraft gegeben, die ich brauchte. Ich wüsste nicht, was ich ohne Euch machen würde und bin der dankbarste Mensch auf Erden Euch zu haben.

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 31. Oktober 2015



---

Helena Fehling