Genetische Manipulation des protozoischen Parasiten *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) zur Charakterisierung putativer Pathogenitätsfaktoren

Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Corinna Lender

Hamburg, 2019

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. rer. nat. Iris Bruchhaus Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Abteilung Protozoologie Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

Prof. Dr. med. vet. Hannelore Lotter Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Abteilung Molekulare Infektionsimmunologie Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

- Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Iris Bruchhaus Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Abteilung Protozoologie Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg
- Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tim-Wolf Gilberger Bernhard-Nocht-Institut f
 ür Tropenmedizin Abteilung Zellul
 äre Parasitologie Bernhard-Nocht-Stra
 ße 74, 20359 Hamburg

Tag der Disputation: 03.05.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einl	itung	1			
	1.1	Entamoeba histolytica	1			
		1.1.1 Entdeckung	1			
		1.1.2 Lebenszyklus	1			
		1.1.3 Krankheitsbild und Therapie	3			
		1.1.4 Biologie und Morphologie	4			
	1.2	Kulturisolate am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin	5			
	1.3	Pathogenitätsfaktoren von <i>E. histolutica</i>	6			
	1.0	1.3.1 Identifizierung putativer Pathogenitätsfaktoren	g			
		1311 Metalloproteasen	11			
		1312 Alkoholdehydrogenasen	13			
	1 /	Silencing in Entamocha histolutica mittele RNAi	14			
	1.1	Dae CRISPR / Cas System	14			
	1.5	$Das CNOI R/Cas-System \dots \dots$	15			
		1.5.1 Endeckung	10			
		1.5.2 Struktur des CKISP K/Cas-Locus	10			
		1.5.5 Adiaui der CRISPR/Cas-vermitteiten immunadwenr	10			
		1.5.4 Genome-Eaiting mit CRISPR/Cas	18			
			19			
		1.5.4.2 Anwendungen	21			
2	Ziels	etzung	24			
	Material und Methoden 26					
3	Mat	rial und Methoden	26			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material	26 26			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material	26 26 26			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material	26 26 26 27			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material	26 26 26 27 27			
3	Mat 3.1	rial und MethodenMaterial3.1.1Chemikalien3.1.2Reaktionskits3.1.3Marker und Ladepuffer3.1.4Enzyme und Enzyminhibitoren	26 26 27 27 27			
3	Mat 3.1	rial und MethodenMaterial3.1.1Chemikalien3.1.2Reaktionskits3.1.3Marker und Ladepuffer3.1.4Enzyme und Enzyminhibitoren3.1.5Antikörper und Farbstoffe	 26 26 26 27 27 28 28 			
3	Mat 3.1	rial und MethodenMaterial3.1.1Chemikalien3.1.2Reaktionskits3.1.3Marker und Ladepuffer3.1.4Enzyme und Enzyminhibitoren3.1.5Antikörper und Farbstoffe3.1.6Plasmide	26 26 27 27 28 28 28 29			
3	Mat 3.1	rial und MethodenMaterial3.1.1Chemikalien3.1.2Reaktionskits3.1.3Marker und Ladepuffer3.1.4Enzyme und Enzyminhibitoren3.1.5Antikörper und Farbstoffe3.1.6Plasmide3.1.7Oligonukleotide	 26 26 27 27 28 28 29 29 			
3	Mat 3.1	rial und MethodenMaterial3.1.1Chemikalien3.1.2Reaktionskits3.1.3Marker und Ladepuffer3.1.4Enzyme und Enzyminhibitoren3.1.5Antikörper und Farbstoffe3.1.6Plasmide3.1.7Oligonukleotide3.1.8Puffer und Lösungen	 26 26 27 27 28 28 29 29 30 			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.19 Medien und Zusätze	 26 26 27 27 28 29 29 30 31 			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze	26 26 27 27 28 28 29 29 30 31 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10 Verwendete Zellen	26 26 27 27 28 28 29 29 30 31 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Ervthrozyten	26 26 27 27 28 28 29 29 30 31 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.3 Escherichia coli	26 26 27 27 28 28 29 29 30 31 32 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.3 Escherichia coli 3.1.10.4 THP1 Zelllipio	26 26 27 27 28 28 29 29 30 31 32 32 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.3 Escherichia coli 3.1.10.4 THP1-Zelllinie	26 26 27 27 28 29 29 30 31 32 32 32 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10 Verwendete Zellen 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.4 THP1-Zelllinie 3.1.11 Verbrauchsmaterial	26 26 27 28 28 29 29 30 31 32 32 32 32 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10 Verwendete Zellen 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.3 Escherichia coli 3.1.10.4 THP1-Zelllinie 3.1.12 Geräte und Software	26 26 27 27 28 29 29 30 31 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10 Verwendete Zellen 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.3 Escherichia coli 3.1.10.4 THP1-Zelllinie 3.1.12 Geräte und Software Zellbiologische Methoden	26 26 27 28 29 29 30 31 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32			
3	Mat 3.1	rial und Methoden Material 3.1.1 Chemikalien 3.1.2 Reaktionskits 3.1.3 Marker und Ladepuffer 3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren 3.1.5 Antikörper und Farbstoffe 3.1.6 Plasmide 3.1.7 Oligonukleotide 3.1.8 Puffer und Lösungen 3.1.9 Medien und Zusätze 3.1.10 Verwendete Zellen 3.1.10.1 Entamoeba histolytica 3.1.10.2 Erythrozyten 3.1.10.3 Escherichia coli 3.1.10.4 THP1-Zelllinie 3.1.12 Geräte und Software Zellbiologische Methoden	26 26 27 27 28 28 29 29 30 31 32 32 32 32 32 32 32 33 35 35			

	3.2.3	Herstellung von Zelllysat aus E. histolytica Trophozoiten
	3.2.4	Transfektion von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten
	3.2.5	Klonierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten
	3.2.6	Herstellung kompetenter E. coli Zellen
	3.2.7	Hitzeschock-Transformation kompetenter E. coli Zellen
	3.2.8	Kultivierung von THP1-Zellen
	3.2.9	Zellzahlbestimmung
3.3	Bioch	mische Methoden
	3.3.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen
	3.3.2	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
	3.3.3	Coomasiefärbung
	3.3.4	Westernblot
	3.3.5	Immunfluoreszenzanalyse von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten 40
		3.3.5.1 Färbung
		3.3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie
		3.3.5.3 Konfokale Laser-Mikroskopie
3.4	Metho	den zur Charakterisierung phänotypischer und zellulärer Funktionen
	von E	histolytica Trophozoiten
	3.4.1	Größenbestimmung von E. histolytica Trophozoiten
	3.4.2	Bestimmung der Teilungsrate von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten 42
	3.4.3	Bestimmung der Aktivität von Cysteinproteasen in E. histolytica Tro-
		phozoiten
		3.4.3.1 Cysteinprotease-Assay
		3.4.3.2 Substratgelelektrophorese
	3.4.4	Bestimmung der Toleranz von E. histolytica Trophozoiten gegenüber
		Formaldehyd
	3.4.5	Bestimmung der hämolytischen Aktivität von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten 44
	3.4.6	Bestimmung der Erythrophagozytose durch <i>E. histolytica</i> Trophozoiten 45
	3.4.7	Bestimmung der Lyse von THP1-Zellen durch <i>E. histolytica</i> Trophozoiten 45
	3.4.8	Bestimmung der Phagozytose von THP1-Zellen durch E. histolytica
		Trophozoiten mittels Durchflusszytometrie
3.5	Molek	ularbiologische Methoden
	3.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren
		3.5.1.1 Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i> $\ldots \ldots \ldots 47$
		3.5.1.2 Plasmid-Maxi-Praparation aus E . coli
		3.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>E. histolytica</i>
	0 5 0	$3.5.1.4 \text{Isolierung von KNA aus } E. histolytica \dots \dots$
	3.5.2	DNA-Analysen
		3.5.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA
		$3.5.2.2 \text{DNA-Amplifikation mittels PCR} \qquad \dots \qquad \dots \qquad \dots \qquad \dots \qquad \dots \qquad \dots \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad $
		3.5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese
		3.5.2.4 DINA Extraktion und Aufreinigung von DINA-Fragmenten . 50
		3.5.2.5 Ligation von DINA-Fragmenten
		3.5.2.6 Kestriktionsanalyse von DNA $\dots \dots \dots$
		3.5.2.7 Deprosphorylierung von 5 Enden
	2 5 2	3.5.2.8 DINA-Sequenzanalyse
	3.5.3	Nionierung von DINA-Fragmenten
		3.5.3.1 Kionierung der Plasmidkonstrukte pNC-Cas9 und pNC-Cas9 ⁶⁶ 51

			3.5.3.2 Klonierung der Plasmidkonstrukte pNSiA-MP8-1 und pNSiB-	-0
		0 5 4	$MP8-1 \dots \dots$	22 20
		3.5.4	RNA-Analysen	53
			3.5.4.1 Konzentrationsbestimmung von RNA	53
			3.5.4.2 Synthese der cDNA	54
			3.5.4.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR	54
		3.5.5	CRISPR/Cas 5	55
			3.5.5.1 In vitro Transkription und Reinigung von single guide RNAs . 5	55
			3.5.5.2 Screening der Wirksamkeit von sgRNAs in vitro	55
			3.5.5.3 Ribonukleoprotein Komplex	56
			3.5.5.4 Mutationsnachweis auf DNA-Ebene	57
4	Erge	bnisse		5 8
	4.1	Uberp	üfung von Uberexpressions- und Silencing-Transfektanten der Alko-	
		holdeł	ydrogenase und Metalloprotease	58
		4.1.1	Alkoholdehydrogenase	58
		4.1.2	Metalloprotease	30
	4.2	Einflu	s des RNAi-basierten Silencings auf verwandte Gene 6	31
		4.2.1	Alkoholdehydrogenase	31
		4.2.2	Metalloprotease	32
	4.3	Etablie	rung des CRISPR/Cas-Systems in <i>E. histolytica</i> 6	33
		4.3.1	Expression der <i>cas</i> 9 durch <i>E. histolytica</i> Trophozoiten	33
		4.3.2	Expression der <i>cas9^{co}</i> durch <i>E. histolutica</i> Trophozoiten	34
		4.3.3	CRISPR/Cas mit einem Ribonukleoprotein-Komplex	35
		1.0.0	4331 <i>In vitro</i> Transkription und Screening von sgRNAs	35
			4332 Bestimmung der Transfektionseffizienz und Lokalisation des	,0
			RNP-Kompleyes in dem transfizierten F histolutica Klov B2-5P	37
			4 3 3 2 1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfek-	, ,
			tionsoffizionz	38
			43322 Mikroskopische Untersuchung der Transfektionsef	10
			fizionz	70
			4333 Nachweis einer Mutation durch CRISPR / Cas auf DNA-Ebene 7	71
			4.3.3.3.1 Mutationspachwois mit dom Conome Editing Detec	ιT
			4.5.5.5.1 Wutationshachweis nitt dem Genome Lutting Detec-	71
			$1000 \text{ NI} \dots \dots$	71 70
			4.5.5.5.2 Mutationshachweis durch DNA-Sequenzierung /	12
			4.3.3.4 Nachweis einer Mutation durch CKISPK/Cas auf Protein-	70
				(3
			4.3.3.4.1 Mutationsnachweis mittels Substratgelen	74
			4.3.3.4.2 Mutationsnachweis mittels Cysteinproteaseassay 7	75
	4.4	Chara	terisierung der Metalloprotease	76
		4.4.1	Charakterisierung phänotypischer Merkmale der Uberexpressions- und	
			Silencing-Transfektanten	76
		4.4.2	Generierung und Verifizierung von <i>ehmp8-1-</i> Silencern, <i>ehmp8-1/-2-</i> Dop-	
			pelsilencern und gegenseitige Beeinflussung der Expression der <i>ehmp8-</i>	
			1- und <i>ehmp8</i> -2-Gene	77
		4.4.3	Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität	79
		4.4.4	Bestimmung der hämolytischen Aktivität	30
		4.4.5	Bestimmung der Erythrophagozytose 8	31
		4.4.6	Bestimmung der Lyse und Phagozytose von THP1-Zellen 8	32

	4.5	Chara	kterisierung der Alkoholdehydrogenase	85
		4.5.1	Charakterisierung phänotypischer Merkmale der Überexpressions- und	
			Silencing-Transfektanten	85
		4.5.2	Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität	86
		4.5.3	Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Erythrophagozytose	87
		4.5.4	Lokalisation der ADH mittels Westernblot	88
		4.5.5	Lokalisation der ADH mittels Immunfluoreszenz über einen Myc- <i>Tag</i>	
			sowie Immunserum	89
		4.5.6	Bestimmung der Toleranz gegenüber Formaldehyd	93
5	Disk	kussion		95
	5.1	Etabli	erung des CRISPR/Cas-Systems in <i>E. histolytica</i>	96
		5.1.1	Reduktion von <i>Off-target</i> Effekten des CRISPR/Cas-Systems	96
		5.1.2	Analyse der Expression der <i>cas9/cas9^{co}</i> durch <i>E. histolytica</i>	97
		5.1.3	Analyse der Funktionalität von <i>in vitro</i> transkribierten sgRNAs	100
		5.1.4	CRISPR/Cas-System mit einem Ribonukleoprotein-Komplex	101
		5.1.5	Analyse von Mutationen auf DNA-Ebene	103
			5.1.5.1 Mutationsnachweis mit dem <i>Genome Editing Detection</i> Kit	103
			5.1.5.2 Mutationsnachweis durch DNA-Sequenzierung	104
		5.1.6	Analyse von Mutationen auf Proteinebene	105
	5.2	Chara	kterisierung der Metalloprotease	106
		5.2.1	Verifizierung von Überexpression und Silencing der <i>ehmp8</i> -2	107
		5.2.2	Generierung und Verifizierung von <i>ehmp8-1-</i> Silencing -Transfektanten	
			und <i>ehmp8-1/ehmp8-2</i> Doppelsilencern	108
		5.2.3	Einfluss des Silencings der <i>ehmp8-2</i> und <i>ehmp8-2</i> auf verwandte Gene	109
		5.2.4	Phänotypische Merkmale der Überexpressions- und Silencing-Trans-	
			fektanten	109
		5.2.5	Einfluss von Überexpression und Silencing der <i>ehmp8-2</i> auf Pathoge-	
			nitätsindikatoren	110
			5.2.5.1 Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität	110
			5.2.5.2 Bestimmung der Erythrophagozytose	112
			5.2.5.3 Bestimmung der hämolytischen Aktivität	112
			5.2.5.4 Bestimmung der Lyse und Phagozytose von THP1-Zellen	114
	5.3	Chara	kterisierung der Alkoholdehydrogenase	116
		5.3.1	Verifizierung von Überexpression und Silencing der <i>adh</i>	117
		5.3.2	Einfluss des Silencings der <i>adh</i> auf verwandte Gene	117
		5.3.3	Phänotypische Merkmale der Überexpressions- und Silencing-Trans-	
			fektanten	118
		5.3.4	Einfluss von Überexpression und Silencing der <i>adh</i> auf Pathogenitäts-	
			indikatoren	118
			5.3.4.1 Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität	118
			5.3.4.2 Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Erythropha-	
			gozytose	119
		5.3.5	Lokalisationsstudien	119
			5.3.5.1 Westernblot-Analyse	120
			5.3.5.2 Immunfluoreszenzanalyse	120
		5.3.6	Toleranz gegenüber Formaldehyd	121

In halts verzeichn is

6	Zusammenfassung & Abstract6.1 Zusammenfassung6.2 Abstract	123 123 125	
7	Ausblick	128	
Lit	Literaturverzeichnis		
Pu	Publikationen		
Ab	Abbildungsverzeichnis		
Ta	Tabellenverzeichnis		
Da	Danksagung		
Eid	Eidesstattliche Erklärung		

Abkürzungsverzeichnis

A Adenin	
Abb. Abbildung	
ADH Alkoholdehydrogenase	
AG Arbeitsgruppe	
ALA Amöbenleberabszess	
APS Ammoniumperoxodisulfat	
AS Aminosäure	
as antisense	
ATCC <i>American Type Culture Collection</i>	
BCA bicinchoninic acid assay	
BNITM Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin	
bp Basenpaare	
BSA bovines serum albumin	
bzw. beziehungsweise	
C Cytosin	
C _T cycle of threshold	
Cas CRISPR-assoziiert	
Cas9n Cas9 Nickase	
cDNA <i>comlpementary</i> DNA	
CLSM confocal laser scanning microscope	
co codonoptimiert	
CoA Coenzym A	
CP Cysteinprotease	
CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repe	eats
CRISPRi CRISPR-Interferenz	
dCas9 <i>dead</i> Cas9	
dH ₂ O destilliertes Wasser	
DIC differential interference contrast	
DMSO Dimethylsulfoxid	
DNA <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	
DSB Doppelstrangbruch	
dsDNA doppelsträngige DNA	
DTT Dithiothreitol	
E Extinktion	
E64 L-trans-Epoxyuccinyl-1-leucylamido-4-(guanidino)	-buta
E. coli Escherichia coli	
E. dispar Entamoeba dispar	
E. histolytica Entamoeba histolytica	
E. invadens Entamoeba invadens	
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	
EhCox Entamoeba histolytica Cvclooxygenase	
EhCP Entamoeba histolytica Cysteinprotease	
EhMP Entamoeba histolytica Metalloprotease	

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ECL	enhanced chemiluminescence
EZD	extrazelluläre Domäne
F	Farad
FACS	fluorescent activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC-A	Fluoresceinisothiocvanat-Area
FM	Fluoreszenzmikroskop
FSC	forward scatter
o	Frdbeschleunigung
s G	Guanin
G Gal/GalNAc	Galaktose /N-Acetyl-D-Galaktosamin
o Gui Vi C	Gramm
	conomische DNA
CmbH & Co KC	Cocolleghaft mit haschränkter Haftung & Compagnia Kommanditgesell
GIIDIT&CO. KG	sebett
COI	Schalt
GOI	gene of interest
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h LIDL	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HDR	homology-directed repair
HEPES	4-2-Hydrogenethylpiperazin-1-ethansulfonsäure
HIV-1	humane immundefizient Virus
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
Indels	Insertion-/Deletionsmutationen
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
Kal	Kalibraor
kDA	Kilodalton
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
L	Liter
LF	lösliche Fraktion
М	Mol pro Liter
m	milli
mA	Milliampere
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
MW	molecular weight
Myc	Myelocytomatose
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nCas9	Nickase Cas9
NHFI	non-homologous end joining
NIS	Nuclear Localization Signal
nn.	non nathogenic
nc	non-puntozenic nicht signifikant
115	Nucleotid
	INUKIEUUU antiaaha Diahta
UD	optische Dichte
р	patnogen

PAM	protospacer adjacent motif
PBS	phosphatate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE-A	Phycoerythrin-Area
PFA	Paraformaldehyd
prä-crRNA	Vorläufer-CRISPR-RNA
qPCR	quantitative PCR
Ref	Referenzgen
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S. pyogenes	Streptococcus pyogenes
S. thermophilus	Streptococcus thermophilus
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	single guide RNA
SP	Signalpeptid
sRNA	smallRNA
SSC	sideward scatter
Т	Thymin
T7EI	T7 Endonuklease I
Tab.	Tabelle
TALEs	Transcriptionsactivator-like effectors
TBS	tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
tracrRNAs	transaktivierenden crRNAs
tRNA	Transfer-RNA
TY	Trypticase Yeast
UF	unlösliche Fraktion
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
v. Chr.	vor Christus
WB	Westernblot
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Z-Arg-Arg-pNA	Benzyloxycarbomyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid
z. B.	zum Beispiel
ZD	zytoplasmatische Domäne
ÜN	über Nacht
Δ	Delta, Differenz
ϵ	Epsilon, Extinktionskoeffizient
μ	mikro
μm^2	Quadratmikrometer
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Entamoeba histolytica

1.1.1 Entdeckung

Im Menschen können mehrere Arten von Darmamöben leben, von denen jedoch nur eine, *Entamoeba histolytica (E. histolytica)*, zu den humanpathogenen zählt. Infektionen mit solchen protozoischen Parasiten stellen in vielen tropischen und subtropischen Regionen der Erde ein grundlegendes medizinisches Problem dar. Da es viele Ursachen der für die von *E. histolytica* ausgelösten Symptome gibt (siehe 1.1.3), ist der vermeintliche Nachweis in frühesten Aufzeichnungen nur spekulativ und lässt Spielraum für andere Interpretationen. Die aus dem Sanskrit-Dokument Brigu-samhita um 1000 v. Chr. stammende Aufzeichnung über blutigen, mukösen Diarrhö stellt möglicherweise die erste Beschreibung der durch *E. histolytica* verursachten Symptome dar, gefolgt von der Beschreibung hepatischer und perianaler Abszesse im Corpus Hippocratorum (Cox, 2002).

Die Amöbe selbst, *E. histolytica*, wurde erstmals 1875 vom St. Petersburger Arzt Fyodor Alexandrovich Lesh (auch bekannt als Fedor Lösch) beschrieben, der amöboide Trophozoiten (siehe 1.1.2) im Stuhl und Darmgeschwür eines Bauern fand, der an Ruhr starb (Magon, 2010). 1903 etablierte Fritz Schaudinn die Bezeichnung *Entamoeba histolytica*, weil er erkannte, dass dieser Parasit in der Lage ist, Gewebe zu lysieren (Guerrant, 1986). Schaudinn starb im Alter von 35 Jahren an einer starken Verlaufsform der durch *E. histolytica* verursachten und als Amöbiasis bezeichneten Erkrankung (siehe 1.1.3), als Folge eines Selbstversuchs mit diesem Erreger (Despommier und Gwadz, 1995).

1.1.2 Lebenszyklus

Der Parasit zeichnet sich durch einen einfachen Lebenszyklus, bestehend aus zwei verschiedenen Stadien aus. Die Infektion beginnt mit der oralen Aufnahme von vierkernigen Zysten (9-19 µm) durch verunreinigtes Trinkwasser oder Nahrungsmittel. Der Parasit kommt vor allem in tropischen und subtropischen Regionen vor, wo die meist unzureichenden hygienischen Standards die Übertragung des Erregers begünstigen. Die als infektiöse Überdauerungsform bezeichneten Zysten gelangen in den Magen des Wirts und überleben die Passage auf Grund ihrer chitinhaltigen, säureresistenten Hülle. Hervorgerufen durch die pH-Wert-Änderung im Dünndarm kommt es dort zur Exzystierung, bei der achtkernige Trophozoiten entstehen. Diese entwickeln sich im weiteren Verlauf durch Plasmateilungen zu einkernigen Trophozoiten (12-60 µm). Trophozoiten repräsentieren das aktive, bewegliche Stadium von *E. histolytica* und besiedeln den Dickdarm. Sie sind von einer einfachen Zellmembran umgeben und zeichnen sich durch ihre amöboide Fortbewegung mit Hilfe von Pseudopodien aus, die aus der Plasmamembran ausgestülpt werden und gerichtete Motilität ermöglichen. Außerhalb des Wirts sind Trophozoiten nicht überlebendsfähig (Moss, 2016; Stanley, 2003; Burchard und Tannich, 2004; Mehlhorn, 2012). Im Dickdarm ernähren sie sich überwiegend von Bakterien und Detritus (Salles et al., 2003). Nach asexueller Zweiteilung im unteren Dickdarm des Wirts enzystieren die Trophozoiten wieder zu Zysten und werden über den Fäzes des Wirts ausgeschieden. Somit können sie von einem neuen Wirt aufgenommen werden und der Lebenszyklus schließt sich (Moss, 2016; Burchard und Tannich, 2004; Mehlhorn, 2012).

In Stuhlproben von Patienten können beträchtliche Mengen von bis zu 100 Millionen Zysten nachgewiesen werden, die nach der Ausscheidung für einen Zeitraum von mehreren Wochen bis Monaten, sogar unter ungünstigen Umweltbedingungen, infektiös bleiben (Salles et al., 2003; Burchard und Tannich, 2004).



Abbildung 1.1: Lebenszyklus von *E. histolytica* und klinische Manifestationen. Durch fäkal-orale Übertragung (1) gelangen die infektiösen, vierkernigen Zysten (2) über den Magen in den Dünndarm, wo sie zu Trophozoiten exzystieren (3). Die Trophozoiten besiedeln den oberen Dickdarm (4) und vermehren sich durch Zellteilung. Durch Enzystierung kommt es zur Ausbildung reifer Zysten, die über den Stuhl ausgeschieden werden und einen neuen Wirt infizieren können. Bei der intestinalen Verlaufsform der Amöbiasis (A) entstehen Schäden am Darmepithel und die Trophozoiten gelangen über den Blutkreislauf hauptsächlich in die Leber, wo sie einen Amöbenleberabszess (B) induzieren (modifiziert nach Wuerz et al., 2012).

1.1.3 Krankheitsbild und Therapie

Die Infektion mit *E. histolytica* kann über mehrere Monate bis Jahre asymptomatisch verlaufen und unentdeckt bleiben, was als nicht-invasive Form der Amöbiasis bezeichnet wird (Blessmann et al., 2003). *E. histolytica* kann jedoch nicht nur im Darm des Wirts persistieren, die Infektion kann auch einen pathologischen Verlauf nehmen (Burchard und Tannich, 2004). Bei einer invasiven Amöbiasis besiedelt der Erreger nicht nur das Darmlumen, sondern penetriert die Darmwand und verursacht eine sogenannte Amöbenkolitis. Dies tritt in 4-10 % der Fälle ein. Typische Symptome sind Bauchschmerzen, starke, wässrige, blutige Diarrhöen, die als Himbeergelee-artig beschrieben und durch Fieber begleitet werden können. Gewichtsabnahme und Anorexie können ebenfalls auftreten (Mehlhorn, 2012).

Durch die Schäden an der Darmmukosa können die Trophozoiten in den Blutkreislauf des Wirts gelangen, was zu einer extra-intestinalen Verlaufsform führen kann. Die Trophozoiten gelangen dann in verschiedene Organe wie z. B. die Leber, in denen sie die Ausbildung von ALAs verursachen. Symptome sind Fieber und Schmerzen im rechten Oberbauch (Burchard und Tannich, 2004). So genannte Amöbenleberabzsesse (ALA) heilen bei rechtzeitiger Diagnose und adäquater medikamentöser Behandlung vollständig aus. Ein unbehandelter ALA weist hingegen eine sehr hohe Letalitätsrate auf (Salles et al., 2003; Burchard und Tannich, 2004). Seit der Einführung einer wirksamen medizinischen Behandlung und Schnelldiagnose ist die Sterblichkeitsrate jedoch auf 1-3 % gesunken (Stanley, 2003). Im Jahre 2013 wurden 11.300 Todesfälle durch die Folgen einer *E. histolytica*-Infektion verzeichnet. Mit einer prozentualen Veränderung von -39.1 % seit 1990 ist die Krankheit somit rückläufig (Herricks et al., 2017).

E. histolytica-Infektionen sind grundsätzlich behandlungsbedürftig. Zur Therapie einer asymptomatischen Verlaufsform wird die Verabreichung von Kontaktamöbiziden (wie Paromomycin) über einen Zeitraum von 10 Tagen empfohlen. Bei invasiven, intestinalen oder extraintestinalen Manifestationen werden zunächst systemisch wirkende Nitroimidazol-Derivate, wie Metronidazol über 10 Tage verabreicht. Intraluminal verbleibende Amöben werden ergänzend mit Paromomycin bekämpft. Metronidazol durchquert die Membran der bereits in das Gewebe eingedrungenen Amöben durch passive Diffusion. Danach wird seine Nitrogruppe durch Ferredoxin oder Flavodoxin zu Nitroradikalen reduziert. Die Selektivität von Metronidazol für anaerobe oder mikroaerophile Mikroorganismen ist auf das Redoxpotenzial ihrer Elektronentransportkomponenten zurückzuführen, die für die Reduktion der Nitrogruppe verantwortlich sind und toxische Metabolite erzeugen. Diese Metaboliten wie N-(2-Hydroxyethyl)oxaminsäure und Acetamid können mit der DNA reagieren und Addukte mit Guanosin bilden. Darüber hinaus kommt es zu Transversionen von Guanin (G) und Cytosin (C) und Einzel- und Doppel-Strangbrüche (DSB) in der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) (Hernández Ceruelos et al., 2019).

Als alternative Therapieoption zu Metronidazol untersuchten Martínez-Castillo et al. 2018 Flavonoide auf ihre amöbizide Wirkung zum Einsatz als ergänzende und/oder spezifische Therapie gegen E. histolytica-Infektionen (Martinez-Castillo et al., 2018).

Ebenfalls als neuer Ansatzpunkt für eine amöbizide Chemotherapie wurde 2018 die Pantothenat-Kinase von Nurkanto et al. als Schlüsselenzym des Biosynthesewegs des Coenzyms A (CoA) identifiziert. Es ist physiologisch essentiell und unterscheidet sich ausreichend von seinen menschlichen Orthologen, so dass dieses Enzym ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer amöbizider Chemotherapien darstellt (Nurkanto et al., 2018).

Laut Burchard und Tannich (2004) stellt die Expositionsprophylaxe durch entsprechende Hygiene die einzige Maßnahme zur Verhinderung einer *E. histolytica*-Infektion dar. Eine medikamentöse Prophylaxe wird nicht empfohlen, ein Impfstoff steht bisher nicht zur Verfügung (Burchard und Tannich, 2004).

1.1.4 Biologie und Morphologie

Taxonomisch wird *E. histolytica* dem Stamm der Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Ordnung Entamoebida, Familie Entamoebidae und der Gattung *Entamoeba* zugeordnet und stellt die einzige, humanpathogene Spezies dar. Im Menschen kann noch eine weitere, mit *E. histolytica* eng verwandte aber genetisch unterschiedliche Protozoenart, *Entamoeba dispar*, existieren. Beide kolonisieren den menschlichen Darm, allerdings lebt *E. dispar* dort als apathogener Kommensale. Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit lassen sich die beiden Arten von *Entamoeba* nur durch einen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) oder mittels Polymerase Ketten Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) sicher voneinander unterscheiden (Nesbitt et al., 2004; Chihi et al., 2019).

Der obligat anaerobe Parasit *E. histolytica* ist optimal an seinen parasitären Lebensraum im menschlichen Darm adaptiert, da er im Gegensatz zu freilebenden Amöben das Vorhandensein von Bakterien- oder Gewebesubstraten benötigt, um seinen Nährstoffbedarf zu decken (Widmer und Nettleman, 1991). Dieses Leben in einer an komplexen Nährstoffquellen reichen Umgebung führte vermutlich zum Verlust verschiedener Gene, die am Stoffwechsel beteiligt sind. Im Genom von *E. histolytica* wurde eine signifikante Anzahl von Genen (mindestens 68) beschrieben, die durch horizontalen Gentransfer von Bakterien aufgenommen wurden. Sie sind an Stoffwechselprozessen beteiligt, die für den anaeroben Lebensstil des Parasiten charakteristisch sind (Weedall und Hall, 2011).

Das Genom von *E. histolytica* wurde 2005 von Loftus et al. als eines der ersten Protisten-Genome vollständig sequenziert. Mit einer Genomgröße von 23,7 Mbp ist es z. B. vergleichbar mit dem von *Plasmodium falciparum*, enthält mit ca. 8500 Genen jedoch fast doppelt so viele. Davon haben nur 25,1 % Introns, deren Größe im Durchschnitt 102,1 bp beträgt. Die Größe der Gene wird mit 1167 pb im Mittel angegeben, wobei sie zu 75,9 % aus Adenin (A) und Thymin (T) bestehen (Clark et al., 2007; Weedall und Hall, 2011).

Unter dem Lichtmikroskop betrachtet fällt die Vielzahl von Vakuolen und Vesikeln unter-

schiedlichster Größe und Gestalt im Parasiten auf. Etwa 40 % des Zellvolumens von *E. his-tolytica* werden von diesen lysosomenartigen, pinozytären Vesikeln eingenommen, deren Inhalt in ständigem Austausch mit dem extrazellulären Raum steht (Scholze und Tannich, 1994).

Ein definierter Golgi-Apparat, wie er typischerweise bei eukaryotischen Zellen vorkommt, fehlt in *E. histolytica*. 2005 zeigten Bredeston et al. jedoch, dass Golgi-Apparat-ähnliche Funktionen sowie Komponenten der Glykoprotein-Faltungsqualitätskontrolle in *E. histolytica* vorkommen (Bredeston et al., 2005).

Darüber hinaus fehlen in *E. histolytica* klassische Mitochondrien. Doch durch Immunlokalisation von mitochondrialem Chaperonin 60 wurden sehr kleine, doppelmembrangebundene Organellen kryptischer Funktion entdeckt, die als Mitosom bezeichnet wurden. Sie stellen eiförmige Strukturen mit einem Durchmesser von weniger als 0,5 µm dar. Die Anzahl der identifizierbaren mitosomalen Proteine ist jedoch sehr gering und bietet keinen großen Einblick in die Entwicklung oder Funktion dieser Organelle (Clark et al., 2007; Hjort et al., 2010).

1.2 Kulturisolate am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Im Jahre 1967 wurden in Mexiko bei einer Kolon-Biopsie eines adulten, männlichen Amöbenkolitis-Patienten Amöben isoliert (HM-1:IMSS). Diese werden in der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Katalog-Nummer 30459 geführt (siehe Abb. 1.2). Daraus entwickelten sich zwei Zelllinien (A und B), welche sich bezüglich verschiedener morphologischer und biochemischer Merkmale unterscheiden (Biller et al., 2009). Als Pathogenität wird in dieser Arbeit die Fähigkeit der Trophozoiten definiert, nach intrahepatischer In-



Abbildung 1.2: Übersicht der verwendeten *E. histolytica* Klone und ihr Ursprung. Aus dem ursprünglichen Isolat HM-1:IMSS entstand eine apathogene (np) und eine pathogene (p) Zelllinie, die jeweils kloniert bzw. subkloniert wurden.

Sarah Corinna Lender

jektion ALAs in Tiermodellen (*Meriones unguiculatus, Mus musculus*) induzieren zu können. Somit wurde die Zelllinie A als apathogen (*non-pathogenic*, np) bezeichnet, und die Zelllinie B als pathogen (p). Die apathogene HM-1:IMSS-Zelllinie A wurde für die Genom-Sequenzanalyse verwendet (Loftus et al., 2005) und befindet sich seit 2001 am BNITM in axenischer Kultur ohne Wirtspassagen. Daraus wurden 12 Klone generiert (A1^{np}-A12^{np}) welche alle nicht in der Lage sind, ALAs im Tiermodell zu induzieren (Dissertation Matthiesen, 2012; Meyer et al., 2016). Für weitere Versuche wurde der Klon A1^{np} als Repräsentant dieser apathogenen Zelllinie verwendet.

Die HM-1:IMSS-Zelllinie B hingegen wurde bereits im Jahr 1991 direkt von der ATCC bezogen und wird seitdem im BNITM unter axenischen Bedingungen ohne Wirtspassage kultiviert, was ihre Pathogenität nicht beeinflusst. Daraus wurden ebenfalls 12 Klone generiert (B1-B12), welche sich stark in ihrer Fähigkeit, ALAs im Tiermodell zu induzieren, unterscheiden (Dissertation Matthiesen, 2012; Meyer et al., 2016). Der pathogene Klone B2^p wurde zusätzlich subkloniert, so dass im Folgenden entweder B2^p oder B2-5^p verwendet wurden, welche sich nicht voneinander unterscheiden. Als apathogener Klon der Zelllinie B wurde B8^{np} für weitere Untersuchungen eingesetzt.

Im Zeitverlauf der induzierten Abszesse mittels bildgebender Magnetresonanztomographie in den beiden Tiermodellen zeigte sich, dass auch die als apathogen bezeichneten Klone A1^{np} und B8^{np} in geringem Maße in der Lage waren eine Abszessbildung auszulösen. Diese ALAs waren jedoch deutlich kleiner als die ALAs, die bei einer Infektion mit dem Klon B2^p beobachtet wurden. Darüber hinaus heilten die kleineren ALAs schnell aus, so dass sie am siebten Tag nach der Infektion nicht mehr erkennbar waren. Da sich die Unterteilung in pathogen und apathogen auf Tag sieben nach der Infektion bezieht, wurde die Nomenklatur der Klone beibehalten (Meyer et al., 2016).

Vergleiche dieser drei Klone mit identischem genetischen Hintergrund zeigten eine starke Varianz bezüglich ihres Phänotyps. Der pathogene Klon B2^p zeichnet sich durch die Induktion eines ALAs aus, sowie durch die höchste Cysteinproteaseaktivität, Größe und Wachstumsrate. Der apathogene Klon B8^{np}, aus der gleichen B-Zelllinie phagozytiert mehr Erythrozyten und ist am beweglichsten. Der ebenfalls apathogene Klon A1^{np} weist die stärkste hämolytische und zytopathische Aktivität auf (Meyer et al., 2016).

1.3 Pathogenitätsfaktoren von E. histolytica

E. histolytica besitzt eine starke, zytotoxische Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Säugetierzelltypen, darunter Neutrophile, T-Lymphozyten, Makrophagen und verschiedene Gewebekulturzelllinien. Auf diese starke, zytotoxische Aktivität ist auch der Name des Parasiten zurückzuführen (gr.: histo = Gewebe; lytica = Lyse) (Ralston, 2015). Es wurden bereits einige Effektorproteine identifiziert, die an der Abtötung von Wirtszellen beteiligt sind, aber um den grundlegenden Mechanismus der Pathogenese besser zu verstehen und die Entwicklung neuer Therapeutika zu ermöglichen, müssen weitere molekulare Akteure identifiziert werden, die die Wirtszellzerstörung spezifisch vermitteln.

Ralston und Petri (2011) beschrieben den Prozess der Tötung von Zielzellen mit den Schritten der Anheftung, Induktion der Apoptose und der Aufnahme der abgetöteten Zelle (siehe Abb. 1.3) (Ralston und Petri, 2011).



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der schrittweisen Abtötung und Aufnahme von Wirtszellen durch *E. histolytica*. Die Adhärenz des Parasiten (grau) an die Zielzelle (grün) wird durch ein parasitäres Oberflächenlektin Gal/GalNAc-Lektin (lila) vermittelt. Als nächstes induziert die Amöbe einen Calciumeinstrom in die Zielzelle, die Tyrosin-Dephosphorylierung und die Aktivierung der Caspase 3. Schließlich wird die abgetötete Zielzelle aufgenommen (modifiziert nach Ralston und Petri, 2011).

Das eigene Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal/GalNAc)-Lektin auf der Parasitenoberfläche vermittelt die Bindung an Wirt-Kohlenhydrat-Determinanten, die Gal und/oder GalNAc enthalten. Es wurde gezeigt, dass das Gal/GalNAc-Lektin die Bindung an eine Vielzahl von Substraten vermittelt, einschließlich Kolon-Mucin-Glycoproteine, Neutrophile, Erythrozyten, einige Bakterien und eine Vielzahl von Säugerzelllinien (Petri, 1996; Horstmann et al., 1992). Über das Gal/GalNAc-Lektin wird vermutlich nicht nur diese Adhäsion an die Zielzelle vermittelt, es ist auch an der Tötung selbst beteiligt. Dies beweist die Zugabe von monoklonalen Anti-Gal/GalNAc-Lektin-Antikörpern, welche die Zytotoxizität blockierten, ohne dass die Adhärenz beeinflusst wurde (Ralston, 2015).

Nach dem Parasitenkontakt kommt es dann zu einem drastischen Calciumeintrag in die Zielzelle. Dies wurde durch die Feststellung belegt, dass Ca²⁺ Kanalblocker die amöboide Zytotoxizität blockieren, während der Na⁺ Kanalblocker keinen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung von E. histolytica zeigten (Ralston und Petri, 2011).

Es wird angenommen, dass die Zerstörung der Wirtszelle durch den Prozess der Trogozytose erfolgt, d. h. die Aufnahme mehrerer Fragmente lebender Zellen in mehreren Schritten, die zur Erhöhung von Ca²⁺ im Zytosol und zum Verlust der Integrität der Plasmamembran führen (Somlata et al., 2017). Daneben wurde ein Rückgang der Tyrosinphosphorylierung der Wirtszelle nach Parasitenkontakt festgestellt. Als zentraler Bestandteil der Pathogenese der Amöbiasis wird die Parasiten-induzierte Apoptose angesehen. Diese wird nach dem Kontakt mit *E. histolytica* durch die Aktivierung der Caspase 3 induziert. Die Verwendung eines Caspase 3-Inhibitors zur Blockierung der Zytotoxizität stellte einen eindeutigen Beweis dafür dar. Da Apoptose eine potenziell immunologisch stille Art des Tötens ist, kann dies die relativ schwache Entzündungsreaktion erklären, die bei der invasiven Amöbiasis trotz umfangreicher Gewebszerstörungen beobachtet wurde. Ein verbleibendes Rätsel ist jedoch, wie der Parasit in der Lage ist, die Apoptose innerhalb von Minuten durchzuführen, während der apoptotische Tod typischerweise Stunden benötigt, um abgeschlossen zu werden (Ralston und Petri, 2011).

Als weiterer Pathogenitätsfaktor werden die so genannten Amoebapores angesehen, bei denen es sich um Poren-formende Peptide handelt. Sie lagern sich in die Membranen von Bakterien oder eukaryotischen Zellen ein und bilden Poren, die zur Lyse der Zielzellen führen (Zhang et al., 2004). In *E. histolytica* sind drei Isoformen beschrieben, die *Amoebapores* A, B und C, welche die gleiche molekulare Größe aufweisen, sich aber in ihrer Primärstruktur deutlich voneinander unterscheiden. Sie werden von den Amöben bei Kontakt zur Zielzelle in den interzellulären Raum der Kontaktzone sezerniert (Leippe et al., 1994).

Es wird postuliert, dass der hohe Gehalt an Cholesterol (46,5 % pro Mol Phospholipide) in der Plasmamembran von *E. histolytica* Trophozoiten diese vor (autologen) Membranporenbildenden Toxinen (wie z. B. *Amoebapores*) schützt (Andrä et al., 2004).

Als weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor werden die Cysteinproteasen (CP) von *E. histolytica* mit Molekularmassen im Bereich von 16 bis 96 kDa konstatiert. Sie befinden sich auf der Trophozoitenoberfläche oder werden in das extrazelluläre Medium sezerniert, und sind an der Degradierung der extrazellulären Matrix beteiligt. Somit spielen sie eine entscheidende Schlüsselrolle in der Pathogenese der Amöbiasis, bei der Gewebeinvasion, der Zerstörung des Wirtsgewebes und der Modulation der zellvermittelten Immunantwort (Faust et al., 2011; Ankri et al., 1999).

Durch Homologieabgleiche innerhalb des *E. histolytica*-Genoms wurden 50 Cysteinproteasen identifiziert, sowie 4 Aspartatproteasen, 10 Serinproteasen und 22 Metalloproteasen (Tillack et al., 2007).

Bereits 1999 konnten Ankri et al. *in vivo* die Korrelation zwischen der Menge aktiver Cysteinproteasen und der Pathogenität der Amöben zeigen. Sieben Tage nach einer intrahepatischen Infektion von Trophozoiten in Hamstern, die eine deutlich verminderte Expression einer Cysteinprotease (EhCP-A5) aufwiesen, konnten keine Bildung von ALAs nachgewiesen werden (Ankri et al., 1999).

1.3.1 Identifizierung putativer Pathogenitätsfaktoren

Zur Identifizierung putativer Pathogenitätsfaktoren wurden bereits diverse vergleichende Studien zwischen pathogenen und apathogenen Isolaten durchgeführt (Biller et al., 2009). Dabei wurden jedoch das pathogene Isolat HM-1:IMSS mit dem nicht-pathogenen Rahman-Isolat verglichen, welche zwei völlig unterschiedliche genetische Hintergründe aufweisen. Damit war die einfache Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren nahezu unmöglich. Darüber hinaus zeigte eine detaillierte phänotypische Charakterisierung des Rahman-Isolats eine Reihe von genomischen Defekten, die vermutlich seine Virulenz beeinträchtigen (Davis et al., 2007; Ahn et al., 2018).

Die beiden Ursprungszelllinen A und B (siehe 1.2), welche einen identischen genetischen Hintergrund aufweisen, wurden bereits 2010 von Biller et al. auf Transkriptom-Ebene verglichen. Dabei wurden 6242 Gene untersucht, von denen jeweils 87 differentiell in den beiden Zelllinien transkribiert wurden (Schwellenwert≥zweifach). Davon zeigten nur 19 Gene eine fünffache oder höhere differentielle Expression. Zwei Moleküle (EHI_039020 und EHI_088020) wurden bereits in einer proteomischen Vergleichsstudie dieser Zelllinien als Teil des Oberflächenproteoms identifiziert (Biller et al., 2009).

Vor kurzem wurden auch die Unterschiede in den Genexpressionsprofilen der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} analysiert (siehe Abb. 1.4).



Abbildung 1.4: Übersicht der differentiell exprimierten Gene zwischen den *E. histolytica* Klonen A1^{np} und B2^p sowie B8^{np} und B2^p. Darstellung des x-fach differentiellen Expressionslevels von A1^{np} und B8^{np} jeweils zum pathogenen Klon B2^p. Hervorgehoben sind die in der Arbeit näher untersuchten Gene EHI_042870 codierend für eine Metalloprotease, und EHI_088020 codierend für eine Alkoholdehydrogenase. Der Vergleich des nicht-pathogenen Klons A1^{np} mit dem pathogenen Klon B2^p ergab 76 differentiell exprimierte Gene (Schwellenwert≥dreifach). Davon wurden im Klon A1^{np} 46 Gene stärker und 30 schwächer als im Klon B2^p exprimiert. Die Mehrheit der zwischen A1^{np} und B2^p differentiell exprimierten Gene zeigte eine drei- bis fünffache, differentielle Expression. Die größten Unterschiede (20-200-fach differentielles Expressionslevel) betrafen Gene, die für C2-Domänenproteine, GTPasen der Rab-Familie, Zelloberflächenprotease gp63 (=EhMP8-2) und ein hypothetisches Protein codieren, dessen Expression im Klon A1^{np} höher war. Die am stärksten erhöhte Expression im Klon B2^p wurde für Gene ermittelt, die für hypothetische Proteine codieren.

Vergleiche der beiden B-Klone B2^p und B8^{np} zeigten nur 19 unterschiedlich exprimierte Gene. 12 Gene wurden im Klon B8^{np} im Vergleich zum Klon B2^p auf höherem Niveau und sieben Gene schwächer exprimiert (Schwellenwert≥dreifach). Nur in B2^p zeigten drei Gene eine größere differentielle Expression als zehnfach, verglichen mit B8^{np}. Diese Gene codieren zwei hypothetische Proteine und ein *leucine rich repeat* Protein.

Interessanterweise wurden nur sechs Gene in den beiden nicht-pathogenen Klonen A1^{np} und B8^p ähnlich reguliert im Vergleich zum pathogene Klon B2^p (Meyer et al., 2016).

Auf die beiden, in Abb. 1.4 blau dargestellten Gene EHI_042870 (codierend für eine Metalloprotease) und EHI_088020 (codierend für eine Alkoholdehydrogenase) wird nachfolgend genauer eingegangen (siehe 1.3.1.1, 1.3.1.2).

Verschiedene dieser differentiell exprimierten Gene wurden in *E. histolytica* Trophozoiten überexprimiert, und die ALA-Bildung im Tiermodell (*Meriones unguiculatus*) am siebten Tag nach der Infektion analysiert (siehe Abb. 1.5).

Die transfizierten Trophozoiten, welche das Gen EHI_042870, codierend für die *Entamoeba histolytica* Metalloprotease (EhMP8-2) überexprimieren (B2^p 042870_ÜE) konnten keinen ALA im Tiermodel mehr induzieren. Auch die Überexpression des Gens EHI_088020, codierend für die Alkoholdehydrogenase (ADH), führte im Tiermodell zu signifikant kleineren ALAs als bei der Kontrolle (B2^p pNC) (Meyer et al., 2016).

Die Expression der beiden Gene EHI_042870 und EHI_088020 wurde ebenfalls in den jeweiligen Klonen von *E. histolytica* inhibiert. Dafür wurde das unter 1.4 beschrieben Verfahren verwendet, welches auf Ribonukleinsäure Interferenz (*ribonucleic acid*, RNAi) beruht. Es wird nachfolgend als "Silencing" bezeichnet, und die Transfektanten als "Silencer".

Im Tiermodell konnten die Trophozoiten, in denen die EhMP8-2 bzw. die ADH gesilenct wurde, jedoch keine signifikant verstärkte ALA Formation induzieren (Matthiesen et al., 2018).

Die beiden Proteine werden nachweislich mit der Pathogenität der *E. histolytica* Trophozoiten assoziiert, so dass sie putative Pathogenitätsfaktoren darstellen. Dabei ist zu beachten, dass ihre Präsenz negativ mit der Pathogenität korreliert.

Im Folgenden werden die Proteine näher beschrieben.



Abbildung 1.5: Analyse der ALA-Formation nach Infektion von Meriones unguiculatus mit verschiedenen E. histolytica Transfektanten. In Trophozoiten des Klons B2^p wurden Gene überexprimiert, die in den Klonen A1^{np} und B8^{np} jeweils höher exprimiert werden als in B2^p. Die ALA-Bildung [mm²] wurde am siebten Tag nach Infektion der Leber von Meriones unguiculatus im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Markiert sind die Gene EHI_042870 und EHI_088020, die für eine Metalloprotease bzw. Alkoholdehydrogenase codieren, welche in dieser Arbeit charakterisiert werden sollen. (Mittelwerte±Standardfehler, Mann-Whitney U-Test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001) Modifiziert nach Meyer et al., 2016

1.3.1.1 Metalloproteasen

Wie unter 1.3 beschrieben sind bei *E. histolytica* vier Klassen an Proteasen bekannt, unter anderem Metalloproteasen. Das *E. histolytica* Genom enthält zwei Homologe zum Leishmanolysin (gp63) von *Leishmania major*, EhMP8-1 und EhMP8-2. Sequenzanalysen zeigten dass die Aminosäuresequenzen von EhMP8-1 und EhMP8-2 zu 34 % identisch und zu 54 % einander ähnlich sind (Teixeira et al., 2012).

Auf der Webseite www.amoebadb.org wird das Gen EHI_042870 als codierend für eine putative Zelloberflächenprotease gp63 bezeichnet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Protein "EhMP8-2" genannt. Das codierende Gen (*ehmp8*-2) besteht aus 2039 bp, wobei die transkribierende mRNA ohne Intron eine Länge von 1989 bp besitzt. Die Aminosäuresequenz umfasst 662 Aminosäuren (AS) und das Molekulargewicht beträgt 75,5 kDa (Aurrecoechea et al., 2011).

Die EhMP8-2 ist in Abb 1.6 schematisch dargestellt und besteht aus vier charakteristischen Motiven: ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus (AS 1-16), eine extrazelluläre Domäne (EZD) (AS 17-597), eine Transmembrandomäne (TMD) (AS 598-620) und eine am C-Terminus gelegene, zytoplasmatische Domäne (ZD) (AS 621-662). In der extrazellulären Domäne befinden sich die am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren (H₂₀₇, E₂₀₈, H₂₁₁, H₂₆₇, M₂₇₈) (Tillack et al., 2007).



Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Gens EHI_042870 codierend für die putative Metalloprotease EhMP8-2. Die EhMP8-2-codierende Aminosäuresequenz besteht aus einem Signalpeptid (rot), einer extrazellulären Domäne (blau), einer Transmembrandomäne (grau) und einer zytoplasmatischen Domäne (grün). Die AS des aktiven Zentrums sind gelb dargestellt.

Die verwandte Metalloprotease EhMP8-1, welche durch das Gen EHI_200230 codiert wird, unterscheidet sich nur minimal von der in Abb. 1.6 dargestellten EhMP8-2. So ist die Aminosäureseqenz der EhMP8-1 19 AS kürzer und die am aktiven Zentrum beteiligten AS liegen um bis zu drei Positionen versetzt. Die Transmembrandomäne der EhMP8-1 liegt sieben AS weiter am C-terminalen Ende, wodurch die zytoplasmatische Domäne kürzer ist.

Diese beiden Metalloproteasen werden als Pendant zum Leishmanolysin bezeichnet. Leishmanolysin wurde bereits in den 1980er Jahren entdeckt und als ein wichtiges Oberflächenantigen beschrieben, das auf Promastigoten verschiedener Leishmania-Arten vorkommt. Aufgrund seines Glykosylierungszustandes wurde dieses *Leishmania*-Oberflächenprotein (60-66 kDa) zunächst GP63 genannt. Nachdem die Proteaseaktivität des Proteins identifiziert wurde, wurde es als so genannte *Major Surface Protease*, beschrieben und später als Zink-Metalloprotease spezifiziert. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde GP63 dann von der IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) Enzym Nomenklatur als Leishmanolysin bezeichnet. Diese Metalloprotease ist nicht nur in verschiedenen Arten von Leishmanien, sondern auch in verschiedenen Trypanosoma-Arten und *Trichomonas vaginalis* vorhanden. Inzwischen wurden Homologe in den meisten Tierklassen gefunden.

Leishmanolysin wird als Protease beschrieben, die schnell auf eine Vielzahl von Substraten reagieren kann. Sie ist an Zellsignalwegen und deren Regulation beteiligt und beeinflusst die antimikrobiellen und inflammatorischen Funktionen von Makrophagen. Somit stellt das Leishmanolysin einen wichtigen Virulenzfaktor dar, der zum Überleben der Parasiten in der Anfangsphase der Infektion beiträgt (Isnard et al., 2012).

Teixeira et al. charakterisierten 2012 die EhMP8-1 und konnten zeigen, dass es sich um eine funktionelle Metalloprotease handelt, die auf der Oberfläche der *E. histolytica* Trophozoiten lokalisiert ist. Durch das Silencing der EhMP8-1 wurde die Adhärenz der Trophozoiten an Gewebe-Zellkulturrasen fünffach erhöht, wobei die Oberflächenfärbung mehrerer Antigene, darunter *galactose adherence lectin* unverändert blieben. Darüber hinaus adhärierten die EhMP8-1 gesilencten Trophozoiten ebenfalls verstärkt sowohl an lebensfähige als auch

an apoptotische Jurkat-Lymphozyten. Die Zerstörung von Zellkulturschichten wurde durch das Silencing der EhMP8-1 reduziert. Auch die Mobilität der Trophozoiten wurde reduziert, aber die phagozytotische Aktivität durch die Abwesenheit der EhMP8-1 gesteigert (Teixeira et al., 2012).

1.3.1.2 Alkoholdehydrogenasen

ADHs sind in allen Organismen allgegenwärtig und zeigen vielseitige Substratspezifitäten. Sie werden in drei Gruppen unterteilt: Zinkhaltige Lang-/Mittelketten-Isoenzyme (Gruppe I ADHs), metallfreie, kurzkettige (250 bis 350 Aminosäuren) Isoenzyme (Gruppe II ADHs) und eisenhaltige ADHs (Gruppe III ADHs) mit einer Größe von etwa 385 Aminosäureresten pro Untereinheit (Elleuche et al., 2013).

ADHs katalysieren die Umwandlung von Aldehyden zu Alkoholen, sowie deren Rückreaktion. In der beispielhaften Reaktionsgleichung (siehe Abb. 1.7) ist der Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) erforderlich um reduzierende Äquivalente (Wasserstoffatome und Elektronen) aus dem Alkohol aufzunehmen. Dadurch wird der Alkohol zu dem Produkt Acetaldehyd oxidiert und der Cofaktor NAD⁺ wird zum Produkt NADH + H⁺ reduziert. Es handelt sich dabei um eine Redox-Reaktion die reversibel ist und auch mit Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) als Cofaktor stattfinden kann (Cederbaum, 2012).

$$H_{3C} \sim C \approx O + NADH + H^{+} \qquad \underbrace{ADH}_{H_{3C}} \sim C \sim OH + NAD^{+}$$
Acetaldehyd Ethanol

Abbildung 1.7: Beispielhafte katalysierte Reaktion einer Alkoholdehydrogenase. Eine Alkoholdehydrogenase katalysiert die Reaktion eines Aldehydes (Acetaldehyd) zu einem Alkohol (Ethanol), sowie die Rückreaktion (modifiziert nach Stryer et al., 2018).

Das *E. histolytica* Genom codiert ein komplexes System von Alkohol- oder Aldehyddehydrogenasen. Insgesamt gibt es 25 vorhergesagte Gene, von denen drei auf der Liste der lateraler Gentransfer Kandidaten stehen. Die Alkoholdehydrogenase ADH1 war die erste Alkoholdehydrogenase, die in *E. histolytica* charakterisiert wurde und ist ein NADPH-abhängiges Enzym (Clark et al., 2007).

1994 charakterisierten Bruchhaus et al. die NAD⁺-abhängige EhADH II näher. Da dem Parasiten das terminale Cytochrom Oxidase System fehlt, sind andere Wege notwendig, um oxidierte Nikotinamid-Nukleotide zu erzeugen. Es wird postuliert, dass die ADHs als Schlüsselenzyme der Amöbenglykolyse fungieren. Unter anaeroben Bedingungen werden reduzierende Äquivalente [NAD(P)⁺] durch sequentielle Reduktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd und Ethanol erzeugt. Acetyl-CoA wird dabei zuerst durch eine Acetaldehyddehydrogenase in ein enzymgebundenes Thiohämiacetal umgewandelt, welches anschließend durch eine NAD⁺-abhängige ADH reduziert wird (Bruchhaus und Tannich, 1994).

Im Rahmen der Transkriptomanalysen wurde das für eine ADH-codierende Gen EHI_088020 sowohl zwischen B8^{np} und B2^p (3,5-fach), als auch zwischen A1^{np} und B2^p (2,9-fach) als differentiell exprimiert identifiziert. Im Folgenden wird das Enzym nur noch als Alkoholdehydrogenase (ADH) bezeichnet. Mit einer Länge von 382 Aminosäuren wird das Enzym der Klasse III der Alkoholdehydrogenasen zugeordnet.

Die Überexpression des Gens im pathogenen Klon B2^p führte zu einer signifikanten Reduktion der Pathogenität (siehe Abb. 1.5), so dass dieser ADH ein Einfluss auf die Pathogenität zugesprochen wird (Meyer et al., 2016).

1.4 Silencing in Entamoeba histolytica mittels RNAi

Gen-*Knockout* ist ein geeignetes und häufig verwendetes Werkzeug, um die spezifische Funktion von Proteinen in Organismen zu untersuchen. Gen-*Knockouts* mittels homologer Rekombination sind aufgrund der polyploiden DNA-Organisation von *E. histolytica* jedoch nicht möglich (Morf und Singh, 2012). Daher wurden verschiedene RNAi-basierte Methoden für den Gen-*Knockdown* etabliert. Beispielsweise konnte ein Silencing von Amöbengenen mittels ds-Haarnadel-RNA verschiedener Länge erzielt werden, wobei die Effizienz zwischen 40 % und 80 % schwankte und der Verlust des Gen-Silencings trotz des Vorhandenseins des Haarnadel-RNA enthaltenen Plasmids beobachtet wurde (Morf und Singh, 2012).

In weiteren Studien wurde das Silencing durch Fütterung der Amöben mit Bakterien, die dsRNA gegen ein bestimmtes Gen exprimieren, untersucht, sowie die Verabreichung bakteriell exprimierter kleiner (*small*) sRNAs. Dabei wurden ebenfalls große Unterschiede in der Effizienz des Silencings beobachtet, und die Methode war nicht auf alle getesteten Gene anwendbar (Morf und Singh, 2012).

In *E. histolytica* wurde ein reichhaltiges Repertoire von sRNAs nachgewiesen. Diese besitzen eine Länge von 27 nt, 22 nt oder 16 nt, wobei die 27 nt langen sRNAs am häufigsten vorkommen. Die Sequenzierung der sRNAs ergab, dass es sich um gegenläufige (*antisense*, as) sRNAs zu Genen handelt. Sie besitzen 5'-Polyphosphat-Termini, was auf einen unabhängigen Biosyntheseweg hinweist und können robustes Silencing vermitteln (Morf und Singh, 2012).

Morf et al. zeigten 2013, dass ein kleiner Teil einer gencodierenden Region, von der eine

große Anzahl von as sRNAs gebildet wird, ausreicht, um das Silencing eines damit fusionierten Gens zu vermitteln. Somit konnten sie das Silencing von chromosomal codierten Genen wie die *E. histolytica* rhomboide Protease erzielen. Dabei ist die Trigger-Wirkung von einer großen Anzahl von as sRNAs der Triggerregion abhängig, aber unabhängig von der Platzierung des Triggergens (5' oder 3') zu dem fusionierten Gen.

Trotz Verlust des ursprünglichen Trigger-Gen-Plasmids wird das Silencing aufrechterhalten. Die Persistenz von sRNAs und Gen-Silencing trotz Verlust des initiierenden Plasmids deutet darauf hin, dass der chromosomale Locus in der Lage ist, die sRNA-Produktion und -Amplifikation aufrechtzuerhalten (Morf et al., 2013).

In den bisher beschriebenen Fällen des RNAi-basierten Silencings in *E. histolytica* wurden die ersten 132 bp der Sequenz des Gens EHI_197520 als Trigger verwendet. Da das Gen in den Klonen A1^{np}, B2^p und B8^{np} exprimiert wird, kann es nicht als Trigger verwendet werden. Daher wurden weitere Trigger-Regionen identifiziert, die das Silencing in den A- und B-Klonen ermöglichen. Mit diesen neu identifizierten Triggerregionen konnten 15 von 24 ausgewählten, unterschiedlich exprimierten Genen erfolgreich gesilenct werden (Matthiesen et al., 2018).

Diese Methode dient als Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche.

1.5 Das CRISPR/Cas-System

1.5.1 Entdeckung

Bereits in den 1980er Jahren wurden hochkonservierte, palindromische Sequenzen von ca. 29-35 Nukleotiden im Genom von *E. coli* und *S. typhimurium* beschrieben, die sich mit nichtrepetitiven Sequenzen abwechseln (Ishino et al., 1987; Stern et al., 1984). Aufgrund ihrer charakteristischen Struktur wurden diese Loci als *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) bezeichnet, welche in ca. 50 % aller Bakterien und 85 % der Archeen nachgewiesen werden konnten. Als 2005 drei unabhängige Studien zeigten, dass die Sequenzen Homologien zu Phagen- und Plasmid-DNA aufweisen, wurde vermutet, dass ihre Anwesenheit mit der Resistenz gegenüber der jeweiligen Phagen korreliert (Richter et al., 2012). Der erste direkte Nachweis, dass das CRISPR-System Bakterien vor Phagen oder Plasmiden schützen kann, wurde in einer Studie mit *Streptococcus thermophilus* erbracht. Nach Infektion mit Phagen konnten in einigen Bakterien neue Sequenzen nachgewiesen werden, die Bereichen des viralen Genoms entsprachen und zu einer Resistenz gegenüber dieser Viren bei einer Zweitinfektion führten. Damit wurde der Nachweis geliefert, dass das CRISPR-System einen adaptiven Abwehrmechanismus in Prokaryoten darstellt (Barrangou et al., 2007).

1.5.2 Struktur des CRISPR/Cas-Locus

Das typische Merkmal eines CRISPR-Locus ist eine Reihe von palindromischen Wiederholungssequenzen (*Repeat*) mit einer Länge von ca. 20-50 bp, die durch variierende Abstandssequenzen (*Spacer*) mit ähnlicher Länge unterbrochen sind. Die Repeats innerhalb eines CRISPR-Locus sind konserviert, können sich aber in verschiedenen CRISPR-Loci sowohl in der Sequenz als auch in der Länge unterscheiden. Darüber hinaus variiert die Anzahl der *Repeat-Spacer*-Einheiten in einem CRISPR-Locus innerhalb eines Organismus und zwischen den verschiedenen Individuen stark. Die *Spacer* vermitteln die sequenzspezifische Immunität, da sie bei einem Phagenangriff in den CRISPR-Locus integriert werden (siehe Abb. 1.8) (Wiedenheft et al., 2012).

Die Sequenzen im fremden Genom, aus dem die *Spacer* abgeleitet werden, bezeichnet man als *Protospacer*. In *S. thermophilus* wurde bei der Analyse der *Protospacer* in den Phagengenomen ein angrenzendes Motiv (*protospacer adjacent motif*, PAM) identifiziert (Richter et al., 2012). Diese kurzen (2-4 bp), konservierten Sequenzen wurden ebenfalls in der Nähe von *Protospacern* anderer CRISPR-Systeme entdeckt und stellen die Basis für die selbst/nichtselbst Diskriminierung des prokaryotischen Immunsystems dar. Sie verhindern eine Autoimmunreaktion der Zelle, da die PAM-Sequenz nur in der Fremd-DNA vorkommt (Marraffini und Sontheimer, 2010). Die genaue PAM-Sequenz variiert je nach CRISPR-Typ. So besteht die PAM-Sequenz in *S. pyogenes* aus einem 5'-NGG, während sie z. B. bei *Neisseria meningiditis* aus 5'-NNNGATT gebildet wird (Ran et al., 2013b).

Angrenzend an die CRISPR-Loci wurden AT-reiche Sequenzen von 300-500 bp Länge identifiziert, die als *Leader*-Sequenzen bezeichnet werden. Sie dienen nachweislich als Promotor für die Transkription des CRISPR-Locus und sind innerhalb einer Spezies hoch konserviert. In unmittelbarer Nähe zum CRISPR-Locus identifizierten Jansen et al. (2002) ebenfalls eine Reihe von CRISPR-assoziierten (*cas*) Genen, die ausschließlich in Genomen gefunden wurden, die CRISPR-Sequenzen enthalten und für eine Vielzahl von Cas-Proteinen codieren (Jansen et al., 2002). Haft et al. fanden bereits 2005 bei der Analyse von 200 prokaryotischen Genomen 45 verschiedene Proteinfamilien, die mit CRISPR assoziiert werden (Haft et al., 2005). Dieses hochkomplexe CRISPR/Cas-System wurde daraufhin in drei Typen eingeteilt, wobei die Gene *cas1* und *cas2* in allen aktiven CRISPR/Cas-Systemen vorhanden sind. Ihnen wird eine Rolle bei der Integration der *Spacer* während der Adaptionsphase zugesprochen (Jiang und Doudna, 2015).

1.5.3 Ablauf der CRISPR/Cas-vermittelten Immunabwehr

Im ersten Schritt der CRISPR-vermittelten Immunität werden neue, kurze DNA-Segmente aus einem eindringenden Virus oder Plasmid als neue *Spacer*-Einheiten in den CRISPR-Locus integriert. Der Einbau erfolgt an dem Ende, an welchem die *Leader*-Sequenz lokalisiert ist. Dafür wird zunächst die *Repeat*-Sequenz verdoppelt, wodurch die *Repeat-Spacer-Repeat*-Struktur erhalten bleibt (Wiedenheft et al., 2012). Die Position der *Spacer-Sequenzen repräsentiert somit eine chronologische Darstellung zurückliegender Angreiferkontakte und bildet das immunologische Gedächtnis (Deveau et al., 2008).*

Im nächsten Schritt werden die *cas*-Gene, die für eine Vielzahl von Cas-Proteinen codieren, transkribiert und translatiert. Des Weiteren wird eine lange Vorläufer-CRISPR-RNA (prä-crRNA) vom *Leader*-Bereich aus exprimiert und diese Vorläufer-Sequenz dann in reife crRNAs prozessiert. Der Ablauf, sowie die beteiligten Proteine variieren dabei, worauf die



Abbildung 1.8: Übersicht über das adaptive Immunsystem CRISPR/Cas und die verschiedenen Typen. Aus der vom Phagen in die Zelle eingeschleusten Nukleinsäure wird ein neuer Spacer (grün markiert) in den CRISPR-Array eingebracht. Ein typischer CRISPR-Locus besteht aus einer AT-reichen Leader-Sequenz stromaufwärts des CRISPR-Arrays (graue Box), einer Reihe von repetitiven DNA-Sequenzen, die *Repeats* (brauner Diamant) und nichtrepetitiven Spacern (farbige Boxen), sowie einer Reihe von CRISPR-assoziierten (cas) Genen (dargestellt als Pfeile). Während der Expressionsphase werden cas-Gene transkribiert und translatiert, und der CRISPR-Array wird in eine lange prä-crRNA transkribiert. In Typ Iund Typ III-Systemen wird die prä-crRNA durch Cas6-Endoribonukleasen weiter in kleine, reife crRNAs gespalten, während in Typ II-Systemen eine Verarbeitung eine kleine tracrRNA beinhaltet, um Basenpaare mit der Wiederholungssequenz der prä-crRNA Transkription zu bilden. Innerhalb des Wiederholungsbereichs erfolgt eine Spaltung durch die RNase III. In der Interferenzphase dienen reife crRNAs als Wegweiser um Cas-Proteine entweder als zusammengesetzter, großer, multisubunitärer Überwachungskomplex in Systemen des Typ I und des Typs III oder ein einzelnes, multifunktionales Cas9-Protein im Typ II-System, an die passende Sequenz mit angrenzendem PAM-Motiv auf der eindringende Nukleinsäuren zu leiten und deren Abbau zu vermitteln (modifiziert nach Jiang und Doudna, 2015).

Unterteilung der verschiedenen CRISPR/Cas-Systeme in 3 Typen basiert. In jedem System formen die reife crRNA mit einem oder mehreren Cas-Proteinen einen Komplex, welcher die Abwehr der Nukleinsäuren bewirkt (Wiedenheft et al., 2012).

In den Systemen vom Typ I und Typ III wird die prä-crRNA hauptsächlich durch die Cas6-Endoribonuklease prozessiert. Die reife crRNA trägt dann einen ca. 8-nt langen Abschnitt des *Repeat* am 5'-Ende und einen längeren Bereich der *Repeat*-Sequenz am 3'-Ende. Dieser Teil bildet meistens eine Haarnadelstruktur aus (Tsui und Li, 2015).

Charakteristisch für das CRISPR/Cas-System vom Typ II ist das Vorhandensein des *cas9*-Gens. Angrenzend an den CRISPR-Locus Typ II befindet sich zusätzlich eine atypische Familie von kleinen nicht-codierenden, transaktivierenden crRNAs (tracrRNAs), die für die crRNA-Reifung und die CRISPR/Cas-Methodik benötigt werden. Die Prozessierung von prä-crRNA-Transkripten in Typ II CRISPR-Cas-Systemen beinhaltet eine Basenpaarung zwischen einer kleinen tracrRNA und dem Wiederholungssegment der prä-crRNA, gefolgt von einer Spaltung innerhalb der Wiederholungsregion durch eine endogene RNase III. Bakterien mit einem Typ II-System verwenden ein einzelnes CRISPR-assoziiertes Protein, Cas9, um DSB in viraler DNA oder eindringenden Plasmiden zu erzeugen. Die Cas9-Endonuklease enthält zwei Nukleasedomänen, eine RuvC-Domäne und ein HNH-Motiv. Jede Domäne schneidet einen Strang, so dass es zu einem DSB kommt. Durch die Basenpaarung mit der 3'-Wiederholungsregion einer reifen crRNA rekrutiert der Hybrid (tracrRNA:crRNA) die Cas9-Endonuklease, welche dann die fremde DNA spaltet (Jiang und Doudna, 2015).

1.5.4 Genome-Editing mit CRISPR/Cas

Die Fähigkeit, DNA-Sequenzen an genau festgelegten Stellen zu verändern, ist nicht nur für die Molekularbiologie, sondern auch für die Medizin und in der Biotechnologie von großem Interesse. Daher ist das Einfügen von gewünschten Veränderungen in das Genom, d. h. das "Genome-Editing" ein seit langem angestrebtes Ziel. Der erste Meilenstein wurde in den späten 1970er Jahren erreicht, als Restriktionsenzyme entdeckt wurden, welche es Wissenschaftlern ermöglichten, DNA in Reagenzgläsern zu manipulieren.

Die Entdeckung und Verwendung von eukaryotischen Zink-Fingerproteinen läutete einige Jahre später eine neue Ära im Bereich des *Genome-Targetings* bzw. *-Editings* ein. Zinkfinger (ZF) sind Zinkionen-regulierte kleine Proteinmotive, welche sequenzspezifisch an die DNA binden. Jeder ZF erkennt eine 3 bp lange DNA-Sequenz, wobei eine kombinatorische Anordnung von 6-7 ZF auch eine deutlich höhere DNA-Bindungsspezifität erreichen kann. Zur Herstellung einer programmierbaren Nuklease koppelten Forscher den Zinkfinger-Komplex mit der DNA-Spaltdomäne der Fok I-Endonuklease, wodurch die DNA an gewünschter Stelle geschnitten werden kann (Adli, 2018).

Auch die Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektoren (Transcriptionsactivator-like effectors,

TALEs) können für das *Genome-Editing* verwendet werden. Bei TALEs handelt es sich um natürliche, bakterielle Effektorproteine, die von *Xanthomonas sp.* eingesetzt werden, um die Gentranskription in Wirtspflanzen zu modulieren und die bakterielle Besiedlung zu erleichtern. Der zentrale Bereich des Proteins enthält Tandem-Wiederholungen von 34 Aminosäuresequenzen (sogenannte Monomere), welche für die DNA-Erkennung und -Bindung verantwortlich sind und nach einem einfachen Verfahren neu angeordnet werden können. Da die TALEs DNA-Bindungsmonomere auf einzelne Nukleotide zielen, sind sie wesentlich variabler als ZF-Module (Sanjana et al., 2012).

Den Grundstein für die Verwendung des CRISPR/Cas-Systems zur Modifikation von Genen legten Jinek et al. im Jahre 2012. Sie zeigten, dass die tracrRNA und crRNA zu einer einzigen chimären (*single guide*, sg) RNA fusioniert und so modifiziert werden können, dass sie eine sequenzspezifische DNA-Spaltung durch die Cas9-Endonuklease vermittelt. So konnte *in vitro* das Gen, das für das grün fluoreszierende Protein codiert, mit verschiedenen chimären RNAs und der Cas9 effizient jeweils an der richtigen Stelle geschnitten werden. Die Cas9 kann dadurch mit der sgRNA programmiert werden, die als ein einziges Transkript abgelesen wird, um jede dsDNA-Sequenz von Interesse zu binden und zu spalten. Das System ist effizient, vielseitig und programmierbar, indem die DNA-Zielbindungssequenz in der chimären sgRNA modifiziert wird.

Gegenüber ZF und TALEs hat die CRISPR/Cas-basierte Methodik zur Manipulation von Genomen den Vorteil, dass nur eine neue sgRNA designt werden muss und kein neues Protein. Dies birgt ein erhebliches Potenzial für die Anwendung im Bereich *Genome-Targeting* und *-Editing* (Jinek et al., 2012).

1.5.4.1 Reparaturmechanismen

Ein entscheidender erster Schritt zur gezielten Genombearbeitung ist die Erzeugung eines DSB an dem zu modifizierenden Genom-Locus. Nuklease-induzierte DSBs wie sie durch das CRISPR/Cas-System erzielt werden, können durch einen von zwei verschiedenen Pfaden repariert werden, die in fast allen Zelltypen und Organismen wirksam sind: nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ) oder Homologie-gerichtete Reparatur (*homology-directed repair*, HDR).



Abbildung 1.9: Reparaturmechanismen von DSB. DSBs, welche durch die Cas9-Endonuklease (gelb) induziert werden, können auf zwei Arten repariert werden. Im fehleranfälligen NHEJ-Pfad werden die Enden eines DSB von endogenen DNA-Reparaturmaschinen wieder verbunden, wodurch zufällige Indel Mutationen an der Verbindungsstelle entstehen können. Indel Mutationen, die innerhalb der codierenden Region eines Gens auftreten, können zur Verschiebung des Leserahmens und der Bildung eines vorzeitigen Stoppcodons führen, womit ein Gen-Knockout einhergeht. Alternativ kann eine Reparaturvorlage z. B. in Form eines Plasmids verwendet werden, welches im HDR-Weg genutzt wird, um mit einer hohen Genauigkeit eine Zielsequenz zu ersetzten (modifiziert nach Ran et al., 2013b).

NHEJ kann zu einer effizienten Einführung von Insertion-/Deletionsmutationen (Indels) unterschiedlicher Länge führen, die den translatorischen Leserahmen eines Gens verschieben, wodurch es zu Leserahmen-Mutationen und vorzeitigen Stoppcodons kommt. Ebenfalls können durch die Indels die Bindungsstellen von regulatorischen Faktoren in Promotoren oder Verstärkern gestört werden, wodurch die Transkription behindert wird. Mehrere, benachbarte DSBs können zusätzlich genutzt werden, um größere Deletionen im Genom zu erzielen.

HDR ist ein alternativer, wichtiger DNA-Reparaturmechanismus. Obwohl HDR typischerweise bei niedrigeren und wesentlich variableren Frequenzen als NHEJ auftritt, kann es genutzt werden, um präzise, definierte Modifikationen in einer Zielsequenz in Anwesenheit einer exogen eingeführten Reparaturvorlage zu erzeugen. Im Gegensatz zu NHEJ ist HDR im Allgemeinen nur bei der Zellteilung aktiv, und seine Effizienz kann je nach Zelltyp und -zustand sowie genomischem Locus und Reparaturvorlage stark variieren (Ran et al., 2013b). Bei gezielten Nuklease-induzierten DSBs beträgt die Häufigkeit von entstandenen Mutationen typischerweise mehr als 1 % und kann in einigen Fällen 50 % oder höher sein (Sander und Joung, 2014).

1.5.4.2 Anwendungen

Neben Bakterien wurden auch höhere Zellen bzw. Organismen mit dem CRISPR/Cas9-System modifiziert. Dazu zählen Hefen und Pflanzen wie Reis, Weizen, Hirse, Tabak und Arabidopsis. Aber auch in humanen Zellen, Mäusen, bzw. murinen Zellen, Ratten, Kaninchen, Fröschen, Zebrafischen, Fruchtfliegen, Seidenraupen und Fadenwürmern wurde das CRISPR/Cas-System bereits angewendet (Sander und Joung, 2014).

Nicht nur in der Wissenschaft, sondern auch in der Wirtschaft finden CRISPR/Cas-Systeme bereits Anwendung. So ist beispielsweise die Milchindustrie stark auf den Einsatz von mikrobiellen Starterkultursystemen angewiesen. Unter den domestizierten Bakterien, die in industriellen Anwendungen weit verbreitet sind, ist *S. thermophilus* besonders an der Versauerung der Milch und verschiedenen fermentierten Milchprodukten beteiligt. Der Ausfall von Bakterienkulturen durch Phageninfektionen stellt ein erhebliches Risiko bei der industriellen Nutzung von Bakterienkulturen dar. Daher besteht die Notwendigkeit die Kulturen für den Einsatz in der Industrie zu verbessern, wozu die Verwendung des CRISPR/Cas-Systems zum Einsatz kommt, um die Bakterien vor dem Angriff bestimmter Phagen zu schützen (Horvath et al., 2008; Horvath, Patent WO 2007/025097, 2019).

Auch in Bezug auf verschiedene Krankheitsbilder fand das CRSPR/Cas-System bereits Anwendung. So konnten z. B. Karimova et al. (2015) zeigen, dass eine Cas9-Nickase bestimmte Bereiche im Genom des Hepatitis B Virus (HBV) spezifisch und effektiv schneiden kann, wodurch das CRISPR/Cas9-Nickase-Systems für neuartige Therapiestrategien zur Heilung von HBV-Infektionen an Bedeutung gewinnt (Karimova et al., 2015).

Das humane immundefizient Virus 1 (HIV-1) kann durch das CRISPR/Cas-System dagegen in verschiedene Richtungen beeinflusst werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass viele der durch das CRISPR/Cas-System eingefügte Indels zwar tödlich für das Virus sind, aber dass andere zur Entstehung von replikationskompetenten Viren führen, die resistent gegen Cas9/sgRNA sind. Dadurch wird die Verwendung von Cas9/sgRNA in der HIV-1-Therapie möglicherweise eingeschränkt (Wang et al., 2016).

Bei der Sichelzellkrankheit handelt es sich um eine rezessive genetische Erkrankung, die durch einen einzelnen Nukleotidpolymorphismus im β -Globin-Gen verursacht wird und zur Ausbildung charakteristischer, sichelförmigen roter Blutkörperchen führt. 2016 haben DeWitt und Kollegen einen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes aus Cas9-Protein, sgRNA und einem einzelsträngigen DNA-Oligonukleotid-Donor hergestellt, um einen effizienten Austausch der krankheitsverursachenden Mutation mittels HDR zu erzielen. Korrigierte hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen von Patienten produzierten weniger Sichelhämoglobin-RNA und -Protein und erhöhten entsprechend das Wildtyp-Hämoglobin. Somit stellt auch bei dieser Erkrankung das CRISPR/Cas-System eine vielversprechende Therapieoption dar (DeWitt et al., 2016).

Aber nicht nur in humanen Zellen, auch in humanen Embryos wurde das CRISPR/Cas-

System bereits angewendet. Ma et al. beschrieben 2017 die Korrektur der heterozygoten MYBPC3-Mutation, die eine hypertrophe Kardiomyopathie in humanen Präimplantationsembryonen verursacht, mit präziser CRISPR-Cas9-basierter DNA-Reparaturreaktion. Die induzierten DSB am mutierten väterlichen Allel wurden mit dem homologen Wildtyp-Muttergen anstelle einer synthetischen DNA-Vorlage erfolgreich repariert. Die Effizienz, Genauigkeit und Sicherheit dieses Ansatzes zeigten, dass er das Potenzial hat, vererbbare Mutationen in menschlichen Embryonen zu korrigieren (Ma et al., 2017).

Daneben wird das CRISPR/Cas-System in vielen weiteren, verschiedenen Anwendungsgebieten eingesetzt (siehe 1.10).



Abbildung 1.10: Anwendungsgebiete der CRISPR/Cas-basierten Technologien über das *Genome-Editing* hinaus. Neben dem gezielten *Genome-Editing* durch die WT Cas9-Endonuklease, wird die Cas9 inzwischen vielseitig modifiziert und ermöglicht den Basenaustausch ohne DSB und Anwendungen in Bereichen des RNA-*Targeting*, der Genregulation, epigenetischen Modifizierungen, sowie Chromatin-*Imaging* und -Topologie (modifiziert nach Adli, 2018).

Im Gegensatz zu der Wildtyp Cas9-Endonuklease, die zu DSBs und zufälligen Indels in der Zielsequenz führt, sind diese *Genom-Editing*-Methoden der sogenannten zweiten Generation in der Lage eine einzelne Base präzise in eine andere umzuwandeln, ohne DNA-DSBs zu verursachen. Es wurde gezeigt, dass ein Fusionskomplex aus Nickase Cas9 (nCas9), der an ein APOBEC1-Deaminase-Enzym fusioniert ist, und Uracyl-Glykosylase-Inhibitor-Protein Cytosin effektiv in Thymin an der Zielstelle umwandelt, ohne DSB zu verursachen. Somit können beispielsweise vorzeitige Stoppcodons in Gene eingefügt werden. Auch für groß angelegte, funktionale Screenings auf RNA-Ebene können CRISPR/Cas-Systeme zum

Einsatz kommen. Bei solchen Anwendungen werden hundert bis tausende von individuellen sgRNAs eingesetzt um Gene zu identifizieren, die einen bestimmten Phänotyp beeinflussen. Des Weiteren begannen die Forscher inaktive (dead, d) dCas9 zu nutzen, um die Genexpression gezielt zu regulieren. Bei diesem CRISPR-Interferenz (CRISPRi)-Ansatz blockiert die gebundene dCas9 den Transkriptionsprozess, wodurch ein Gen-Knockdown erzielt wird. Im Gegensatz dazu kann die dCas9-Targeting-Plattform zur Rekrutierung starker transkriptioneller Aktivatoren eingesetzt werden, wodurch es zu einer starken Induktion der Genexpression kommt. Darüber hinaus nutzten die Forscher die Programmierbarkeit von dCas9, um verschiedene epigenetische Akteure an einen bestimmten Ort zu dirigieren. Auch in der Live-Cell-Chromatin-Bildgebung wurde die dCas9 Technologie bereits eingesetzt. Forscher verwendeten Fluoreszenz-markierte dCas9, um repetitive Regionen des Genoms zu erfassen. Dieser Ansatz ermöglicht insbesondere die Verfolgung nativer Chromatin-Loci während des Zellzyklus und die Bestimmung der differentiellen Positionierung von transkriptionell-aktiven und -inaktiven Regionen. Ein weiteres spannendes Gebiet der CRISPR-Anwendungen in der Chromatinbiologie ist das gezielte Verändern von Chromatinschleifenstrukturen. Die Manipulation endogener Chromatinstrukturen ermöglicht es, deren Funktion und ihren Beitrag zur Genexpression zu verstehen und birgt auch ein großes therapeutisches Potenzial (Adli, 2018).

2 Zielsetzung

Entamoeba histolytica ist ein protozoischer Parasit, der bei Menschen in ca. 10 % der Infektionen eine invasive Amöbiasis und in 1 % der Fälle eine extra-intestinale Manifestation wie z. B. einen Amöbenleberabszess (ALA) hervorruft. Trotz umfangreicher Forschung zur Identifizierung der für die Pathogenität von *E. histolytica* verantwortlichen Faktoren, konnte der grundlegende Mechanismus der Virulenzentstehung bislang noch nicht entschlüsselt werden. Somit bleibt der Grund für die klinische Manifestation einer Amöbiasis im humanen Wirt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zur Identifizierung und Charakterisierung putativer Pathogenitätsfaktoren werden häufig genetisch modifizierte Trophozoiten verwendet, so dass diese genetische Manipulation als Werkzeug in der Molekularbiologie unabdingbar ist. Das CRISPR/Cas-System wird bereits in multiplen Anwendungsbereichen eingesetzt und stellt eine vielversprechende Methode dar, um das Genom von *E. histolytica* zu modifizieren.

In dieser Arbeit sollte das CRISPR/Cas System in *E. histolytica* etabliert, bzw. die Eignung dieses Systems zum Einsatz in *E. histolytica* untersucht werden. Dabei sollten verschiedene Alternativen des CRISPR/Cas Systems auf ihre Anwendbarkeit in *E. histolytica* Trophozoiten getestet werden.

Mit Hilfe von Überexpressions- und Silencig-Transfektanten, die entweder über das bereits etablierte RNAi-basierte Verfahren gesilenct wurden, oder mittels neu etabliertem CRISPR/ Cas-System sollten darüber hinaus zwei putative Pathogenitätsfaktoren von *E. hstolytica* charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um eine Alkoholdehydrogeanse (ADH) und eine Metalloprotease (EhMP8-2). Die codierenden Gene wurden in vergleichenden Transkriptomstudien zwischen verschiedenen *E. histolytica* Klonen als differentiell exprimiert identifiziert. Diese untersuchten Klone unterscheiden sich grundlegend in ihrer Fähigkeit, ALAs im Tiermodell zu induzieren, obwohl sie denselben genetischen Hintergrund besitzen. In dem pathogenen Klon B2^p werden diese Gene auf niedrigerem Level transkribiert, als in den apathogenen Klonen A1^{np} bzw. B8^{np}.

Die Überexpression der beiden Gene im pathogenen Klon B2^p führte zu einer signifikanten Reduktion der ALA-Größe im Tiermodell, so dass die Proteine als putative Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden konnten (Meyer et al., 2016). Das RNAi-basierte Silencing dieser Gene in den apathogenen Klonen zeigte im Gegensatz dazu keine verstärkte Pathogenität im Tiermodell (Matthiesen et al., 2018).

Zur näheren Charakterisierung dieser beiden putativen Pathogenitätsfaktoren sollten die Transfektanten, in denen das jeweilige Gen überexprimiert oder gesilenct wurde, auf folgende Parameter hin untersucht werden:

- 1. Phänotypische Merkmale (Größe, Wachstumsrate, Beweglichkeit)
- 2. Virulenzfaktoren (Cysteinproteaseaktivität, Lyse und Phagozytose von Erythrozyten und THP1-Zellen)
- 3. Lokalisation des Proteins mit verschiedenen Antikörpern
- 4. Substratspezifität

Darüber hinaus sollten RNAi-basierte Silencing-Transfektanten generiert werden, in denen die Expression einer verwandten Metalloprotease (EhMP8-1) gesilenct wird. Ebenfalls sollten erstmals Doppelsilencer produziert werden, in denen beide Metalloproteasen gesilenct vorliegen. Mithilfe dieser Transfektanten sollte der Einfluss dieser Metalloprotease auf Parameter untersucht werden, welche von der verstärkten oder verminderten Expression des EhMP8-2-codierenden Gens affektiert wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Chemikalien anderer Hersteller sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Chemikalie	Hersteller	
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	biomol	
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Thermo Scientific	
Acrylamid (30 %)	PanReac AppliChem	
Agarose	Invitrogen	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	PanReac AppliChem	
Ascorbinsäure VWR	Chemicals	
Coomassie [®] Brilliant Blue R250	SERVA	
Diamond Vitamin Tween 80 Lösung	biozol	
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH	
Hefeextrakt	Becton und Dickison	
HEPES	biomol	
L-Cystein	US Biological Life Sciences	
L-Glutamin	Biochrom AG	
Paneticin G418	PAN BIO TECH	
Paraformaldehyd	Electron Microscopy Sciences	
Rinderserum	PAN BIO TECH	
TRIzol®	Ambion	
Trypticase	Becton und Dickison	
Z-Arg-Arg-pNA	BACHEM	

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Herstellern
3.1.2 Reaktionskits

Kit	Hersteller
5 PRIME TM RealMasterMix for SYBR TM Green Kit	Thermo Scientific
Alt-R [®] CRISPR-Cas9 System (crRNA, tracrRNA 5 ATTO	IDT
TM 550, Electroporation Enhancer, Sp. HiFi Cas9 Nuclease 3	
NLS, Buffer)	
dNTP Set (100 mM)	invitrogen
Guide-it ^{TM} sgRNA Clean-Up Kit	TAKARA
Guide-it ^{TM} sgRNA In Vitro Transcription Kit	TAKARA
Guide-it ^{TM} sgRNA Screening Kit	Takara
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
NucleoBond [®] Xtra Maxi Kit	Machery-Nagel
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean UP Kit	Machery-Nagel
$Oligo(dT)_{12-18}$ Primer	invitrogen
$\operatorname{Pierce}^{TM}$ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific
Plasmid DNA purification Kit	Machery-Nagel
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Red HS Master Mix	Biozym
RNeasy [®] -Mini-Kit	Qiagen
SuperScript ^{TM} III Reverse Transcriptase	invitrogen
T4-Ligase Kit	ThermoFisher Scientific
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	ThermoFisher
Medium-Binding 96-Well ELISA Mikrotiterplatte	Greiner bio-one
Multi-Adapter für S-Monovette®	Sarstedt
Mr. Frosty ^{TM} Freezing Container	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer (Tiefe $0,1 \text{ mm}, 0,0025 \text{ mm}^2$)	Marienfeld
Petrischale für Zellkultur	Sarstedt
S-Monovette [®]	Sarstedt
T175 Zellkulturflaschen, 175 $\rm cm^2$	Sarstedt
T75 Zellkulturflaschen, 75 $\rm cm^2$	Sarstedt
Venenpunktionsbesteck Venofix A 19G	B. Braun

Tabelle 3.2: Auflistung der verwendeten Reaktionskits mit Herstellern

3.1.3 Marker und Ladepuffer

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Marker und Ladepuffer mit Herstellern

Marker und Ladepuffer	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher Scientific
Loading Dye (6x)	ThermoFisher Scientific
PageRuler ^{TM} Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific

3.1.4 Enzyme und Enzyminhibitoren

Tabelle	3.4:	Auflistung	der	verwendeten	Enzyme	und	Enz	yminhibitoren	mit	Herstelle	rn
		0			•/						

Enzym/Enzyminhibitor	Hersteller
E64 (Proteaseinhibitor)	Sigma-Aldrich
$FastDigest^{(R)}$ Enzyme (EcoRI, EcoRV, BamHI, KpnI, NdeI)	Thermo Scientific
GoTaq [®] G2 Flexi DNA Polymerase	Promega
High-Fidelity Restriktionsenzym SphI	NEB
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
RNase-Free DNase Set	Qiagen
$RNaseOUT^{TM}$ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	invitrogen
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	NEB

3.1.5 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 3.5: Auflistung der verwendeten Antikörper mit Herstellern

Antikörper	Verwendung	Hersteller
anti Mouse ALEXA Fluor [®] 488	IFA (2. AK)	Invitrogen
anti Mouse IgG ALEXA Fluor [®] 594	IFA (2. AK)	Life Technologies
Guide- it^{TM} Cas9 Polyclonal Antibody	WB (1. AK)	TAKARA
Monoclonal anti-c-Myc	IFA (1. AK)	Sigma
Monoclonal anti-FLAG [®] M2 antibody	WB (1. AK)	Sigma
produced in mouse		
Polyclonal Rabbit anti-Mouse IgG-HRP	WB (2. AK)	DAKO
α ADH Immunserum und Präimmunserum	WB/IFA (1.AK)	BNITM, Abteilung Moleku-
(polyklonal, Balb/c Mäuse)		lare Parasitologie (Disserta-
		tion Meyer, 2016)

Tabelle 3.6:	Auflistung	der	verwendeten	${\it Farbstoffe}$	mit	Herstellern
--------------	------------	----------------------	-------------	--------------------	----------------------	-------------

Farbstoff	Verwendung	Hersteller
CellTracker ^{TM} Green CMFDA	Anfärben von Zytoplama	invitrogen
$CellTracker^{TM} Red CMTPX$	Anfärben von Zytoplama	invitrogen
Hoechst-Farbstoff	Anfärben von DNA (Zellkern)	ThermoFisher Scientific

3.1.6 Plasmide

Bezeichnung	Größe	Verwendung	Referenz
pNC	ca. 6 kb	Überexpression in <i>E. histolytica</i>	Hamann et al., 1995
pNSi A	ca. 6 kb	Silencing in <i>E. hisolytica</i> Zelllinie A	Irmer et al. (2009) und
pNSi B	ca. 6 kb	Silencing in <i>E. hisolytica</i> Zelllinie B	Matthiesen et al. (2018)
pX330-U6- Chimeric_BB- CBh-hSpCas9	ca. 4,3 kb	Amplifikation der <i>cas9</i>	$\begin{array}{c} \text{Addgene plasmid} \\ \# \ 42230 \end{array}$

 Tabelle 3.7: Auflistung der verwendeten Plasmide

3.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 3.8: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation des Gens

Name	5´ -> 3 ´ Sequenz
Cas9 F	GAGAGGTACCCGGGATCCATGGACTATAAGGACCACGAC
Cas9 R	GAGAGAGATCTTTACTTTTTTTTTTTTTGCCTGGCC
074180 F	ATGTTCACTTTCATTTTGATG
074180 R	TTGCAACTCGATTATAACTC
042870 F	GCCTCAACCAGAGCATTTC
042870 R	ACACCTCCTTACACCAGTCC
MP8-1 F	GAGAGGTACCATGTTGATTGTATTACTACTC
MP8-1 R (270bp)	GAGAGGATCCTCTTATAATATATGCCTTTTTC

Tabelle 3.9: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die qPCR

Name	5´-> 3´ Sequenz
Cas9 F mRNA	AAAACCCCATCAACGCCAG
Cas9 R mRNA	GCGATCAGATTTTCCAGCC
Cas9 ^{co} F mRNA	TGGCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAG
Cas9 ^{co} R mRNA	TTCATCTGTAATAACTGCCCATC
042870 F mRNA	ATTGCTGTCATTCCTGTGTG
042870 R mRNA	TCACGAACTTCTTCTGCTTG
MP8-1 F mRNA	CAATGCCCATACTGTCCTTC
MP8-1 R mRNA	CTGTCTCTGTTCCTCTTCCT
088020 F mRNA	TGGAGTTGAACAATGTTGG
088020 R mRNA	TTGTGGAACCTCATAACACC
192470 F mRNA	ATTAGCAATGGCTATGCCTG
192470 R mRNA	ATAGCGTCTTCTGGTTGTGC
198760 F mRNA	GCTGCAACAGTAGCATTGAA
198760 R mRNA	GTTTCTCCATGTGCAAGTCC
125952 F mRNA	TGCAGCAACATATGCATTAAA
125952 R mRNA	CACCTGGACATGTCATAGCA
EhAct F mRNA	AAGCTGCATCAAGCAGTGAA
EhAct R mRNA	GGAATGATGGTTGGAAGAGG

Name	$5^{\prime} -> 3^{\prime}$ Sequenz	Verwendungszweck
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung aus
M13R	ACACAGGAAACAGCTATGACCATG	TOPO
S-Neo	GAATTAGTCTCAACTCAACAATGTTTGTTGG	Sequenzierung aus pNC
Sequenz.		
Pr.		
074180	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAAACGAAGT	Herstellung sgRNA vor-
sgRNA1	GGTGAAGAAAAGTTTAAGAGCTATGC	derer Schnitt
074180	CCTCTAATACGACTCACTATAGGATCGATTGC	Herstellung sgRNA mitt-
sgRNA2	AGCACTTGAGTTTAAGAGCTATGC	lerer Schnitt
042870	CCTCTAATACGACTCACTATAGGAACGTTTTA	Herstellung sgRNA vor-
sgRNA1	GAGATCAGGTGTTTAAGAGCTATGC	derer Schnitt
042870	CCTCTAATACGACTCACTATAGGCTCGAGCAA	Herstellung sgRNA mitt-
sgRNA2	GAAAGCATTTGTTTAAGAGCTATGC	lerer Schnitt
crRNA	AAACGAAGTGGTGAA	Toil dos RNP Komployes
074180 1		Ten des Kivr-Komplexes
crRNA	GGATCGATTGCAGCA	
$074180 \ 2$		

Tabelle 3.10: Auflistung der sonstigen verwendeten Oligonukleotide

3.1.8 Puffer und Lösungen

NaPBS (1x):

6,7 mM Na₂HPO₄, 3,3 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,2

Cytomix (Transfektion):

120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 25 mM HE-PES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM K_2 HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,6 (KOH) kurz vor Gebrauch: 4 mM ATM, 10 mM Glutathion hinzugeben

TFB1 (für kompetente E.coli):

30 mM Kaliumacetat, 50 mM $MnCl_2$, 0,1 M RbCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 (Essigsäure)

TFB2 (für kompetente E.coli):

10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 7,0 (NaOH)

Trenngelpuffer für PAGE:

1,5 M Trisbase, 0,4 % SDS, pH 8,8, steril

Sarah Corinna Lender

Sammelgelpuffer für PAGE:

500 mM Trisbase, 0,4 % SDS, pH 6,8, steril

Elektrophoresepuffer (1x) für PAGE:

25 mM Trisbase, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

Proteinprobenpuffer (2x)

(Laemmli et al. 1970):

125 mM TrisHCl, 20 % Glycerin, 2 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, pH 6,8, vor Gebrauch 10 mM DTT hinzugeben

Coomassie-Färbelösung:

50 % Methanol, 10 % Eisessig, 40 % dH₂O, 0,05 % Coomassie[®] Brilliant Blue R250

Coomassie-Entfärberlösung:

 $\overline{45 \text{ \% Methanol, } 10 \text{ \% Eisessig}}, 45 \text{ \% } dH_2O$

Transferpuffer für WB (1x): 1,92 M Glycin, 250 mM Tris-HCl, 12,8 mM SDS

Arbeitslösung Transferpuffer für WB:

20 % Methanol, 10 % 10x Transferpuffer, 70 % dH₂O

TBS (1x):

10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0

Blockierlösung für WB:

5 % Milchpulver in TBS

Lösung A (ECL-Nachweis):

0,1 M Tris-HCl (pH6,8), 0,025 % Luminol, Lagerung bei 4°C

Lösung B (ECL-Nachweis): Lagerung bei RT, dunkel

Lösung C (ECL-Nachweis): H_2O_2 (30 %), Lagerung bei 4°C

Arbeitslösung ECL-Nachweis:

Lösung A (5 mL), Lösung B (500 µL), Lösung C $(1,5 \mu L)$

Permeabilisierungspuffer für IFA: NaPBS, 0.05 % Saponin

Blockpuffer für IFA (Aldehydgruppen): NaPBS, 50 mM Ammoniumchlorid

Blockpuffer für IFA (unspezifische AK-**Bindungsstellen**): NaPBS, 2 % FCS

CP-Assay Puffer:

 $\overline{0,1 \text{ M KH}_2\text{HPO}_4}$, 2 mM EDTA, pH 7, kurz vor Gebrauch 1 mM DTT hinzugeben

Inkubationspuffer (Substratgel): 100 mM Natriumacetat, 1 % Tritin X-100, 20 mM DTT

DMSO, 6,7 mM Para-Hydroxycoumarinsäure, Methylenblau-Färbelösung nach Löffler: 30 mL 17 % Methylenblau in 95 % EtOH + 100 mL H₂O + 1 mL 1 % KOH

> 50x TAE 5 mM Natriumacetat, 40 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, pH 7,9 (Essigsäure)

3.1.9 Medien und Zusätze

RPMI-Medium für humane Zellen (THP1 RPMI⁺):

88 % RPMI-1640 mit 25 mM HEPES, 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

TY-I-S-33-Medium (TY-Medium)(Diamond et al., 1978)

Inkomplett: 100 g Trypticase, 50 g Hefeextrakt, 50 g Glucose, 10 g NaCl, 3,8 g K₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 5 g L-Cystein, 1 g Ascorbinsäure, 114 mg Fe-Ammoniumcitrat, mit dH₂O auf 4350 mL auffüllen, pH 6,8 mit NaOH einstellen, autoklavieren; 400 mL inkomplettes TY-Medium zum Komplettieren (komplettes TY-Medium) mit 50 mL inaktiviertem Rinderserum (2x 30 min bei 56 °C), 15 mL Vitamin-Mix Diamond Vitamin Tween 80, 60 mg Streptomycin und 50 mg Penicillin versetzen.

Nachfolgend wird das Medium als TY-Medium bezeichnet.

3.1.10 Verwendete Zellen

3.1.10.1 Entamoeba histolytica

In dieser Arbeit wurden verschiedene *E. histolytica*-Klone verwendet, die im Abschnitt 1.2 näher beschrieben wurden.

3.1.10.2 Erythrozyten

Bei den verwendeten Erythrozyten handelte es sich um Spenderblut von der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf der Blutgruppe 0+.

3.1.10.3 Escherichia coli

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Zellen haben ihren Ursprung in den *One* $Shot^{TM}$ *TOP10 Chemically Competent E. coli* Zellen von invitrogen. Diese wurden jedoch nur als Inokulum verwendet um selbst kompetente TOP10-Zellen herzustellen (siehe 3.2.6).

3.1.10.4 THP1-Zelllinie

Die verwendete, humane Monozyten-Zelllinie THP1 (ATCC Katalognummer TIB-202) stammt ursprünglich aus einem Patientenisolat mit akuter Monozytenleukämie.

3.1.11 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 3.11 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet. Verbrauchsmaterialien des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgeführt.

Chemikalie	Hersteller
Anaerocult [®] A	Merck Millipore
$Anaerotest^{(R)}$	Merck Millipore
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Zellsieb, 100 µm, Nylon	Falcon
Gene Pulser Küvetten (0,4 cm)	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer (Tiefe $0,1 \text{ mm}, 0,0025 \text{ mm}^2$)	Marienfeld
Strip Tubes 0,1 mL (Rotor Gene)	LTF-Labortechnik
TC-Platte 24-Well Suspension	Sarstedt
TC-Platte 96-Well Standard	Sarstedt
T175 Zellkulturflaschen, 175 cm^2	Sarstedt
Zellkulturflaschen 25 mL, 50 mL, 250 mL	Falcon

Tabelle 3.11: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern

3.1.12 Geräte und Software

In den Tabellen 3.12 und 3.13 sind die verwendeten Geräte und Software aufgelistet. Geräte und Software des normalen Laborbedarfs werden nicht separat aufgelistet.

Gerät	Modell	Hersteller
Elektroporationsgerät	Gene-Pulser $\mathbf{X}\mathbf{Cell}^{TM}$	Bio-Rad
ELISA-Reader	MRX®	DYNEX Magellan
FACSAria II		BD Biosciences
Geldoc	ChemiDoc ^{TM} XRS+	Bio-Rad
Lichttisch		Rex Messinstrumentebau
Fluoreszenzmikroskop	Evos FL Auto	ThermoFisher Scientific
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager M2	Zeiss
Konfokales Mikroskop	IX 81	Olympus
NanoDrop	Nano $\operatorname{Drop}^{TM} 2000$	ThermoFisher Scientific
PCR-Maschine	Primus	MWG-Biotech
qPCR-Maschine	Rotor-Gene 3000	Corbett Research
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
UV-Tisch		intas

Tabelle 3.12: Auflistung der verwendeten Geräte mit Herstellern

Tubene 9.19. Humbung der verwendeten Soloware mit Herstenen			
Software	Hersteller		
Axio vision Rel. 4.8	Zeiss		
Evos FL Auto Software	ThermoFisher Scientific		
$\operatorname{FACSDiva}^{TM}$	BD Biosciences		
FlowJo 10.6	Treestar		
Image Lab^{TM}	Bio-Rad		
ImageJ	Java		
Fluoview	Olympus		
MacVector [®] 14.5.3	MacVector, Inc.		
NanoDrop ^{TM} 2000 Operating Software	ThermoFisher Scientific		
Prism Version 6	Graphpad		
Revelation ^{TM} Version G 3.2	DYNEX Magellan Biosciences		
Rotor-Gene real time Analysis 6.0	Corbett Life Science		

Tabelle 3.13: Auflistung der verwendeten Software mit Herstellern

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von E. histolytica

Die Kultivierung der *E. histolytica* Trophozoiten erfolgte unter mikroaerophilen, axenischen Bedingungen in 75 bzw. 250 mL komplettiertem TY-I-SS Medium (Diamond et al., 1978) bei 37°C. Alle 2-3 Tage wurden die adhärent wachsenden Zellen passagiert. Dafür wurde die Konfluenz des Zellrasens mittels Durchlichtmikroskop beurteilt, die Trophozoiten durch Schütteln der Zellkulturflasche abgelöst und eine angemessene Zellzahl (1 %-10 %) in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

Zu transfizierten Amöben (siehe 3.2.4), welche ein Plasmid mit einem Resistenzgen gegen Neomycin enthielten, wurden 10-75 µg/mL des Neomycin-Analogons G418 als Selektionsdruck hinzugegeben. G418 wird auch als Geneticin bzw. Paneticin bezeichnet und blockiert die Polypeptidsynthese in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. Die verbliebenen Zellen wurden am Ende verworfen.

3.2.2 Zellernte von E. histolytica Trophozoiten

Um die Trophozoiten von *E. histolytica* für die Versuche nutzen zu können, wurden diese 24 Stunden (h) vorher in Zellkulturflaschen so eingesät, dass sie am folgenden Tag einen einschichtigen Zellrasen bildeten. Die adhärenten Zellen wurden geerntet, indem das Kulturmedium abgenommen, und die Trophozoiten in 10 mL kaltem NaPBS durch kräftiges Schütteln der Zellkulturflasche abgelöst wurden. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g, 4°C, 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit 10 mL NaPBS gewaschen und in weiteren Analysen eingesetzt.

Für die Isolierung der RNA (siehe 3.5.1.4) wurde das Zellsediment in 1 mL NaPBS aufgenommen, in ein 1,5 mL RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt der Überstand sauber abgenommen.

3.2.3 Herstellung von Zelllysat aus E. histolytica Trophozoiten

Zur Herstellung von Amöbenlysaten wurden die geernteten Trophozoiten (siehe 3.2.2) zunächst im Rückfluss resuspendiert und nach der *freeze and thaw*-Methode aufgeschlossen. Dafür wurde zu den Zellen, abhängig von der Fragestellung, 30 µM des Proteaseinhibitors E64 gegeben, oder ohne Proteaseinhibitor gearbeitet, und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und kräftig gevortext. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt und nach dem letzten Auftauen ggf. erneut 30 µM E64 hinzu gegeben. War eine Trennung in lösliche Fraktion und unlösliche Fraktion notwendig, wurde das Lysat 15 min bei 18300 x *g* und 4°C zentrifugiert und der Überstand, welcher die lösliche Proteinfraktion enthielt, abgenommen. Das Sediment wurde daraufhin zweimal mit NaPBS gewaschen und in 50 μ L NaPBS + 1 % Triton X-100 resuspendiert. Nach einem weiteren 15 minütigen Zentrifugationsschritt wurde der Überstand, welcher die Membranproteine enthielt, als unlösliche Fraktion abgenommen. Die Lysate wurden bis zum Einsatz im anschließenden Versuch bei -80°C gelagert.

3.2.4 Transfektion von E. histolytica Trophozoiten

Mit Hilfe einer Transfektion kann Fremd-DNA in Organismen eingebracht werden, welche dann als Transfektanten bezeichnet werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Elektroporation angewendet, wofür je 100 µg DNA (aus Maxi-Prep siehe 3.5.1.2) in 100 µL H₂O in einer Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 0,4 cm vorgelegt wurden. Diese wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die zu transfizierenden Amöben wurden am Vortag so angesetzt, dass sie einen einschichtigen Zellrasen bildeten und, wie in 3.2.2 beschrieben, geerntet. Das erhaltene Sediment wurde anschließend mit kaltem, inkomplettem Cytomix gewaschen und die Zellen danach in 2 mL komplettem Cytomix (Zugabe von 20 mg ATP und 24 mg Glutathion auf 8 mL) resuspendiert. 800 µL dieser Zellen wurden zur vorgelegten DNA in die Elektroporationsküvette gegeben und gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene-Pulser XCell bei einer Spannung von 1200 V, mit einer Kapazität von 25 µF und einem unendlichen Widerstand durch zwei Spannungsimpulse. Nachfolgend wurde der Elektroporationsansatz in eine mit vorgewärmtem TY-Medium befüllte Zellkulturflasche gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Um das Ablesen des transfizierten Plasmids zu erzwingen, auf dem ein Resistenzgen gegen Neomycin enthalten ist, wurde dem Medium 10 mg/mL Selektionsdruck (G418) hinzugegeben. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurde die G418-Konzentration auf 20 bis 75 µg/mL erhöht.

Als Kontrolle dienten so genannte Mock-transfizierte Trophozoiten, welche das Expressionsplasmid (pNC) mit einem Gen in 3´ -> 5´ Orientierung enthalten, so dass es sich um ein *nonsens*-Gen handelt.

Trophozoiten, die mit einem Überexpressionsplasmid (siehe 3.7) transfiziert wurden, werden im Folgenden als "Überexprimierer" bezeichnet. Wurden die Amöben jedoch mit dem Silencing-Plasmid (siehe 3.7) transfiziert um die Expression eines bestimmten Gens zu inhibieren (silencen), werden die Transfektanten künftig unter dem Begriff "Silencing"-Transfektanten, bzw. "Silencer" geführt.

Nachdem bei Silencern das Silencing mittels qPCR (siehe 3.5.4.3) bestätigt wurde, wurden die Transfektanten über mehrere Monate ohne Selektionsdruck kultiviert, damit diese das Silencing-Plasmid verlieren. Dadurch wird eine erneute Transfektion, mit einem anderen

Silencing-Konstrukt ermöglicht, wodurch Doppelsilencer generiert werden können.

3.2.5 Klonierung von E. histolytica Trophozoiten

Um eine genetisch homogene Kultur von *E. histolytica* Trophozoiten zu generieren, welche von einer einzigen Zelle abstammt, wurden die Amöben kloniert. Dafür wurden die Zellen gezählt (siehe 3.2.9) und auf eine Konzentration von 1 Zelle/750 µL TY-Medium eingestellt. Davon wurden je 200 µL pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert, so dass in jedem 3.-4. Well eine einzelne Zelle vorliegt. Die Platte wurde für 5-8 Tage im Anaerobiertopf bei 37°C kultiviert. Das anaerobe Milieu wurde durch ein Anaerocult erzeugt und mit einem Anaerotest überprüft. Anschließend wurde das Medium in den bewachsenen Wells abgenommen und die Zellen mit kaltem TY-Medium und unter kräftigem Spülen abgelöst und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.6 Herstellung kompetenter E. coli Zellen

Um Plasmide in *E. coli* Zellen einschleusen zu können, müssen diese zunächst Kompetenz erlangen. Dafür werden die Zellen mit CaCl₂ behandelt, wodurch die Zellmembran durchlässig für Plasmide während einer Hitzeschock-Transformation wird (siehe 3.2.7). Für die Herstellung dieser kompetenten Zellen wurden 200 mL LB-Medium mit 10 mL einer Übernacht (ÜN)-Kultur von TOP10-Zellen angeimpft und bei 37°C aerob unter Schütteln bis zu einer OD_{600nm} von 0,45-0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt und in vorgekühlte 50 mL Reaktionsgefäße überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4°C und 2400 x *g* wurde jedes Sediment in 15 mL TFBI-Puffer (enthält 10 mM CaCl₂) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen erneut sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente in je 2 mL TFBII-Puffer (enthält 75 mM CaCl₂) resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden je 100 μ L Aliquots angefertigt und bei -80°C gelagert.

3.2.7 Hitzeschock-Transformation kompetenter E. coli Zellen

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von DNA in kompetente Bakterien (siehe 3.2.6), welche nach der Methode von Cohen und Mitarbeitern (Cohen et al., 1972) erfolgte. Für die Hitzeschock-Transformation wurden 2 μ L des Ligationsansatzes (siehe 3.5.2.5) zu 100 μ L kompetenten TOP10-Zellen pipettiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 sek und eine 10-minütige Inkubation auf Eis.

Nach Zugabe von 500 µL vorgewärmtem LB-Medium wurde der Ansatz für 45 min bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert und anschließend auf vorgewärmte LB-Platten, ggf. mit 20 mg/mL Spectinomycin oder 100 µg/mL Ampicillin ausplattiert.

Bei Ligationen in den TOPO-Vektor wurden vor dem Ausplattieren 40 μ L 2 % X-Gal (w/v) zu der Bakteriensuspension gegeben, was eine Blau-Weiß-Selektion ermöglichte. Dabei wird das, auf dem TOPO-Vektor in der *multiple-cloning-site* liegende, lacZ'-Gen für die beta-Galactosidase inaktiv, so dass die Bakterien das Substrat X-Gal nicht umsetzen können und die Kolonie weiß bleibt. Bei blauen Kolonien konnte das Substrat zu einem Indigofarbstoff umgesetzt werden, so dass diese Bakterien den leeren Vektor ohne Insert enthalten. Die Inkubation der Agar-Platte erfolgte bei 37°C über Nacht oder bei RT über 3 Tage.

3.2.8 Kultivierung von THP1-Zellen

Die humane Monozyten-Zelllinie THP1 (siehe 3.1.10.4) wurde bei 37°C und 5 % CO₂ in RPMI⁺ Medium kultiviert, und alle 3-4 Tage passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst bei 300 x g, 4°C, 8 min zentrifugiert und das Sediment in 1-5 mL Medium resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.9) und die gewünschte Anzahl an Zellen anschließend in eine neue, mit vorgewärmtem Medium befüllte, 75 mL- bzw. 175 mL Zellkulturflasche mit Belüftungskappe überführt.

3.2.9 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung von Zellzahlen wurden je 10 µL der zu ermittelnden Zellsuspension in die Neubauer Zählkammer pipettiert und im Durchlichtmikroskop vier Großquadraten ausgezählt. Die vorhandene Zellzahl pro mL wird mit folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Gesamtzellzahl in ausgezählten Großquadraten}}{\text{Anzahl ausgezählte Großquadrate}} \text{x Verdünnungsfaktor x 10}^{4}$$
(3.1)

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten der *E. histolytica* Trophozoiten (siehe 3.3.1) wurden Lysate mit dem Zusatz des Cysteinproteaseinhibitors E64 verwendet,

damit diese nicht die zelleigenen Proteine verdauen. Es wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce nach Herstellerangaben verwendet. Die Durchführung des Tests erfolgte in einer 96-Well-Platte und die Messung wurde am ELISA Reader bei 562 nm durchgeführt, wobei die Proteinkonzentration der Proben durch einen Vergleich mit dem Standardprotein Rinderserumalbumin (*bovines Serumalbumin*, BSA) bestimmt wurde.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Um Proteine nach ihrer molekularen Masse aufzutrennen, wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt, mit zweifach Proteinprobenpuffer mit 1 mM DTT versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und linearisieren.

Je nach Fragestellung wurde ein höher (13 %) oder niedriger (8 %) prozentiges Gel gegossen (siehe 3.14) und die Proben, sowie ein Proteingrößenmarker (siehe 3.3) aufgetragen. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Stromstärke von 40 mA/Gel angelegt und das Gel im Anschluss entweder zur Analyse aller Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 3.3.3) oder die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um nachfolgend einen Immunonachweis einzelner Proteine durchzuführen (siehe 3.3.4).

	Trenngel		Sammelgel
	8 %	13 %	
Acrylamid 30 %	2 mL	3,25 mL	$0,65~\mathrm{mL}$
Puffer	1,88 mL	1,88 mL	1,25 mL
H ₂ O	3,6 mL	2,34 mL	3,05 mL
APS 25 %	25 μL	25 µL	25 μL
TEMED	50 μL	50 μL	50 µL

Tabelle 3.14: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

3.3.3 Coomasiefärbung

Um Proteinbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.3.2) in einem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel schüttelnd ca. 1-12 h in einer Coomassie-Blau-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel solange in Entfärberlösung geschwenkt, bis deutliche Proteinbanden erkennbar waren.

3.3.4 Westernblot

Bei der Methode des Westernblots können die Proteine, welche in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden (siehe 3.3.2), durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Dadurch wird der Immunonachweis einzelner Proteine ermöglicht, um z. B. bestimmte Proteine innerhalb eines Proteingemisches nachzuweisen. Der hier verwendete Elektrotransfer fand in einer Blotkammer in Transferpuffer unter Rühren statt, wobei für 1 h eine Stromstärke von 400 mA angelegt wurde. Anschließend wurde die Membran für 30 min bei RT in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Daraufhin wurde die Membran bei 4°C über Nacht auf einem Rollinkubator in Blockierlösung inkubiert, in welcher der spezifische, primäre Antikörper entsprechend verdünnt wurde. Dieser bindet direkt und spezifisch an das jeweilige Zielprotein. Am Folgetag wurde die Membran drei 10-minütigen Waschschritten mit TBS/0,05 % Tween 20 (TBS-T) unterzogen, wodurch die ungebundenen Antikörper entfernt wurden. Die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper, entsprechend verdünnt in Blockierlösung, erfolgte für 2 h bei RT auf dem Schüttler. Dabei bindet der Zweitantikörper an den Erstantikörper und ermöglicht dadurch den später sichtbaren Substratumsatz. Dieser Inkubation folgten zunächst zwei Waschschritte der Membran mit TBS-T und im Anschluss ein weiterer für 15 min mit TBS. Für die Entwicklung des Westernblots wurde die Membran für 2 min in der ECL-Arbeitslösung inkubiert, welche die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert. In Folge dessen kommt es an der Position der Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran zu einer Emission von Licht, welche mit Hilfe des bildgebenden Systems ChemiDoc (BioRad) detektiert und ausgewertet wurde.

3.3.5 Immunfluoreszenzanalyse von E. histolytica Trophozoiten

3.3.5.1 Färbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse (IFA) können Proteine einer Zelle durch fluoreszenzmarkierte Antikörper spezifisch angefärbt und lokalisiert werden. Dafür wurden die Trophozoiten geerntet (siehe 3.2.2), 30 min bei RT auf dem Rollinkubator in 1 mL 3 % PFA-NaPBS fixiert und daraufhin bei 400 x g 3 min zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend auf zwei Fraktionen aufgeteilt: Mit Saponin um eine Färbung von zytosolischen Proteinen zu ermöglichen und ohne Saponin um Proteine auf der Zelloberfläche zu lokalisieren. Je Fraktion wurde das Sediment in 500 µL Saponin (0,05 % in NaPBS) oder in NaPBS ohne Saponin gelöst, 5 min bei RT inkubiert und zentrifugiert. Nach 15-minütiger Inkubation beider Fraktionen bei RT in 500 µL Blockpuffer (enthält 50 mM Ammoniumchlorid) um freie Aldehydgruppen zu blockieren erfolgten drei Waschschritte mit 0,05 % Saponin in NaPBS bzw. NaPBS. Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren wurden beide Fraktionen 10 min bei RT auf dem Rollinkubator in 500 μ L 2 % FCS-Lösung in NaPBS (mit und ohne Saponin) inkubiert und gewaschen (s.o.). Anschließend wurden die Trophozoiten 30-60 min bei RT auf dem Rollinkubator mit den primären Antikörpern (1:200 verdünntes Immunserum bzw. Präimmunserum als Negativkontrolle, oder anti-Myc 1:200) inkubiert und gewaschen (s.o.). Die Inkubation mit dem sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörper (anti-mouse Alexa Fluor 594 bzw. anti-mouse Alexa Fluor 488 je 1:400) erfolgte für 1 h bei RT auf dem Rollinkubator. Nachdem die Zellen erneut 3x gewaschen wurden (s.o.), fand die Färbung der Zellkerne mit 1:100-1:400 verdünntem Hoechst-Farbstoff für 10-60 min bei RT statt. Anschließend wurden sie abermals 1x gewaschen. Zur Analyse am Mikroskop wurden die Zellsedimente in 50-150 μ L NaPBS aufgenommen und davon je 5-10 μ L auf den Objektträger aufgetragen.

3.3.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Lokalisationsbestimmung der Proteine von Interesse in den Trophozoiten wurden diese einer Färbung unterzogen (siehe 3.3.5.1) und am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 der Firma Zeiss analysiert. Die Kanäle wurden einzeln aufgenommen und mit Hilfe des Programms ImageJ übereinander gelegt (Merge). Die Aufnahmen an diesem Mikroskop wurden mit einer 63- und/oder 100-fachen Vergrößerung in folgenden Kanälen angefertigt. DIC = Durchlicht (Generelle Morphologie des Trophozoiten) Hoechst = Blaufärbung der DNA (Nuclei) GFP (Alexa Fluor 488) = grüne Färbung der Proteine von Interesse RFP (Alexa Fluor 594) = rote Färbung der Proteine von Interesse

3.3.5.3 Konfokale Laser-Mikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie ermöglicht eine dreidimensionale Erfassung eines Objektes, indem dieses in eine bestimmte Anzahl an visuellen, horizontalen Schnitten (*Slices*) unterteilt wird. Ein fokussierter Laserstrahl regt den Fluoreszenz-markierten Antikörper oder Farbstoff von Interesse an, während er das Präparat Schnitt für Schnitt abrastert. Durch die Überlagerung der einzelnen Schnitte der z-Ebene (Z-Stack) entsteht ein dreidimensionales Verteilungsmuster, da nun nicht mehr nur eine flächige (horizontale) Verteilung von Zielstrukturen detektierbar ist, sondern zusätzlich eine vertikale (z-Ebene). Die Untersuchung erfolgte am Mikroskop IX 81 der Firma Olympus in der 63- bzw. 100-fachen Vergrößerung mit den gleichen Kanälen wie bei der Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.3.5.2). Die Immunfluorszenzanalysen wurden von Dirk Lercher und Tina Wallaschkowski im Rahmen ihrer Masterarbeiten und in Kooperation mit der AG Spielmann durchgeführt.

3.4 Methoden zur Charakterisierung phänotypischer und zellulärer Funktionen von *E. histolytica* Trophozoiten

3.4.1 Größenbestimmung von E. histolytica Trophozoiten

Zur Bestimmung der Größe von *E. histolytica* Trophozoiten wurden 1 x 10⁴ Zellen in 25 mL Zellkulturflaschen eingesät und 48 h kultiviert. Nach Abschluss des Wachstumszeitraums wurden von jeder Zellkulturflasche vier Bilder am Mikroskop aufgenommen. Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden je zehn randomisiert ausgewählte Trophozoiten pro Bild umrandet und deren Fläche bestimmt.

3.4.2 Bestimmung der Teilungsrate von E. histolytica Trophozoiten

Um die Wachstumsgeschwindigkeit der *E. histolytica* Trophozoiten beurteilen zu können, wurde ihre jeweilige Teilungsrate bestimmt. Dafür wurden 1 x 10⁴ Zellen in 25 mL Zellkulturflaschen eingesät und für 48 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die adhärenten Zellen in 2 mL Medium abgeschüttelt. Die enthaltenen Trophozoiten wurden mit einer Neubauer Zahlkammer gezählt (siehe 3.2.9) und die Teilungsrate mit folgender Formel berechnet:

$$Teilungsrate = \frac{\lg (N/N_0)}{\lg 2 x (t - t_0)}$$
(3.2)

N = Gezählte Zellzahl $N_0 = Ausgangszellzahl (1 x 10⁴)$ t = Zeit am Ende $t_0 = Zeit am Anfang$

Die Anzahl der Teilungen pro 24 h wurde wie folgt berechnet:

Teilungen pro 24 h =
$$\frac{1}{\text{Teilungsrate}}$$
x 24 h (3.3)

3.4.3 Bestimmung der Aktivität von Cysteinproteasen in *E. histolytica* Trophozoiten

3.4.3.1 Cysteinprotease-Assay

Zur Quantifizierung der Proteolyse durch Amöbenlysate (siehe 3.2.3) wurde ein Cysteinprotease-Assay durchgeführt. Dieser basiert auf dem Umsatz des Substrates Z-Arg-ArgpNA (Benzyloxycarbomyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid). Durch die Abspaltung des p-Nitroanilins nimmt der Reaktionsansatz eine gelbliche Färbung an, welche bei 405 nm am ELISA-*Reader* gemessen wird. Für den Versuch wurden zunächst in einer 96-Well Platte 148 μ L Cysteinproteasepuffer (Zugabe von 1 mM DTT kurz vor Gebrauch) vorgelegt und 2 μ L Amöbenlysat (unverdünnt, 1:5 oder 1:10 verdünnt) hinzu gegeben. Durch Zugabe von 50 μ L Substrat (Endkonzentration 100 μ M) wurde die Reaktion gestartet und die Änderung der Extinktion in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 20 min gemessen. Die Volumenaktivität wurde mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

$$Volumenaktivität = \frac{\Delta E \times V_{Messlösung} \times 1000}{t \times \epsilon \times d \times V_{Probe}}$$
(3.4)

 $\Delta E = \text{Anderung der Extinktion}$ d = Schichtdicke der Messlösung (1 cm) $V_{\text{Messlösung}} = \text{Volumen der Messlösung (mL)}$ $V_{\text{Probe}} = \text{Volumen der eingesetzten Probe (mL)}$ t = Zeit (min) $\epsilon_{405\text{nm}} = 8,8 \text{ cm}^2 \text{ x } \mu \text{mol}^{-1}$

Um die spezifische Aktivität der Cysteinproteasen zu berechnen, wurde die Volumenaktivität in Relation zum Proteingehalt (siehe 3.3.1) gesetzt:

Spezifische Aktivität =
$$\frac{\text{Volumenaktivität}}{\text{Proteingehalt}}$$
 (3.5)

3.4.3.2 Substratgelelektrophorese

Zum Nachweis der Aktivität verschiedener Cysteinproteasen in *E. histolytica* Zelllysaten (siehe 3.2.3) wurde eine Substratgelelektrophorese unter reduzierenden, aber nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden 12 % ige SDS-Polyacrylamidgele mit

0,1 % Gelatine kolopymerisiert. Pro Tasche wurden 4-15 µg Lysat, versetzt mit Probenpuffer (enthält 10 mM DTT), aufgetragen und das Gel bei 25 mA bei 4°C mit vorgekühltem Elektrophorese-Puffer laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel für 1 h in 2 % Triton X-100 bei RT gewaschen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C in Inkubationspuffer erfolgte die Färbung in Coomassie-Lösung über Nacht bei RT. Am folgenden Tag wurde das Gel für ca. 1 h bei RT in Entfärberlösung geschwenkt, bis die hellen Aktivitätsbanden der Cysteinproteasen sichtbar wurden und die Cysteinproteaseaktivität visuell analysiert werden konnte. An dieser Stelle sind die im Lysat enthaltenen Cysteinproteasen stagniert und haben die im Gel enthaltene Gelatine verdaut, so dass diese Bereiche nicht mit Coomassie angefärbt werden konnten.

3.4.4 Bestimmung der Toleranz von *E. histolytica* Trophozoiten gegenüber Formaldehyd

Um einen Unterschied der Toleranz von verschiedenen *E. histolytica* Klonen gegenüber Formaldehyd zu analysieren, wurden 1 x 10⁴ Amöben in 25 mL Zellkulturflaschen eingesät und in Anwesenheit von 0-0,01 % Formaldehyd bei 37°C anaerob inkubiert. Nach 48 h wurden die Amöben gezählt und die Teilungsrate bestimmt (siehe 3.4.2).

3.4.5 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von *E. histolytica* Trophozoiten

Um die hämolytische Aktivität von *E. histolytica* Trophozoiten zu bestimmen, wurden Hämolysassays durchgeführt. Dafür wurden humane Erythrozyten (siehe 3.1.10.2 und Trophozoiten dreimal mit NaPBS gewaschen (10 min, 4°C, 200 x g) und gezählt (siehe 3.2.9). 1,25 x 10⁵ Trophozoiten in 500 µL NaPBS wurden zusammen mit 2,5 x 10⁸ Erythrozyten pro 500 µL NaPBS (Verhältnis von 1:2000) für 1 h bei 37°C in einer 24-Well-Platte inkubiert. Die maximale Hämolyse (A_{max})wurde durch Inkubation der Erythrozyten mit 500 µL dH₂O anstatt Trophozoiten bestimmt. A₀ stellt die Negativkontrolle durch Inkubation der Erythrozyten mit NaPBS dar. Nach der Inkubation wurden je 200 µL des Überstands vorsichtig abgenommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Die aufgetretene Hämolyse wurde photometrisch bei 530 nm gemessen, wobei der Referenzfilter auf 630 nm eingestellt wurde. Die hämolytische Aktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

Hämolytische Aktivität =
$$\frac{A - A_0}{A_{max} - A_0} \times 100\%$$
 (3.6)

A = gemessene Extinktion der Probe A_{max} = maximale Hämolyse nach Inkubation mit dH₂O A_0 = Negativkontrolle durch Inkubation mit NaPBS dar

3.4.6 Bestimmung der Erythrophagozytose durch *E. histolytica* Trophozoiten

Zur Beurteilung der Fähigkeit von *E. histolytica* Trophoziten Erythrozyten zu phagozytieren wurden Erythrophagozytseassays durchgeführt. Humane Erythrozyten (siehe 3.1.10.2 und die zu analysierenden Trophozoiten wurden zweimal mit inkomplettem TY-Medium gewaschen ($200 \times g$, 5 min, 4°C) und je 2 x 10⁸ Erythrozyten und 2 x 10⁵ Trophozoiten (Verhältnis 1000:1) in einem Gesamtvolumen von 400 µL in ein 5 mL FACS-Röhrchen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden zweimal je 1 mL dH₂O hinzugegeben und für 1 min inkubiert, um die nicht phagozytierten Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x *g* für 4 min zentrifugiert und zweimal mit NaPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Amöben lysiert, damit diese das Hämoglobin der phagozytierten Erythrozyten freisetzen. Hierfür wurde 1 mL 90 % ige Ameisensäure auf die Trophozoiten in eine 96-Well-Platte pipettiert und bei 405 nm gemessen. Der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle wurde als 100 % definiert und die gemessenen OD-Werte dazu in Relation gesetzt.

3.4.7 Bestimmung der Lyse von THP1-Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten

Um zu analysieren, ob die Trophozoiten von *E. histolytica* auch kernhaltige Zellen lysieren können, wurde die humane Monozytenzelllinie THP1 verwendet (siehe 3.1.10.4. Die Suspensionzellen wurden zunächst zentrifugiert (300 x g, 8 min, 4°C), fusioniert und dreimal mit ca. 20 mL NaPBS gewaschen. Nach einer 10-minütigen Färbung mit Methylenblau-Färbelösung nach Löffler, wurden die Zellen zweimal mit NaPBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.9). 2 x 10⁶ Zellen wurde pro Well in eine 24-Well-Platte eingesät. Die zu untersuchenden Amöben wurden in NaPBS abgelöst und zweimal mit NaPBS gewaschen. Anschließend wurde ihre Zellzahl ermittelt (siehe 3.2.9) und 1 x 10⁵ Amöben zu den THP1 Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 mL gegeben. Als Negativkontrolle wurde NaPBS anstatt Amöben zu den THP1-Zellen gegeben (A_0). Zur Bestimmung der maximalen Absorption (A_{max}) wurde zu den gefärbten THP1-Zellen NaPBS mit 1 % Triton X-100 gegeben. Nachdem gefärbte THP1-Zellen und Amöben 1 h bei 37°C inkubiert wurden, wurden die Ansätze zur Bestimmung von A_{max} einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Der Sonifizierer mit Flachkopfspitze sorgte für den Aufschluss der THP1-Zellen (30 sek mit konstantem Tastgrad), so dass die THP1-Zellen ihren aufgenommenen Farbstoff in den Überstand abgeben. Die Platten wurden für 2 min bei 300 x *g* zentrifugiert und 200 µL des Überstandes in eine 96-Well-Platte überführt. Am ELISA-*Reader* wurde die Färbung des Überstandes bei 630 nm photometrisch bestimmt. Der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle wurde als 100 % definiert und die prozentuale lytische Aktivität in Bezug darauf berechnet.

3.4.8 Bestimmung der Phagozytose von THP1-Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten mittels Durchflusszytometrie

Die als FACS (*fluorescence activated cell sorting*) bezeichnete Methode der Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Analyse von Zellen. Sie ermöglicht es, eine große Anzahl an Zellen innerhalb kurzer Zeit zu untersuchen und liefert dabei Informationen über jede einzelne Zelle. Für die Messung werden die zu untersuchenden Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbei geleitet. Dabei entsteht Streulicht, welches von einem Detektor empfangen wird. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist vom Volumen der jeweiligen Zelle abhängig. Das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) dagegen stellt ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel dar und ermöglich eine Unterscheidung der Zellen nach ihrer Granularität. Neben diesen beiden Parametern besteht zusätzlich die Möglichkeit, Zellen anhand ihrer Fluoreszenzemission zu differenzieren. Dafür können diejenigen Zellen, Oberflächen- oder intrazellulären Moleküle, welche von Interesse sind, mit einem fluoreszenzgekoppeltem Antikörper oder fluoreszierendem Farbstoff markiert und deren Emission am Detektor gemessen werden.

In dieser Arbeit wurde die FACS-Analyse verwendet, um die zeitabhängige Aufnahme von THP1-Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten zu beurteilen. Dafür wurden die THP1-Zellen zunächst zentrifugiert, fusioniert und zweimal mit inkomplettem RPMI-Medium gewaschen (300 x g, 5 min, 4°C). Die Färbung fand für 30 min bei 4°C mit dem roten, intrazellulären Farbstoff CMTPX in einer Verdünnung von 1:320 statt. Dieser emittiert Licht der Wellenlänge 602 nm nach Anregung bei einer Wellenänge von 577 nm. Nachdem die Färbereaktion mit komplettem RPMI-Medium gestoppt wurde, wurden die Zellen dreimal mit NaPBS gewaschen. Die Amöben wurden in inkomplettem RPMI-Medium abgelöst und ebenfalls zweimal damit gewaschen. Die Färbung erfolgte in gleicher Weise mit der Ab-

weichung, dass der grüne, intrazelluläre Farbstoff CMFDA (1:200) verwendet wurde. Nach Anregung bei 500 nm emittiert dieser Licht einer Wellenlänge von 530 nm. Nach Abstoppen der Reaktion mit komplettem RPMI-Medium und 3 Waschschritten mit NaPBS wurden je 2,5 x 10^5 Amöben durch ein 100 µm Zellsieb filtriert und in einem Volumen von 500 µL in FACS-Röhrchen gegeben. Unmittelbar vor der Messung, zum Zeitpunkt 0 min, wurden 7,5 x 10^5 gefärbte THP1-Zellen dazugegeben und 50.000 Zellen aufgenommen. Nach 15-, bzw. 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Probe erneut gemessen. Als Kontrollen um die erfolgreichen Färbungen zu bestätigen, sowie zur Festlegung der *Gating*-Strategie, wurden jeweils gefärbte und ungefärbte THP1-Zellen und Amöben verwendet. Die Messungen wurden am FACSAria II (BD Biosciences) in Zusammenarbeit mit Frau Birgit Hüsing und Frau Ulricke Richardt aus der Arbeitsgruppe Jacobs durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen FACSDiva und FlowJo.

Für die Darstellung der Zellen im Punktediagramm (Dotplot) wurde der Laser PE-A (531 nm) auf der y-Achse und FITC-A (488 nm) auf der x-Achse aufgetragen. Die grüngefärbten Amöben stellen sich dabei im rechten, unteren Quadranten dar, während die rotgefärbten THP1-Zellen im oberen, linken Quadranten liegen. Auf dieser Grundlage wurde das *Gate* gesetzt, so dass die doppelt-positive Population Amöben darstellt, welche THP1-Zellen aufgenommen haben und dadurch auch eine rote Fluoreszenz zeigen.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.5.1.1 Plasmid-Mini-Präparation aus E. coli

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen im kleinen Maßstab (Mini-Präparation) wurde mit einem Plasmid DNA purification Kit von Machery-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.5.1.2 Plasmid-Maxi-Präparation aus E. coli

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen im großen Maßstab (Maxi-Präparation) erfolgte unter Verwendung des NucleoBond Xtra Maxi Kits von Machery-Nagel. Die DNA-Konzentration wurde anschließend am NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) gemessen (siehe 3.5.2.1).

3.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus E. histolytica

Die genomische DNA aus *E. histolytica* wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde am NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) bestimmt (siehe 3.5.2.1).

3.5.1.4 Isolierung von RNA aus E. histolytica

Um die Expression bestimmter Gene in *E. histolytica* beurteilen zu können, erfolgte zunächst eine RNA Isolierung mit TRIzol. Dafür wurden die geernteten Trophozoiten (siehe 3.2.2) in 1 mL TRIzol durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µL eiskaltes Chloroform hinzugegeben und die Proben mehrmals invertiert. Nach einem weiteren zwei- bis dreiminütigen Inkubationsschritt folgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 18.200 x g. Dabei werden die verschiedenen Phasen der Probe separiert, wobei in der oberen, wässrigen Phase die gelöste RNA enthalten ist. Diese wurde vorsichtig abpipettiert und die RNA durch die Zugabe von 500 µL Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und 10 min bei 18.200 x g und 4°C zentrifugiert. Nach einem Waschschritt mit 70 % igem Ethanol wurde das RNA Sediment bei 56°C im Heizblock getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 100 µL RNasefreiem H₂O durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Die nachfolgende Reinigung der RNA wurde mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen durchgeführt, indem die RNA mit 350 µL RLT-Puffer und 250 µL 100 % EtOH gemischt, auf die Säule gegeben und mit 350 µL RW-1 Puffer gewaschen wurde. Ein DNA-Verdau wurde mit dem RNase-Free DNase Set von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt und die RNA in 40 µL H₂O eluiert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde am NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) bestimmt (siehe refchap:RNAKonz) und eine komplementäre DNA (complementary, cDNA)-Synthese (siehe 3.5.4.2) und quantitative (q) PCR (siehe 3.5.4.3) angeschlossen.

Das High Pure RNA Isolation Kit von Roche wurde ebenfalls zur Isolation von RNA aus *E. histolytica* Trophozoiten nach Herstellerangaben verwendet.

3.5.2 DNA-Analysen

3.5.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen, z. B. nach einer Maxi-Prep (siehe 3.5.1.2), wurde der DNA-Gehalt am NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) photometrisch gemessen. Die Messung fand bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Darüber hinaus dienen die Quotienten $OD_{260 nm}$ zu $OD_{280 nm}$ und $OD_{230 nm}$ zu $OD_{260 nm}$ als Indikator für Verunreinigungen.

3.5.2.2 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Methode der PCR wurde bereits 1988 von (Saiki et al., 1988) et al. beschrieben und wird dazu verwendet, spezifische DNA-Fragmente mittels gegenläufig bindenden Oligonukleotiden und hitzestabiler DNA-Polymerase *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen.

Er wurden verschiedene PCRs durchgeführt, die in Tab. 3.14 aufgelistet sind.

Ziel	Klonierung Cas9 in	Klonierung der Silen-	Amplifikation und Se-	
	pNC	cing-Kontrukte	quenzierung der Ziel-	
		$(siehe \ 3.5.3.2)$	sequenz	
Ausgangs-	рХ330-U6-	cDNA des Klons B2	Genomische (g) DNA	
material	Chimeric_BB-CBh-			
	hSpCas9			
Enzym	Phusion High-Fidelity	Phusion High-Fidelity	Red HS Taq Master	
	DNA Polymerase	DNA Polymerase	Mix	
Primer	Cas9 F, Cas9 R	MP8-1 F	074180 F, 074180 R	
		MP8-1 R (270bp)	042870 F, 042870 R	
Programm	98°C für 30 sek	98°C für 30 sek	95°C für 2 min	
	98°C für 10 sek,	98°C für 10 sek, 65°C	95°C für 15 sek, 55°C	
	62°C für 10 sek	für 10 sek, 72°C für	für 15 sek 72°C für	
	$+ 1^{\circ}C/Zyklus$ und	1 min, 30x	15 sek, 40x	
	72°C für 1 min, 20 sek,			
	11x			
	98°C für 10 sek, 72°C			
	für 2 min, 20x			
	72°C für 10 min			
Produktgröße	4,27 kb	270 bp	EHI_074180: 630 bp	
			EHI_042870: 730 bp	

Tabelle 3.15: Auflistung durchgeführter PCRs

Mit den erhaltenen PCR-Produkten wurde anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) durchgeführt.

3.5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle können im elektrischen Feld einer Agarose-Gelelektrophorese aufgrund ihrer negativen Ladung zu analytischen oder präparativen Zwecken getrennt werden. Die Wandergeschwindigkeit der Fragmente ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde eine bestimmte Menge Agarose für Konzentrationen von 0,7-2 % (w/v) in 1x TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht. Um die DNA-Fragmente unter UV-Licht (254 nm) sichtbar zu machen, wurde die flüssigen Agarose unmittelbar vor dem Gießen des Gels mit 1 Tropfen 0,025 % iger Ethidiumbromidlösung pro 50 mL Agarose versetzt. Bei Bedarf wurden die Proben mit entsprechendem Volumen (1/6 der Probe) an Ladepuffer (ThermoFisher Scientific) versehen und an das Gel unter Verwendung von 1X TAE als Laufpuffer eine Spannung von 80-120 V angelegt. Um die Größen der DNA-Fragmente beurteilen zu können, wurde der Marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, sowie der Marker *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* von Thermo Scientific eingesetzt. Bei präparativen Gelen wurden die entsprechenden Banden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten.

3.5.2.4 DNA Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) aufgetrennten, und aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Fragmente, wurden mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean UP Kits von Machery-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Auch andere DNA-Fragmente (z. B. direkt nach einer PCR) wurden unter Zuhilfenahme des NucleoSpin Gel and PCR Clean UP Kits von Machery-Nagel nach Angaben des Herstellers von im Ansatz enthaltenen Komponenten befreit. Die DNA-Konzentration der Proben wurde anschließend am NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) gemessen (siehe 3.5.2.1).

3.5.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation handelt es sich um eine, durch die Ligase katalysierte, Verknüpfung von zwei DNA-Enden. Dadurch kann ein Zielgen (*gene of interest*, GOI) in den jeweiligen Zielvektor eingefügt werden. Für die Ligation in den TOPO-Vektor mit dem TOPO TA Cloning Kit von ThermoFisher Scientific müssen A-Überhänge vorhanden sein. Diese können durch 10-minütige Inkubation bei 72°C mit der *Taq* Polymerase generiert werden. Für Ligationen in andere Vektoren wurde das T4-Ligase Kit von ThermoFisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet, wobei ungefähr die dreifache Menge an Insert im Verhältnis zum Vektor in die Reaktion eingesetzt wurde. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C.

3.5.2.6 Restriktionsanalyse von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können DNA-Moleküle an jeweils spezifischen Palindrom-Sequenzen geschnitten werden. Dadurch kann zirkuläre Vektor-DNA linearisiert oder DNA-Fragmente identifiziert werden. Es wurden *FastDigest* Enzyme von Thermo Scientific oder *High-Fidelity* Restriktionsenzyme von NEB den Herstellerangaben folgend, verwendet (siehe 3.4).

3.5.2.7 Dephosphorylierung von 5 'Enden

Um zu verhindern, dass die Enden eines Vektors mit sich selbst ligieren, welcher mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, werden die 5´ Enden des Vektors dephosphoryliert. Dafür wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* (rSAP) von NEB nach Herstellerangaben verwendet und der Reaktionsansatz anschließend gereinigt (siehe 3.5.2.4).

3.5.2.8 DNA-Sequenzanalyse

Zur Kontrolle der klonierten Konstrukte bzw. von PCR-Produkten (siehe 3.5.2.2) wurden DNA-Sequenzierungsreaktionen nach (Sanger et al., 1977) von der Firma Eurofins Genomics GmbH durchgeführt. Für Sequenzierungsreaktionen im TOPO-Vektor wurden die Primer M13F und M13R verwendet. Für alle weiteren Sequenzierungen wurden die Primer selbst designt. Die Überprüfung der DNA-Sequenzen erfolgte anschließend mit Hilfe der Software MacVector.

3.5.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.5.3.1 Klonierung der Plasmidkonstrukte pNC-Cas9 und pNC-Cas9^{co}



Abbildung 3.1: Ablauf der Klonierung von Cas9 und Cas9^{co} in das Expressionsplasmid pNC. Separate Klonierungsschritte der Cas9 sind blau und der Cas9^{co} grün dargestellt. Alle weiteren Schritte wurden für beide Klonierungen gleichermaßen durchgeführt.

Die einzelnen Schritte der Klonierung von der Cas9 und der Cas9^{co} in den Vektor pNC sind in (Abb. 3.1) dargestellt. Zur Amplifikation des *cas9*-Gens mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase von Thermo Scientific wurde zunächst eine Mini-Präparation (siehe 3.5.1.1) durchgeführt, um eine Vorlage für die PCR (siehe 3.5.2.2) zu erhalten. Darauf folgte eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) mit anschließender Extraktion der richtigen Bande (ca. 4,3 kb) aus dem Gel (siehe 3.5.2.4). Nach separatem Anfügen von A-Überhängen erfolgte die Ligation in den TOPO-Vektor (siehe 3.5.2.5) und die Transformation in kompetente TOP10-Zellen (siehe 3.2.7). Die die codonoptimierte Cas9 (cas9^{co}) wurde in einem Shuttlevektor geliefert, so dass die DNA lediglich in H₂O aufgenommen wurde und anschließend direkt zur Transformation (siehe 3.2.7) in kompetente TOP10-Zellen (siehe 3.2.6) eingesetzt wurde. Es folgte eine Blau-Weiß-Selektion zur Identifizierung der transgenen Klone. Von den weißen Klonen wurden Mini-Präparationen (siehe 3.5.1.1) mit anschließender analytischen Restriktionsanalyse (siehe 3.5.2.6) durchgeführt, um die Integration des Inserts zu verifizieren (Cas9: EcoRI, EcoRV, Cas9^{co}: KpnI, BamHI, NdeI). Der Zielvektor (pNC) sowie das Insert wurden nachfolgend einer präparativen Restriktionsanalyse mit jeweils den gleichen Restriktionsenzymen unterzogen (Cas9: BamHI, Cas9^{co}: KpnI, BamHI). Die Cas9 wurde zusätzlich mittels Sequenzierung (siehe 3.5.2.8) unter Verwendung eines Primer-Walks auf mögliche Fehler hin untersucht. Im nächsten Schritt wurden die Inserts (Cas9 und Cas9^{co}), sowie der Vektor (pNC) mit einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) von weiteren Fragmenten separiert und die jeweiligen Banden (Insert ca. 4,3 kb, pNC ca. 6 kb) aus dem Gel extrahiert (siehe 3.5.2.4). Da der Vektor für die Klonierung der Cas9 nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, wurden dessen 5' Enden dephosphoryliert (siehe 3.5.2.7). Danach wurde eine Reinigung des Vektors mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean UP Kit von Machery-Nagel (siehe 3.5.2.4) durchgeführt. Alle weiteren Schritte wurden für beide Klonierungen gleichermaßen durchgeführt. Nach der Ligation von Insert und Vektor (siehe 3.5.2.5) erfolgte die Transformation (siehe 3.2.7) in kompetente TOP10-Zellen (siehe 3.2.6) und Mini-Präparationen (siehe 3.5.1.1), mit anschließenden Restriktionsanalysen (siehe 3.5.2.6) (Cas9: SphI, Cas9^{co}: Kpn, BamHI, NdeI, EcoRI) und Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3), um die transgenen Klone zu identifizieren. Sicherheitshalber wurde der Anfang des Inserts aus dem Vektor heraus sequenziert (siehe 3.5.2.8). Um eine große Menge an Plasmid-DNA zu erhalten, wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt (siehe 3.5.1.2) und die DNA zur Transfektion von Amöben (siehe 3.2.4) eingesetzt.

3.5.3.2 Klonierung der Plasmidkonstrukte pNSiA-MP8-1 und pNSiB-MP8-1

Die einzelnen Schritte der Klonierung der Silencing-Kontrukte pNSiA-MP8-1 und pNSiB-MP8-1 sind in (siehe 3.2) dargestellt.

Zunächst wurde eine PCR (siehe 3.15) mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase von Thermo Scientific durchgeführt, wobei als Vorlage cDNA des *E. histolytica* Klons B2^p verwendet wurde. Mit spezifischen Primern wurden die ersten 270 bp des Genes EHI_200230 (EhMP8-1) amplifiziert. Anschließend wurden A-Überhänge generiert und der Reaktions-



Abbildung 3.2: Ablauf der Klonierung der Plasmidkonstrukte pNSiA MP8-1 und pNSiB MP8-1.

ansatz gereinigt (siehe 3.5.2.4), so dass daraufhin die Ligation in den TOPO-Vektor (siehe 3.5.2.5) und die Transformation (siehe 3.2.7) in kompetente TOP10-Zellen (siehe 3.2.6) erfolgen konnte. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion wurden putativ transgene Kolonien gepickt, mit diesen eine Mini-Präparation (siehe 3.5.1.1) mit nachfolgender analytischen Restriktionsanalyse (siehe 3.5.2.6) (*KpnI/BamHI*) durchgeführt und im Agarosegel analysiert (siehe 3.5.2.3). Nach Sequenzierung (siehe 3.5.2.8) der positiven Klone wurde ein präparativer Restriktionsverdau des Inserts, sowie der beiden Vektoren pNSiA und pNSiB mit den Enzymen *KpnI* und *BamHI* durchgeführt (siehe 3.5.2.6). Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) wurden die Fragmente aufgetrennt und die richtigen Banden (Insert: 270 bp, Vektoren ca. 6 kb) aus dem Gel extrahiert (siehe 3.5.2.4). Vektor und Insert wurden ligiert (siehe 3.5.2.5) und in kompetente TOP10-Zellen (siehe 3.2.6) transformiert (siehe 3.2.7). Nach dem Screening mehrerer Klone mittels Mini-Präparation (siehe 3.5.1.1), Restriktionsanalyse mit *KpnI* und *BamHI* (siehe 3.5.2.6) und Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) wurde von je einem Klon eine Maxi-Präparation (siehe 3.5.2.3) durchgeführt und die DNA zur Transfektion von Amöben (siehe 3.2.4) eingesetzt.

3.5.4 RNA-Analysen

3.5.4.1 Konzentrationsbestimmung von RNA

Um die Ausbeute nach einer RNA-Isolierung (siehe 3.5.1.4) zu bestimmen, wurde die RNA-Konzentration am NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) photometrisch gemessen. Die Messung fand bei einer Wellenlänge von 260 nm statt, wobei die Quotienten $OD_{260 nm}$ zu $OD_{280 nm}$ und $OD_{230 nm}$ zu $OD_{260 nm}$ als Maß für Verunreinigungen dienen.

3.5.4.2 Synthese der cDNA

Die für die qPCR (siehe 3.5.4.3) benötigte cDNA wurde unter Verwendung des SuperScriptIII First-Strand-Synthesis System-Kit von Invitrogen aus der isolierten RNA synthetisiert. Der Reaktionsansatz enthielt 1 µg RNA, 4 µL 5x Puffer, 2 µL 0,1 mM DTT, 1 µL SuperScript III, 2 µL (10 mM) dNTPs, 1 µL Oligo (dT7) Primer, 0,5 µL RNase out, 0,4 µL 25 mM MgCl₂ und wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 42°C im Heizblock und wurde maximal 1 Woche bei -20°C gelagert, bis sie in der qPCR eingesetzt wurde.

3.5.4.3 Quantitative real-time PCR

Mit Hilfe einer qPCR lassen sich Expressionslevel bestimmter Gene quantitativ analysieren. Dafür wurde die Expression eines GOI ins Verhältnis zu einem Referenzgen gesetzt. Als Referenzgen wurde β -actin verwendet, da es konstant exprimiert wird und somit Unterschiede in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA ausgleicht. Für die Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) eingesetzt, welcher in die neu gebildete, doppelsträngige (ds) DNA interkaliert und dadurch Licht einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt nach jedem Zyklus, wobei die Fluoreszenz proportional mit der PCR-Produktmenge zunimmt. Zur Quantifizierung der Zielgenexpression wurde der Zyklus, bei dem der Schwellenwert (*threshold of cycle*, $C_{\rm T}$) überschritten wurde, bestimmt. Er beschreibt den Zyklus in der exponentiellen Phase, bei welchem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Befindet sich eine große Menge an cDNA des GOI in der Probe, wird der CT Wert eher erreicht, als wenn nur eine geringe Menge an cDNA vorliegt. Für die Berechnung des Expressionslevels wurde eine relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode durchgeführt. Dabei wird zunächst die Differenz (Δ) der CT-Werte des GOI zum Referenzgen (Ref) ermittelt: $\Delta C_{T GOI}$ $= C_{\rm T \ GOI} - C_{\rm T \ Ref}$

Des Weiteren wird der $\Delta C_{\rm T}$ Wert einer, als Kalibrator (Kal) dienenden Probe gesetzt: $\Delta C_{\rm T \ Kal} = C_{\rm T \ GOI}$ - $C_{\rm T \ Ref}$

Anschließend wird der $\Delta\Delta C_{\rm T}$ Wert berechnet: $\Delta\Delta C_{\rm T} = \Delta C_{\rm T~GOI}$ - $\Delta C_{\rm T~Kal}$.

Die relative Expression eines Zielgens im Verhältnis zu einem Kalibrator wird mit folgender Formel ermittelt: relative Expression = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Diese relative Konzentration beschreibt die unterschiedliche Expression von Genen im Vergleich zu einem Kalibrator, dessen relative Konzentration 1 beträgt. Für die Reaktion wurde das 5 PRIME RealMasterMix for SYBR Green Kit von Thermo Scientific verwendet. Pro Ansatz wurden 9 µL 2,5x real Mastermix SYBR ROX, je 2 µL 5 pmol/µL Oligonukleotide, 1 μ L cDNA und 6 μ L H₂O eingesetzt. Es erfolgte jeweils ein Doppelansatz und um DNA-Verunreinigungen auszuschließen, wurden ebenfalls H₂O-Kontrollen mitgeführt. Die Durchführung erfolgte in einer *Corbett Research Rotor-Gene* 3000 in 0,1 mL Reaktionsgefäßen mit folgendem Temperaturverlauf:

Tabene 5.10. Temperaturpioni dei verwendeten di Ott			
PCR-Abschnitt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95°C	60 sek	
40 Zyklen			
Denaturierung	95°C	15 sek	
Annealing	58°C	20 sek	
Elongation und Messung	68°C	20 sek	

 Tabelle 3.16:
 Temperaturprofil der verwendeten qPCR

In Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Temperatur kontinuierlich von 68°C auf 95°C erhöht wird. Die Temperatur bei der die dsDNA denaturiert und der interkalierende Farbstoff freigesetzt wird, ist spezifisch für das jeweilige Produkt. Somit lassen sich Primer-Dimere und unspezifische Amplifikate identifizieren, die von der Analyse auszuschließen sind.

3.5.5 CRISPR/Cas

3.5.5.1 In vitro Transkription und Reinigung von single guide RNAs

Die zur Modifikation von Zellen mittels CRISPR/Cas notwendigen sgRNAs wurden mit Hilfe den Kits von TAKARA (Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit) nach Herstellerangaben produziert und gereinigt (Guide-it sgRNA Clean-Up Kit). Es wurden entsprechende Primer designt (siehe 3.10), um die beiden Gene EHI_074180 und EHI_042870 jeweils an einer vorderen und einer mittleren Position zu schneiden.

3.5.5.2 Screening der Wirksamkeit von sgRNAs in vitro

Um die Wirksamkeit der *in vitro* hergestellten sgRNAs (siehe 3.5.5.1) zu untersuchen, wurde das Guide-it sgRNA Screening Kit von Takara eingesetzt. Dabei wird die *in vitro* transkribierte sgRNA zusammen mit einer rekombinanten Cas9 inkubiert und zu der amplifizierten Zielsequenz gegeben, in der es bei einer funktionalen sgRNA zu einer Spaltung kommt. Die zur Amplifikation des Zielgens benötigte gDNA wurde nicht mit dem Guideit sgRNA Screening Kit von Takara isoliert, sondern mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen wie unter 3.5.1.3 beschrieben. Auch die PCR wurde nicht mit dem Guideit sgRNA Screening Kit von Takara, sondern mit dem Red HS Taq Master Mix von Biozym (siehe 3.2) und entsprechenden Primern (siehe 3.10) durchgeführt. Der vom Hersteller und im weiteren Verlauf als *Cleavage*-Assay bezeichnete Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, indem zunächst die sgRNAs mit einer rekombinanten Cas9 inkubiert wurden und anschließend der zu schneidende Genabschnitt bzw. ein Kontrollfragment sowie weitere Komponenten hinzugefügt wurden (Inkubation 1 h, 37°C). Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.5.2.3) konnte die Wirksamkeit der sgRNA anhand der entstandenen Spaltprodukte beurteilt werden. Zusätzlich wurde der *Cleavage*-Assay mit Lysat (siehe 3.2.3) der Cas9^{co}-emprimierenden Trophozoiten, statt mit der rekombinanten Cas9 durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine aktive Cas9 im Lysat vorliegt.

3.5.5.3 Ribonukleoprotein Komplex

Alt-R CRISPR-Cas9 System von der Firma IDT enthält alle Komponenten die für den erfolgreichen Einsatz des CRISPR/Cas Systems notwendig sind: eine selbst designte crRNA, die komplementär zu einem Teil der zu modifizierenden Zielsequenz ist, eine Fluoreszenzmarkierte tracrRNA (ATTO550), welche einen komplementären Bereich zu einem Teil der crRNA enthält und im roten Bereich fluoresziert, und eine rekombinante Cas9 bilden. Der daraus besetehende RNP Komplex wird mit einem so genannten Electroporation Enhancer kombiniert und direkt in die Amöben transfiziert. Der Vorteil dieses Komplexes ist die gleichzeitige und komplette Verabreichung aller, für das CRISPR/Cas-System benötigte Komponenten. Die crRNAs (siehe 3.10) wurden so gewählt, dass das Gen EHI_074180 an einer vorderen und einer mittleren Position geschnitten wird. Nach dem Protokoll des Herstellers "Delivery of ribonucleoprotein complexes into Jurkat T cells using the Neon Transfection System" wurde der RNP Komplex in einfacher (5,1 µM), dreifacher (15,3 µM) und sechsfacher (30,6 µM) Menge gebildet und wie bei einer Transfektion mit Plasmid-DNA (siehe 3.2.4) eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem RNP-Komplex transfiziert, bei dem die Fluoreszenz-markierte tracrRNA fehlte. Die transfizierten Amöben wurden ca. 12 Stunden nach der Transfektion mit NaPBS geerntet (siehe 3.2.2), dreimal mit NaPBS gewaschen (400 x g, 4°C, 4 min) und in ein FACS-Röhrchen überführt. Am FACS (siehe 3.4.8) wurden die transfizierten Amöben, sowie untransfizierte Amöben als Kontrolle nach Anregung einem Laser der Wellenlänge 531 nm im roten Kanal analysiert (100.000 Zellen). Der Farbstoff ATTO550 emittiert Licht einer Wellenlänge von ca. 575 nm nach Anregung durch eine Wellenlänge von 550 nm. Für die Auswertung des Dotplots wurde PE-A auf der y-Achse gegen FSC-A auf der x-Achse aufgetragen, worin sich Amöben als längliche Wolke im unteren Bereich darstellen. Haben Amöben den RNP Komplex mit der rot fluoreszierenden tracrRNA aufgenommen, verlagern sie sich nach oben.

Die nicht für die FACS-Analyse verwendeten Zellen wurden 1:100 mit Hoechst gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in dsDNA und färbt somit Zellkerne an, die nach Anregung Licht im blauen Spektrum emittieren. Nach einem Waschschritt mit NaPBS wurden die Zellen am Mikroskop Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M2 von Zeiss in der 100x-Vergrößerung auf die rote, durch die tracrRNA hervorgerufene, Fluoreszenz hin untersucht (siehe 3.3.5.1).



3.5.5.4 Mutationsnachweis auf DNA-Ebene

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des *Cleavage*-Assays zum Nachweis von Mutationen auf DNA-Ebene durch die T7EI Endonuklease.

Um eine Mutation in CRISPR/Cas behandelte Zellen auf DNA-Ebene nachweisen zu können, wurde das *Genome Editing Detection* Kit von IDT verwendet (siehe Abbildung 3.3). Dabei wird mittels PCR die Zielsequenz putativer Mutanten vervielfältigt, denaturiert und reannealt, um eine potenzielle Heteroduplexbildung zwischen Wildtyp- und CRISPR-mutierter DNA zu ermöglichen. Die T7 Endonuklease I (T7EI) erkennt und spaltet inkongruente DNA-Heteroduplexe, so dass die Anwesenheit und Intensität der Spaltprodukte im Agarosegel die Beurteilung der Qualität und Quantität einer Mutation ermöglicht. Die Zielsequenzen wurden mittels PCR amplifiziert (siehe 3.5.2.2) und jeweils 4 Klone gepoolt, bzw. DNA der Stammkultur B2-5^p eingesetzt und das Kit nach Herstellerangaben verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung von Überexpressions- und Silencing-Transfektanten der Alkoholdehydrogenase und Metalloprotease

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei putative Pathogenitätsfaktoren des protozoischen Parasiten *E. histolytica* charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um eine Metalloprotease (EhMP8-2) die von dem Gen EHI_042870 codiert wird, sowie eine vom Gen EHI_088020 codierte Alkoholdehydrogenase (ADH). Diese wurden in vergleichenden Transkriptionsstudien zwischen den apathogenen Klonen (A1^{np} und B8^{np}) und dem pathogenen Klon B2^p als differentiell exprimiert identifiziert. Für die EhMP8-2 wurde eine 150-fach erhöhte Expression im Klon A1^{np} im Vergleich zum Klon B2^p ermittelt. Verglichen mit dem Klon B2^p wird die ADH im Klon A1^{np} 2,96-fach, und im Klon B8^{np} 3,5-fach stärker exprimiert.

Die Überexpression dieser beiden Gene im Klon B2^p führte zu einer signifikant reduzierten Pathogenität, die sich im Tiermodell durch eine geringere ALA-Bildung auszeichnete, so dass eine negative Korrelation zwischen Präsenz der Proteine und Pathogenität der Transfektanten auftrat (Meyer et al., 2016).

Darüber hinaus wurden in vorangegangenen Arbeiten durch Dr. Jenny Matthiesen Transfektanten hergestellt, bei denen die Expression beider Gene inhibiert wurde. Diese Trophozoiten werden nachfolgend als "Silencing"-Transfektanten, und der Effekt dieser Expressionsinhibierung als "Silencing" bezeichnet.

Durch das Silencing der *adh* in dem Klon B8^{np} und der *ehmp8-2* im Klon A1^{np} konnte jedoch kein Einfluss auf die Pathogenität im Tiermodell beobachtet werden (Matthiesen et al., 2018).

Das hier verwendete Silencing-Verfahren basiert auf dem Prinzip von RNA-Interferenz und wird in *E. histolytica* durch eine Trigger-Sequenz hervorgerufen (siehe 1.4). Die Silencing-Transfektanten wurden über mehrere Monate ohne Selektionsdruck kultiviert, um den Verlust des Silencing-Plasmids und somit ein stabiles Silencing zu erzielen. Dadurch konnten die dazugehörigen, untransfizierten Stammkulturen als Kontrolle verwendet werden.

4.1.1 Alkoholdehydrogenase

Für die Charakterisierung der ADH wurden folgende Transfektanten verwendet: die Überexpressions-Transfektanten B2^p ADH_ÜE im Vergleich zur Kontrolle B2^p pNC, sowie die Silencing-Transfektanten B8^{np} ADH_Si im Vergleich zur Stammkultur B8^{np}. Die Expressionslevel der *adh* in den Transfektanten wurde auf mRNA-Ebene mittels qPCR überprüft. Abbildung 4.1 A zeigt, dass die *adh*-Überexprimierer (B2^p ADH_ÜE) eine 34-fach erhöhte relative mRNA Konzentration des ADH-codierenden Gens aufweisen, im Vergleich zu der auf 1 normierten Kontrolle B2^p pNC (****p $\leq 0,0001$). Durch die mehr als dreifach erhöhte Expression entsprechen die Transfektanten somit der Definition von einer Überexpression und können für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

In den *adh*-Silencing-Transfektanten (B8^{np} ADH_Si) konnte keine mRNA des ADH-codierenden Gens nachgewiesen werden, so dass das Silencing im Vergleich zur Stammkultur B8^{np} ebenfalls verifiziert wurde (**** $p \le 0,0001$).

Da bereits spezifische Antikörper gegen die ADH vorlagen (Dissertation Meyer, 2016), konnten die Überexpression, sowie das Silencing der *adh* im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle auch auf Proteinebene mittels Westernblot im Amöbenlysat (siehe Abb. 4.1 B) gezeigt werden. Die Proteinbande der ADH auf Höhe von 42 kDa weist im Westernblot bei den Transfektanten B2-5^p ADH_ÜE eine deutlich stärkere Intensität auf als im Lysat der Kontrolle B2-5^p pNC, sowie im Lysat der ebenfalls mitgeführten Stammkultur B2-5^p. Die mit Coomassie gefärbte Ladekontrolle belegt daneben eine gleichmäßige Beladung des Gels und keine Abweichungen in den aufgetragenen Proteinkonzentrationen. Des Weiteren ist aus Abbildung 4.1 B ersichtlich, dass auch das Silencing der *adh* auf Proteinebene im Vergleich zur Kontrolle bestätigt werden konnte. Die Proteinbande der ADH in dem Lysat der Silencing-Transfektanten B8^{np} ADH_Si nimmt deutlich an Intensität ab im Vergleich zu dem Lysat der Stammkultur B8^{np}. Anhand der nebenstehenden Ladekontrolle kann eine unterschiedliche Proteinmenge dabei erneut ausgeschlossen werden.



Abbildung 4.1: Nachweis von *adh*-Überexpression und -Silencing in *E. histo-lytica* Trophozoiten. (A) Aus den Trophozoiten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen, ADH-codierenden mRNA Konzentration in der qPCR mit SYBR Green eingesetzt. Als Kalibrator diente Aktin und die Kontrollen wurden auf 1 normiert. (B) Westernblot Analyse. 12 % iges SDS-Gel mit 11-20 µg Lysat pro Spur. 1. Antikörper anti-ADH (Verdünnung 1:400), 2. Antikörper anti-Maus (Verdünnung 1:10000) (Mittelwerte±Standardfehler, n=3 in Doppelbestimmung, *unpaired Student* 's t test, **** $p \leq 0,0001$).

Die Daten haben auf mRNA- und Proteinebene bestätigt, dass die Überexpression sowie das Silencing der *adh* in den Transfektanten vorlag.

4.1.2 Metalloprotease

Für die Charakterisierung der Metalloprotease (EhMP8-2) wurden zunächst folgende Transfektanten verwendet: die Überexpressions-Transfektanten B2-5^p MP8-2_ÜE, im Vergleich zur Kontrolle B2-5^p pNC, sowie die Silencing-Transfektanten A1^{np} MP8-2_Si im Vergleich zur Stammkultur A1^{np}.

Diese Transfektanten wurden auf mRNA-Ebene analysiert, um die Überexpression bzw. das Silencing der *ehmp8-2* im Vergleich zu den Kontrollen zu belegen. Dafür wurde eine qPCR durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 4.2 dargestellt ist. Die *ehmp8-2*-Überexprimierer (B2-5^p MP8-2_ÜE) wiesen eine 41-fach erhöhte (**** $p \le 0,0001$) mRNA Konzentration des EhMP8-2 codierenden Gens verglichen mit der auf 1 normierten Kontrolle B2-5^p pNC auf, wodurch die Überexpression des *ehmp8-2*-Gens bestätigt wurde (**** $p \le 0,0001$).

In den Silencing-Transfektanten (A1^{np} MP8-2_Si) konnte keine mRNA des EhMP8-2-codierenden Gens im Vergleich zur Kontrolle (A1^{np} Stammkultur) nachgewiesen werden, so dass auch das Silencing der *ehmp8-2* bestätigt wurde (**** $p \le 0,0001$).

Da keine spezifischen Antikörper gegen die EhMP8-2 zur Verfügung standen, konnten *ehmp8-*2-Überexpression und -Silencing in den Transfektanten nur auf mRNA-, nicht auf Protein-Ebene nachgewiesen werden.



Abbildung 4.2: Expressionsprofil EhMP8-2 codierender mRNA in *ehmp8-2*überexprimierenden und -gesilencten *E. histolytica* Trophozoiten mittels qPCR. Aus den Trophozoiten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen, EhMP8-2-codierenden mRNA Konzentration in der qPCR mit SYBR Green eingesetzt. Als Kalibrator diente Aktin und die Kontrollen wurden auf 1 normiert (Mittelwerte±Standardfehler, n=3 in Doppelbestimmung, *unpaired Student's t test*, ***** $p \le 0,0001$).

Wie aus den oben gezeigten Daten zu entnehmen ist, konnte in den *ehmp8*-2-überexprimierenden und -gesilencten Trophozoiten die verstärkte, bzw. nicht vorhandene Transkription des EhMP8-2-codierenden Gens mittels qPCR bestätigt werden.

4.2 Einfluss des RNAi-basierten Silencings auf verwandte Gene

Bei der hier verwendeten Silencing-Methode handelt es sich um ein RNAi-basiertes Verfahren. Dabei wird an eine so genannte Trigger-Region, gegen die eine große Anzahl an kleinen asRNAs gebildet werden, das Gen fusioniert, welches gesilenct werden soll. Diese gegenläufigen RNAs werden somit auch gegen das fusionierte Gen gebildet und vermitteln die RNA-Interferenz durch die das Gen gesilenct wird (siehe 1.4). Sind die Sequenzhomologien zwischen verwandten Genen groß genug, kann auch eine Reduktion der Expression ähnlicher Gene durch die asRNAs hervorgerufen werden.

Im Folgenden Abschnitt wurde der Einfluss des Silencings der *adh* und *ehmp8-2* auf verwandte Gene untersucht.

4.2.1 Alkoholdehydrogenase

In den Transfektanten in denen die *adh* gesilenct wurde (B8^{np} ADH_Si), wurde das Expressionslevel drei weiterer ADH-codierender Gene mit einer Sequenzhomologie von 79 %, 70 % und 56 % mittels qPCR analysiert. Die Sequenzhomologien wurden durch BLAST-Analysen bestimmt.

Abbildung 4.3 zeigt, dass es durch das Silencing der *adh* ebenfalls zu einem Silencing des Gens EHI_192470 kommt, welches eine Sequenzhomologie von 79 % aufweist. Das Gen EHI_198760 mit einer nur 70 % iger Sequenzhomologie wird durch das Silencing der *adh* nicht signifikant (ns) beeinflusst. Anders bei dem Gen EHI_125950 mit nur 56 % iger Homologie, dessen codierende, relative mRNA Konzentration zwar signifikant (****p \leq 0,0001) reduziert wird, aber immer noch eine 0,47-fache Expression aufweist, verglichen zur Kontrolle. Daher handelt es sich hierbei um ein sogenanntes "unvollständiges" Silencing.



Abbildung 4.3: Einfluss des Silencings der *adh* auf die Expression verwandter, ADH-codierender Gene mittels qPCR. Vergleich der relativen mRNA Konzentrationen codierend für verwandte ADHs in der Stammkultur B8^{np} (normiert auf 1) und den *adh*-Silencern (B8^{np} ADH_Si) mittels qPCR mit SYBR Green und Aktin als Kalibrator (Mittelwerte±Standardfehler, n=3 in Doppelbestimmung, *unpaired Student*'s *t test*, ns=p>0,05, ****p \leq 0,0001).

Die Analyse der relativen mRNA Konzentrationen, welche für verwandte ADHs codieren zeigte, dass das Silencing der *adh* großen Einfluss auf die Expression dieser Gene hat, da diese auch gesilenct bzw. ihre Transkription signifikant reduziert wurde.

4.2.2 Metalloprotease

Auch bei den Transfektanten in denen die *ehmp8-2* gesilenct vorliegt (A1^{np} MP8-2_Si) wurde der Einfluss des Silencings auf die Expression der verwandten *ehmp8-1* (EHI_200230) mittels qPCR untersucht. Diese weist laut BLAST-Analyse 57 % Sequenzhomologie zu dem EhMP8-2-codierenden Gen auf. Durch das Silencing der *ehmp8-2* wurde auch die Expression der *ehmp8-1* beeinflusst, da diese eine signifikant reduzierte (0,48-fach, **p \leq 0,01) relative mRNA Konzentration des codierenden Gens im Vergleich zu der Stammkultur A1^{np} (normiert auf 1) aufweist (siehe Abb. 4.4).



Abbildung 4.4: Einfluss des Silencings der *ehmp8-2* auf die Expression des *ehmp8-1* Gens mittels qPCR. Vergleich der relativen mRNA Konzentrationen codierend für die EhMP8-1 und EhMP8-2 in der Stammkultur A1^{np} (normiert auf 1) und den Transfektanten mit gesilencter *ehmp8-2*-Expression (A1^{np} MP8-2_Si) mittels qPCR mit SYBR Green und Aktin als Kalibrator (Mittelwerte±Standardfehler, n=3 in Doppelbestimmung, *unpaired Student's t test*, **p $\leq 0,01$, ****p $\leq 0,0001$).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass durch das Silencing der *ehmp8-2* ebenfalls die Transkription des *ehmp8-1*-Gens signifikant reduziert, jedoch nicht gesilenct wurde.
Da somit gezeigt wurde, dass das hier angewendete, RNAi-basierte Silencing-Verfahren einen großen Einfluss auf verwandte, Gene haben kann, wurde in dieser Arbeit versucht, eine neue Silencing Methode für *E. histolytica* zu etablieren: Das CRISPR/Cas-System.

4.3 Etablierung des CRISPR/Cas-Systems in *E. histolytica*

CRISPR/Cas steht für "*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*/CRISPR *associated*" und stellt ein System dar, um einzelne Gene gezielt auszuschalten. Das CRISPR/Cas-System wird seit kurzem in vielen Anwendungsbereichen eingesetzt und stellt eine neue vielversprechende Methode dar *E. histolytica* Silencing-Transfektanten zu generieren. Für die Verwendung des CRISPR/Cas-Systems wird zum einen die Endonuklease Cas9 und zum anderen kurze RNAs (so genannte sgRNAs), welche die Cas9 zu der jeweiligen Zielsequenz leiten, benötigt. Der dort hervorgerufene DSB wird durch das Reparatursystem (NHEJ) der Zelle meistens fehlerhaft repariert, wodurch Indels und somit *Frame-shift* Mutationen entstehen, die das Gen inaktivieren (siehe 1.5.4).

4.3.1 Expression der cas9 durch E. histolytica Trophozoiten

Um mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems *E. histolytica* Trophozoiten zu modifizieren, wurde zunächst das Cas9-codierende Gen aus dem Plasmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Cong et al., 2013) in den Expressionsvektor pNC kloniert und in die Klone A1^{np} und B2-5^p transfiziert. Zur Detektion des Proteins ist dieses mit einem FLAG-*Tag* versehen.

Die Transkription der *cas9* in den Transfektanten (A1^{np} Cas9_ÜE und B2-5^p Cas9_ÜE) im Vergleich zur Kontrolle A1^{np} pNC und B2-5^p pNC wurde mit Hilfe einer qPCR analysiert. Die Beurteilung der *cas9*-Transkription erfolgte anhand der Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate, sowie den c_T-Werten der amplifizierten Produkte (Daten nicht gezeigt). Bei den Trophozoiten der Kontrollen wurde eine viel niedrigere Schmelztemperatur die Amplifikate gemessen, als bei den Transfektanten A1^{np} Cas9_ÜE und B2-5 ^p Cas9_ÜE, sowie dem als Positivkontrolle mitgeführten Plasmid welches das *cas9*-Gen enthält. Somit basiert das Fluoreszenzsignal und der daraus abgeleitete c_T-Wert nur bei den Transfektanten A1^{np} Cas9_ÜE und B2-5^p Cas9_ÜE auf der Amplifikation des richtigen Produktes. Dieser Sachverhalt belegt, dass nur in den Transfektanten und nicht in den Trophozoiten der Kontrolle das *cas9*-Gen vorhanden ist und in mRNA transkribiert wird.

Allerdings konnte mit Hilfe einer Westernblot Analyse (siehe 4.5) die Cas9, welche eine molekulare Masse von ca. 140 kDa besitzt, bei keiner der Transfektanten (A1^{np} Cas9_ÜE und B2-5^p Cas9_ÜE) mit einem gegen den FLAG-*Tag* gerichteten Antikörper nachgewiesen werden.



Abbildung 4.5: Westernblot Analyse der Cas9-Expression in *E. histolytica* Transfektanten. *E. histolytica* Trophozoiten der Klone A1^{np} und B2-5^p wurden mit dem Expressionsplasmid pNC-Cas9 transfiziert und in Gegenwart von 25 µg/mL G418 kultiviert. Die Expression der *cas9* wurde auf Protein-Ebene mittels Westernblot (8 % SDS PAGE, ca. 10 µg/Spur, 1. Antikörper anti-FLAG (Verdünnung 1:1000), 2. Antikörper anti-Maus (Verdünnung 1:10.000) analysiert.

In den Transfektanten A1^p Cas9_ÜE und B2-5^p Cas9_ÜE konnte die Expression der *cas9* durch *E. histolytica* lediglich auf mRNA-, nicht aber auf Protein-Ebene mit einem gegen den FLAG-*Tag* gerichteten Antikörper nachgewiesen werden.

4.3.2 Expression der cas9^{co} durch E. histolytica Trophozoiten

Ein Grund dafür, dass die RNA-, nicht jedoch die Protein-Synthese der *cas9* in den transfizierten Trophozoiten erfolgte, könnte in der Codon-Zusammensetzung des Gens liegen. Da sich diese zwischen Menschen und *E. histolytica* unterscheidet, wurde das *cas9*-Gen, welches für die Verwendung in humanen Zellen vorgesehen war, auf *E. histolytica* "zugeschnitten, bzw. codonoptimiert. Dazu wurden die Basen-Triplets des Gens, welche für eine bestimmte Aminosäure codieren, durch synonyme Codons ausgetauscht und an die in *E. histolytica* vorhandenen tRNAs angepasst. Somit kann bei der Translation die gleiche Aminosäure durch eine andere, in *E. histolytica* häufiger vorkommende tRNA an das entstehende Polypeptid angehängt werden.

Das codonoptimierte *cas9* (*cas9*^{co}) Gen wurde in den Expressionsvektor pNC kloniert, in die Klone A1^{np} und B2-5^p transfiziert und die *cas9*^{co}-Transkription mittels qPCR analysiert. Im Vergleich zu den Trophozoiten der Klone, die mit dem Expressionsvektor transfiziert wurden, zeigten nur die Transfektanten A1^{np} Cas9^{co}_ÜE und B2-5^p Cas9^{co}_ÜE in der Schmelz-kurvenanalyse die Amplifikation des richtigen Produktes (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte bestätigt werden, dass nur in den Transfektanten und nicht in den Kontroll-Trophozoiten eine Cas9^{co}-codierende mRNA vorliegt und die Anwesenheit des *cas9^{co}* Gens somit belegt.

Mittels Westernblot Analyse und einem direkt gegen die Cas9 gerichteten Antikörper konn-

te die Expression der *cas9*^{co} auf Proteinebene dagegen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.6). Weder die Transfektanten A1np Cas9^{co}_ÜE noch B2-5^p Cas9^{co}_ÜE wiesen ein Protein in der richtigen Größe (ca. 140 kDa) auf, hingegen konnten lediglich Proteine geringerer Größe detektiert werden.



Abbildung 4.6: Westernblot Analyse der $cas9^{co}$ -Expression in *E. histolyti*ca Transfektanten. *E. histolytica* Trophozoiten der Klone A1^{np} und B2-5^p wurden mit dem Expressionsplasmid pNC-Cas9^{co} transfiziert und unter Selektionsdruck von 75 µg/ml G418 kultiviert. Die Expression der $cas9^{co}$ wurde auf Protein-Ebene mittels Westernblot (8 % SDS PAGE, ca. 45 µg/Spur, 1. Antikörper anti-Cas9 (Verdünnung 1:500), 2. Antikörper anti-*Rabbit* (Verdünnung 1:3000), Positivkontrolle: 5 ng Cas9) analysiert.

Auch von der codonoptimierten *cas9^{co}* konnte in den beiden Transfektanten A1^{np} Cas9^{co}_ÜE und B2-5^p Cas9^{co}_ÜE nur die Transkription, nicht jedoch die Translation des Cas9^{co} codie-renden Gens nachgewiesen werden.

4.3.3 CRISPR/Cas mit einem Ribonukleoprotein-Komplex

Um das CRISPR/Cas-System unabhängig von der Expression einer funktionellen Cas9 durch die Amöben verwenden zu können, wurde der Ansatz verfolgt, *E. histolytica* Trophozoiten mit einem RNP-Komplex zu transfizieren. Dieser Komplex enthält alle für das CRISPR/-Cas System nötigen Komponenten: eine aktive, rekombinante Cas9, sowie eine Fluoreszenzmarkierte tracrRNA und eine sequenzspezifische crRNA, welche zusammen die Funktion der sgRNA übernehmen (siehe 1.5.4).

4.3.3.1 In vitro Transkription und Screening von sgRNAs

Zur Überprüfung der Aktivität von sgRNAs in Bezug auf ihre jeweilige Zielsequenz wurden zunächst verschiedene sgRNAs *in vitro* hergestellt. Diese sollten je einen vorderen und einen zentralen Schnitt in den Zielgenen, codierend für eine Cysteinprotease EhCP-A1 (siehe Abb. 4.7 A) und eine Metalloprotease EhMP8-2 (siehe Abb. 4.7 B), vermitteln. Des Weiteren wurde die Zielsequenz mittels PCR vervielfältigt, und in einen *in vitro Cleavage*-Assay zusammen mit der jeweiligen sgRNA und rekombinanter Cas9 eingesetzt.

Abbildung 4.7 C bestätigt die Funktionalität der beiden sgRNAs für die Schnitte in dem

EhCP-A1-codierenden Gen durch Analyse der Spaltprodukte in der Agarose-Gelelektrophorese. Auch das für die EhMP8-2-codierende Gen wurde an beiden Positionen erfolgreich mit den *in vitro* transkribierten sgRNAs und der Cas9 geschnitten (siehe Abb. 4.7 D).



Abbildung 4.7: sgRNA-induzierte Spaltung der Zielgene. (A, B) Schematische Darstellung der Zielgene mit ihren Schnittstellen und daraus resultierenden Spaltprodukten. (C, D) Zur Beurteilung ihrer Aktivität wurden *in vitro* transkribierte sgRNAs (50 ng) mit amplifizierter DNA (150 ng) ihrer Zielsequenzen sowie rekombinanter Cas9 (250 ng) 1 h bei 37°C inkubiert und die Spaltprodukte im 1,5 % igen Agarosegel analysiert.

Darüber hinaus wurde der *in vitro Cleavage*-Assay auch mit Lysaten der *cas9*^{co}-exprimierenden Trophozoiten (A1^{np} Cas9^{co}_ÜE und B2-5^p Cas9^{co}_ÜE) durchgeführt, um zu belegen, dass keine aktive Cas9 im Amöbenlysat vorliegt. Dazu wurde statt der rekombinanten Cas9 zunächst Lysat der *cas9*^{co}-exprimierenden Trophozoiten (A1^{np} Cas9^{co}_ÜE und B2-5^p Cas9^{co}_ÜE) in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt bis 1:100) in den Assay eingesetzt.

In Abbildung 4.8 A ist zu erkennen, dass der vordere Schnitt im *ehcp-a1-*Gen durch Inkubation der entsprechenden sgRNA und dem Amöbenlysat von den Transfektanten A1^{np} Cas9^{co}_ÜE in den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:100 und einer unverdünnten Probe nicht induziert wurde. Obwohl jeweils die gleiche Menge an PCR-Produkt (150 ng) aufgetragen wurde, ist die Bande bei dem unverdünnt eingesetzten Amöbenlysat deutlich schwächer als bei den verdünnten Lysaten. Die Kontroll-sgRNA vermittelte dagegen eine Spaltung des Kontrollfragments.

Des Weiteren wurde der Assay mit dem Lysat der Transfektanten B2-5^p Cas9^{co}_ÜE durchgeführt (siehe Abb. 4.8 B). Dieses wurde im Verhältnis 1:5 für alle vier möglichen Kombinationen eingesetzt, konnte jedoch keine Spaltung in der DNA der Zielsequenz induzieren. Als Positivkontrolle wurde die sgRNA für den mittigen Schnitt im EhMP8-2 codierenden Gen mit der rekombinanten Cas9 eingesetzt. Durch die daraus entstandenen Spaltprodukte kann ein allgemeiner Fehler im Assay ausgeschlossen werden.



Abbildung 4.8: Aktivitätstest *in vitro* transkribierter sgRNAs im *Cleavage*-Assay. Die *in vitro* transkribierten sgRNAs (50 ng) und amplifizierte DNA (150 ng) der Zielsequenzen wurde mit (A) Lysat der Transfektanten A1^{np} Cas9^{co}_ÜE in den Verdünnungen unverdünnt, 1:10, 1:50 und 1:100 und (B) mit 1:5 verdünntem Lysat der Transfektanten B2-5^p Cas9^{co}_ÜE 1 h bei 37°C inkubiert um die induzierte Spaltung in der DNA der Zielsequenz im 1,5 % igen Agarosegel zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* transkribierten sgRNAs ihr Zielgen mit Hilfe einer rekombinanten Cas9 schneiden, nicht jedoch mit Lysat von *cas9^{co}*-exprimierenden Tro-phozoiten.

In allen nachfolgenden Versuchen wurde lediglich die sgRNA verwendet, welche den vorderen Schnitt in dem *ehcp-a1-*Gen vermittelt.

4.3.3.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz und Lokalisation des RNP-Komplexes in dem transfizierten *E. histolytica Klon* B2-5^p

Da der RNP-Komplex andere physikalisch-chemische Eigenschaften besitzt als ein normalerweise zur Transfektion eingesetztes Plasmid und die Kosten für diesen Komplex sehr hoch sind, wurden zunächst unterschiedliche Transfektionsparameter verändert. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass durch die Transfektion der RNP-Komplex in die Zelle gelangt (siehe Abb. 4.9), jedoch konnte keine Kolokalisation mit dem Zellkern festgestellt werden. Für einen erfolgreichen Prozess des Schneidens ist es jedoch notwendig, dass der RNP-Komplex in den Zellkern gelangt in dem sich die Zielsequenz befindet.



Abbildung 4.9: Lokalisation des RNP-Komplexes in transfizierten *E. histolytica* Trophozoiten. Trophozoiten des Klons B2-5^p wurden mit dem RNP-Komplex transfiziert und mit Hoechst gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops durchgeführt und mittels ImageJ übereinander gelegt (Merge) um die Lokalisation des RNP-Komplexes innerhalb der Zelle zu bestimmen.

Da der RNP-Komplex nachweislich in die Zellen gelangte, wurde im Folgenden untersucht, wie sich die Transfektionseffizienz bei gleichzeitig hoher Anzahl vitaler Trophozoiten verbessern lässt. Die schonendste Transfektionsmethode für *E. histolytica* Trophozoiten stellt die für die Transfektion von Plasmid-DNA etablierte Methode dar. Hier werden ca. 500.000 Trophozoiten in einem Volumen von 800 µL in einer Küvette mit einer Spaltbreite von 0,4 cm 2 Stromstößen ausgesetzt werden. Von dem RNP-Komplex wurden nur wenige Mikroliter für die Transfektion (6-36 µL) eingesetzt.

4.3.3.2.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizenz wurde die zur Transfektion in die Trophozoiten des Klons B2-5^p eingesetzte Menge des RNP-Komplexes titriert. Die Endkonzentration der im RNP-Komplex enthaltenen Komponenten für eine Transfektion mit einfacher Menge beträgt 1,8 µM crRNA:tracrRNA, 1,5 µM Cas9 und 1,8 µM Cas9 Electroporation Enhancer, so dass insgesamt 5,1 µM RNP-Komplex für eine Transfektion eingesetzt wurden. Um die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der zur Transfektion eingesetzten Menge an RNP-Komplex zu untersuchen, wurde die Transfektion mit drei verschiedenen Konzentrationen des RNP-Komplexes (5,1 µM, 15,3 µM und 30,6 µM) durchgeführt. Als Tranfektionskontrolle dienten Trophozoiten, die lediglich mit 5,1 µM RNP-Komplex ohne Fluoreszenz-markierte tracrRNA (ATTO550) transfiziert wurden. Die Transfektionseffizienz der RNP-transfizierten Trophozoiten wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse am FACSAria II (BD Biosciences) bestimmt. Dabei wird die Fluoreszenz der Zellen mit einem Laser (531 nm) angeregt und im roten Kanal detektiert, welche aus der Aufnahme des RNP-Komplexes resultiert. In Abbildung 4.10 A ist die FACS-Analyse der RNP-transfizierten Trophozoiten dargestellt. Es ist eine deutliche Zunahme der rot fluoreszierenden Trophozoiten in Abhängigkeit der zur Transfektion eingesetzten Menge an RNP-Komplex (5,1 µM, 15,3 µM und 30,6 µM) erkennbar. Für die *Gating*-Strategie wurde der Bereich (*Gate*) der positiven Zellen definiert und auf die anderen Dotplots angewendet. Die Titration des RNP-Komplexes führt zu einer deutlichen Verlagerung der gesamten Amöbenpopulation in den rot fluoreszierenden Bereich nach Anregung durch einen Laser der Wellenlänge von 531 nm.

Abbildung 4.10 B zeigt die Verschiebung der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Menge an eingesetztem RNP-Komplex im Histogramm.

Der prozentuale Anteil an positiv transfizierten Trophozoiten ist in Abbildung 4.10 C dargestellt. Der Einsatz des RNP-Komplexes in einer Konzentration von 5,1 μ M führte bereits zu 10 % positiven Zellen. Die dreifache Menge des RNP-Komplexes (15,3 μ M) brachte 78,3 % positive Zellen hervor und die sechsfache Menge des RNP-Komplexes (30,6 μ M) erzielte eine Transfektionseffizienz von 97,5 %.



Abbildung 4.10: Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Titration des RNP-Komplexes mittels FACS. *E. histolytica* Trophozoiten des Klons B2-5^p wurden mit dem RNP-Komplex in Konzentrationen von 5,1 μ M, 15,3 μ M und 30,6 μ M transfiziert und die Zunahme der rot fluoreszierenden Trophozoiten mittels FACS analysiert. Als Kontrolle dienten Trophozoiten welche mit dem RNP-Komplex ohne fluoreszierende tracrRNA (5,1 μ M) transfiziert wurden. In (A) sind die Dotplots mit dem *Gate* für RNP-positive Zellen dargestellt. (B) Zeigt die Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten im Histogramm und (C) den prozentualen Anteil positiver Zellen innerhalb der Population.

Je mehr RNP-Komplex zur Transfektion eingesetzt wurde, desto weiter verschob sich im FACS die Zellpopulation in den rot fluoreszierenden Bereich, so dass durch die sechsfache Menge an eingesetztem RNP-Komplex (30,6 μ M) eine Transfektionseffizienz von annähernd 100 % erreicht wurde.

4.3.3.2.2 Mikroskopische Untersuchung der Transfektionseffizienz

Um die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zu verifizieren, wurden die transfizierten Trophozoiten zusätzlich im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt, so dass sie blaues Licht emittierten und eine Orientierung innerhalb der Zelle ermöglicht wurde. Die mikroskopischen Analysen wurden von Tina Wallaschkowski durchgeführt.

Für die mikroskopische Analyse standen zu wenig Transfektanten zur Verfügung, um eine quantitative Aussage über die Transfektionseffizienz zu treffen.

In Abbildung 4.11 sind daher exemplarisch 2 Zellen der einzelnen Gruppen dargestellt, die jedoch nicht die gesamte Population repräsentieren. Es sind jeweils die blauen Zellkerne zu erkennen, sowie kleine, Vesikel-ähnliche Bereiche mit einer roten Fluoreszenz. Die Kontrollgruppe, welche keinen fluoreszierenden Komplex enthielt, sowie die Trophozoiten welche mit dem RNP Komplex in der Konzentration 5,1 μ M transfiziert wurden, weisen keine rot fluoreszierende Bereiche auf (Abb. 4.11 A, B). Im Gegensatz dazu zeigen die Transfektanten, bei denen die dreifache bzw. sechsfache Menge an RNP-Komplex (15,3 μ M, 30,6 μ M) zur Transfektion eingesetzt wurde mehrere Areale mit roter Fluoreszenz (Abb. 4.11 C, D). Eine erhöhte Menge an zur Transfektion eingesetztem RNP-Komplex geht mit einer vermehrten Anzahl rot fluoreszierender Bezirke in den Transfektanten einher.



Abbildung 4.11: Analyse der RNP-Transfektanten im Fluoreszenzmikroskop. Exemplarische Darstellung der *E. histolytica* Klone B2-5^p die mit (A) dem RNP-Komplex ohne fluoreszierende tracrRNA, (B) 5,1 μ M, (C) 15,3 μ M und (D) 30,6 μ M des RNP-Komplexes transfiziert wurden. Die Bilder wurden am Fluoreszenzmikoskop einzeln aufgenommen und mit ImageJ übereinander gelegt. Bereiche mit erhöhter roter Fluoreszenz sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Anhand der mikroskopischen Studie konnte eine Korrelation zwischen der zur Transfektion eingesetzten Menge an RNP-Komplex und der Häufung an Bereichen mit roter Fluoreszenz innerhalb der Transfektanten gezeigt werden. Aufgrund der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden Transfektanten konnte die Transfektionseffizienz in Abhängigkeit der eingesetzten RNP-Menge mikroskopisch nicht bestimmt werden.

4.3.3.3 Nachweis einer Mutation durch CRISPR/Cas auf DNA-Ebene

Aus Kostengründen wurden nachfolgende Transfektionen für weitere Versuche mit einer RNP-Konzentration von 5,1 µM durchgeführt, so dass in der Zellpopulation mit ca. 10 % transfizierter Trophozoiten gerechnet werden kann. Diese haben den fluoreszierenden RNP-Komplex zwar aufgenommen, ob es dadurch auch zu einem Schnitt und resultierender Modifikation im *E. histolytica* Genom gekommen ist, gilt es nachfolgend zu untersuchen. Auf Grund der fehlenden Möglichkeit, die transfizierten Trophozoiten zu selektionieren, wurde die transfizierte Zellpopulation kloniert. Die dadurch entstandenen Klone stammten alle von je einer einzelnen Zelle ab und weisen ggf. nach erfolgtem Schnitt des Zielgens durch den RNP-Komplex dieselbe genetische Modifikation auf.

4.3.3.3.1 Mutationsnachweis mit dem Genome Editing Detection Kit

Um eine Mutation in CRISPR/Cas-behandelten Trophozoiten auf DNA-Ebene in dem *ehcp-a1*-Gen nachweisen zu können, wurde das *Genome Editing Detection* Kit von IDT verwendet. Dieses basiert auf der T7EI, welche inkongruente DNA-Heteroduplexe aus modifizierter und nativer Zielsequenz erkennt und spaltet. Die entstehenden Spaltprodukte können in der Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Untersucht wurden jeweils fünf Pools aus vier verschiedenen Klonen, aus denen die Zielsequenz amplifiziert und in den Assay eingesetzt wurde (siehe Abbildung 4.12). Damit sollte gewährleistet werden, dass es zur Bildung von inkongruenten DNA-Heteroduplexen kommen kann, da nicht in allen Klonen eine, bzw. dieselbe genetische Modifikation aufgetreten sein wird. Als Negativkontrolle diente die reine Wildtyp-DNA, welche keine Mutationen und damit auch keine Spaltprodukte im Agarosegel zeigte. Um die Funktionalität des Assays zu verifizieren, wurde die im Kit mitgelieferte Positivkontrolle verwendet, welche Spaltprodukte hervorbrachte. Bei den Pools der verschiedenen Klone der RNP-Transfektanten sind keine Spaltprodukte erkennbar, so dass mit diesem Assay keine, durch das CRISPR/Cas-System induzierten, Mutationen auf DNA-Ebene nachgewiesen werden konnten.



Abbildung 4.12: Analyse von Mutationen in RNP-Transfektanten auf DNA-Ebene. Aus den mit dem RNP-Komplex (5,1 μ M) transfizierten und klonierten Trophozoiten des Klons B2-5^p sowie der B2-5^p Stammkultur (Negativkontrolle) wurde die gDNA isoliert, das Zielgen (*ehcp-a1*) mittels PCR amplifiziert und als Pool aus vier Klonen in das *Genome Editing Detection* Kit eingesetzt. Im 1,5 % igen Agarosegel wurden die Banden im Vergleich zur Negativund Positivkontrolle analysiert.

Mit Hilfe des *Genome Editing Detection* Kit von IDT konnten auf DNA-Ebene keine Mutationen in den Transfektanten, welche mit nur 5,1 µM RNP-Komplex transfiziert wurden, detektiert werden. Diese zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse eine Transfektionseffizienz von ca. 10 %, so dass rechnerisch zwei Klone eine Modifikation zeigen könnten.

4.3.3.3.2 Mutationsnachweis durch DNA-Sequenzierung

Für den auf der T7EI-basierenden Assay wurden bereits falsch negative Ergebnisse beschrieben. Um sicherzustellen, dass der fehlende Nachweis einer eingefügten Mutation nicht auf die Verwendung des Kits zurückzuführen ist, wurden daher das Zielgen aus den einzelnen Klonen in einem Ansatz amplifiziert und sowohl direkt, als auch in den TOPO-Vektor ligiert und anschließend sequenziert. Durch die vergleichende Analyse der aus dem TOPO-Vektor sequenzierten und ursprünglichen Zielsequenz wurde ein Basenaustausch an Position sieben vor der PAM-Sequenz identifiziert (siehe Abb. 4.13 A). Dieser Austausch von Adenin zu Guanin resultiert in dem Einbau von Glycin statt Glutaminsäure an Position 82 der Aminosäuresequenz.

Der für die Klonierung in den TOPO-Vektor verwendete PCR-Ansatz wurde ebenfalls direkt sequenziert. Hier konnte jedoch keine Mutation nachgewiesen werden. Bei einer Mischung aus Amplifikaten, die sich ab einem Bereich um wenige Nukleotide vor der PAM-Sequenz unterscheiden, würde ab diesem Bereich ein verstärktes Hintergrundsignal bei der Sequenzierung auftreten. Dieses Phänomen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4.13 B).



Abbildung 4.13: Sequenzierung der Zielsequenz aus RNP-transfizierten *E. histolytica* Trophozoiten. Aus den Klonen der mit 5,1 µM RNP-Komplex transfizierten Trophozoiten des Klons B2-5^p wurde die gDNA isoliert und mittels PCR die Zielsequenz amplifiziert. Zur Analyse der Sequenz auf eingefügte Mutationen wurde das PCR-Produkt (A) in den TOPO-Vektor kloniert und (B) direkt sequenziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen aus den Klonen der RNP-transfizierten Trophozoiten wurden in den TOPO-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Darin wurde einen Basenaustausch nachgewiesen, aus dem der Einbau von Glycin statt Glutaminsäure in die Aminosäuresequenz resultiert. In dem direkt zur Sequenzierung eingesetzten PCR-Ansatz konnte jedoch weder eine Mutation, noch ein verstärktes Hintergrundsignal beginnend kurz vor der PAM-Sequenz detektiert werden.

4.3.3.4 Nachweis einer Mutation durch CRISPR/Cas auf Protein-Ebene

Da das Ergebnis der DNA-Analysen bezüglich CRISPR/Cas-vermittelter Mutationen auf DNA-Ebene nicht eindeutig war, wurden drei Klone weiter analysiert, die mit einer Konzentration von 5,1 µM des RNP-Komplexes transfiziert worden waren. Die Funktionalität des von der Zielsequenz codierten Proteins (Cysteinprotease, EhCP-A1) kann durch verschiedene Analysemöglichkeiten (Substratgel und Cysteinprotease-Assay) beurteilt werden. Durch den Funktionsverlust des codierten Proteins könnte die Inaktivierung des codierenden Gens im Rückschluss belegt werden.

4.3.3.4.1 Mutationsnachweis mittels Substratgelen

Zunächst wurden Lysate von drei Klonen der RNP-transfizierten Trophozoiten hergestellt und diese im Substratgel analysiert. Dabei werden die im Lysat befindlichen Cysteinproteasen aufgetrennt und verdauen die im Gel enthaltene Gelatine. Diese Bereiche können somit nicht mit Coomassie angefärbt werden und es entstehen weiße Aktivitätsbanden der einzelnen Cysteinproteasen (EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5 und EhCP-A7).

Das Substratgel (siehe Abb. 4.14 A) zeigt die Klone 1-3 der RNP-Transfektanten im Vergleich zur untransfizierten Stammkultur B2-5^p. In den Lysaten der RNP-transfizierten Klone 1 und 2 ist die Aktivitätsbande der EhCP-A1 nicht vorhanden, genauso wie die Aktivitätsbande der EhCP-A7. Die Aktivitätsbanden der anderen Cysteinproteasen (EhCP-A2 und EhCP-A5) sind hingegen erkennbar.

Die Lysate wurden bei -80°C gelagert und eine Woche später erneut in einem Substratgel untersucht (siehe Abb. 4.14 B). Dabei wurden in den Lysaten der drei RNP-transfizierten Klone, genauso wie im Lysat der untransfizierten Stammkultur, gleichermaßen die Aktivitätsbanden für alle Cysteinproteasen nachgewiesen.



Abbildung 4.14: Analyse der Lysate von klonierten RNP-transfizierten Trophozoiten im Substratgel. Lysate von drei Klonen RNP-transfizierter Trophozoiten wurden im Substratgel im Vergleich zur untransfizierten Stammkultur B2-5^p auf ihre Cysteinproteaseaktivität hin untersucht. (A) Frische Lysate (4 µg/Spur), direkt nach der Herstellung. (B) Dieselben Lysate (15 µg/Spur) nach einwöchiger Lagerung bei -80°C.

Im Lysat von zwei Klonen RNP-transfizierter Trophozoiten fehlte die Aktivitätsbande der EhCP-A1, dessen codierendes Gen mittels CRISPR/Cas mutiert werden sollte. Das Ergebnis konnte wenige Tage später mit denselben Lysaten die bei -80°C gelagert wurden jedoch nicht reproduziert werden.

4.3.3.4.2 Mutationsnachweis mittels Cysteinproteaseassay

Im Cysteinproteaseassay wird durch die im Amöbenlysat enthaltenen Cysteinproteasen ein Substrat (Z-Arg-Arg-pNA) umgesetzt, dessen zeitabhängiger Verlauf auf Grundlage eines Farbumschlags photometrisch gemessen werden kann.

Zwei der im Substratgel analysierten Klone (Klon 1 und Klon 2 zusammengefasst) der RNPtransfizierten Trophozoiten wurden zusätzlich im Cysteinproteaseassay untersucht (siehe Abb. 4.16). Dafür wurden zum einen frische Lysate verwendet, die direkt nach der RNP-Transfektion bzw. Klonierung der Transfektanten hergestellt wurden sowie Lysate derselben Klone nach dreiwöchiger Kultivierung. Als Positivkontrolle diente die untransfizierte Stammkultur B2-5^p. Für die untransfizierte Stammkultur konnte eine Cysteinproteaseaktivität von ca. 44 mU/mg detektiert werden. In den nach der Transfektion des RNP-Komplexes hergestellten Lysaten wurde eine signifikant (** $p \le 0,01$) reduzierte Cysteinproteaseaktivität von ca. 13 mU/mg gemessen. Nachdem die transfizierten und klonierten Trophozoiten drei Wochen lang kultiviert wurden, weisen die daraus hergestellten Lysate mit ca. 16 mU/mg ebenfalls eine signifikant (** $p \le 0,01$) reduzierte Aktivität der Cysteinproteasen auf.



Abbildung 4.15: Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität in Lysaten **RNP-transfizierten** Trophozoivon Cysteinproteaseassay. tenmittels Lysate von RNP-transfizierten Trophozoiten (B2-5^p RNP Klon 1 und Klon 2 zusammengefasst) wurden im Cysteinproteaseassay im Vergleich zu Lysaten der untransfizierten Stammkultur (B2-5^p) auf ihre Cysteinproteaseaktivität hin untersucht (Mittelwerte \pm Standardfehler, n=2 in Doppelbestimmung, unpaired Student's $t \ test, \ ^{**}p \leq 0,01$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die RNP-transfizierten Trophozoiten eine deutlich geringere Cysteinproteaseaktivität im Lysat aufweisen als die untransfizierte Stammkultur B2-5^p, wobei die dreiwöchige Kultivierung keinen Einfluss auf die Aktivität der im Lysat der Transfektanten enthaltenen Cysteinproteasen hat.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, das CRISPR/Cas System in *E. histolytica* zu etablieren, so dass für die weitere Charakterisierung der putativen Pathogenitätsfaktoren (ADH und EhMP8-2) daher die auf dem RNAi-basierenden Verfahren generierten Silencer verwendet wurden.

4.4 Charakterisierung der Metalloprotease

Die putative Metalloprotease EhMP8-2 wird in *E. histolytica* als möglicher Pathogenitätsfaktor beschrieben und korreliert negativ mit der Pathogenität des Parasiten, da die Überexpresison der *ehmp8-2* zu einer reduzierten Pathogenität der Transfektanten führte. Die Aktivität gegenüber einem bestimmten Substrat konnte für dieses Enzym noch nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit soll der Einfluss der Überexpression bzw. des Silencings der *ehmp8-2* auf die Transfektanten mittels verschiedener, etablierter Zellkultur-basierter Verfahren analysiert werden.

4.4.1 Charakterisierung phänotypischer Merkmale der Überexpressions- und Silencing-Transfektanten

Um den Einfluss der Überexpression bzw. des Silencings der *ehmp8-2* auf den Phänotyp der Überexpressions- und Silencing-Transfektanten zu untersuchen, wurden Größe, Beweglichkeit und Teilungsrate analysiert.

Zur Bestimmung der Größe und Beweglichkeit der *ehmp8*-2-überexprimierenden und -gesilencten Transfektanten sowie den jeweiligen Kontrollen wurden am Durchlichtmikroskop Bilder der Trophozoiten aufgenommen und mittels ImageJ ausgewertet.

Abbildung 4.16 A zeigt die Größe der Trophozoiten in μ m². Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen konnte kein signifikanter Einfluss der Überexpression oder des Silencings der *ehmp8-2* festgestellt werden. Grundsätzlich ist jedoch zu erkennen, dass die Trophozoiten die von dem pathogenen Klon B2-5^p abstammen größer sind (1026-1047 μ m²), als die Trophozoiten die von dem apathogenen Klon A1^{np} abstammen (741-753 μ m²).

Auch in Bezug auf die Motilität (siehe Abb. 4.16 B) führte die Überexpression bzw. das Silencing der *ehmp8-2* zu keinem signifikanten Unterschied der in 10 min zurückgelegten, akkumulierten Distanz in µm. Allgemein weisen die Trophozoiten die von dem pathogenen Klons B2-5^p abstammen eine stärkere Beweglichkeit auf (179-180 µm) als die aus dem apathogenen Klon A1^{np} generierten Trophozoiten (102-118 µm). Durch die Überexpression der *ehmp8-2* teilten sich die überexprimierenden Transfektanten mit 1,88 Teilungen innerhalb 24 h signifikant (**p≤0,01) schneller als ihre Kontrolle (1,62 Teilungen pro 24 h) wobei das Silencing der *ehmp8-2* die Proliferationsrate nicht beeinflusste (siehe Abb. 4.16 C).



Abbildung 4.16: Phänotypische Merkmale von *ehmp8-2-*überexprimierenden und -gesilencten *E. histolytica* Trophozoiten. $1x10^4$ *E. histolytica* Trophozoiten wurden in 25 mL Zellkulturflaschen gegeben und nach 48 h (A) Größe sowie (B) Beweglichkeit am Mikroskop und mittels ImageJ analysiert. (C) Die Teilungsrate wurde durch Auszählen der Trophozoiten am Mikroskop bestimmt (Mittelwerte±Standardfehler, n=3, unpaired Student's t test, ns=p>0,05, **p≤0,01).

Die Überexpression und das Silencing der *ehmp8-2* haben keinen Einfluss auf Größe und Beweglichkeit der *E. histolytica* Tranfektanten, jedoch teilen sich die *ehmp8-2*-überexprimierenden Trophozoiten signifikant schneller als ihre Kontrolle.

4.4.2 Generierung und Verifizierung von *ehmp8-1*-Silencern, *ehmp8-1/-2*-Doppelsilencern und gegenseitige Beeinflussung der Expression der *ehmp8-1*- und *ehmp8-2*-Gene

Durch das stabile Silencing der *ehmp8-2* in den Transfektanten A1^{np} 042870_Si in Abwesenheit des entsprechenden Silencing-Plasmids war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, ein neues Plasmid, welches das Silencing der *ehmp8-1* vermittelt, in die *ehmp8-2*-gesilencten Trophozoiten zu transfizieren und damit sogenannte Doppelsilencer (A1^{np} MP8-1/-2_Si) zu generieren. In diesen Doppel-Transfektanten sind somit beide Metalloproteasen (*ehmp8-1* und *ehmp8-2*) gesilenct. Des Weiteren wurde die *ehmp8-1* im pathogenen Klon B2-5^p (B2-5^p MP8-1_Si) und im apathogenen Klon A1^{np} (A1^{np} MP8-1_Si) gesilenct, um auch den Einfluss des *ehmp8-1*-Silencings auf die Transfektanten zu untersuchen.

Der Nachweis des Silencings der ehmp8-1 mittels qPCR zur entsprechenden, auf 1 normier-

ten Kontrolle ist in Abb. 4.17 A dargestellt. In den Silencing-Transfektanten A1^{np} MP8-1_Si liegt ein komplettes Silencing der *ehmp8-1* vor (*** $p \le 0,001$). In den Transfektanten A1^{np} MP8-2_Si wurde die Expression der *ehmp8-1* signifikant (** $p \le 0,01$) reduziert (0,48-fache Expression), es handelt sich dabei jedoch um ein unvollständiges Silencing. In den Doppelsilencern (A1^{np} MP8-1/-2_Si) wurde das Gen *ehmp8-1* signifikant (*** $p \le 0,0001$) gesilenct. Das signifikante Silencing (*** $p \le 0,0001$) der *ehmp8-1* in den Transfektanten B2-5^p MP8-1_Si konnte ebenfalls bestätigt werden.

In den oben genannten Transfektanten wurde ebenfalls der Einfluss des *ehmp8-1* Silencings auf die *ehmp8-2* Expression untersucht. Abbildung 4.17 B zeigt die relativen mRNA Konzentrationen des EhMP8-2-codierenden Gens in den untersuchten Trophozoiten im Vergleich zu den auf 1 normierten Kontrollen. Die Expression den Gens *ehmp8-2* in den Silencing-Transfektanten A1^{np} MP8-1_Si wurde durch das Silencing der *ehmp8-1* nicht beeinflusst. In den Transfektanten A1^{np} MP8-2_Si und A1^{np} MP8-1/-2_Si liegt ein komplettes Silencing (****p \leq 0,0001) der *ehmp8-2* vor. Das Silencing der *ehmp8-1* in den Transfektanten B2-5^p MP8-1_Si affektierte die Expression der *ehmp8-2* nicht.



Abbildung 4.17: mRNA-Expressionsprofil der *ehmp8-1* und *ehmp8-2* in *ehmp8-1*und *ehmp8-2*-Silencing-Transfektanten sowie *ehmp8-1/-2*-Doppelsilencern mittels **qPCR**. Aus den Trophozoiten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der qPCR mit SYBR Green eingesetzt um die relative mRNA Konzentration der (A) EhMP8-1 und (B) EhMP8-2 codierenden Gene in verschiedenen Transfektanten zu analysieren. Als Kalibrator diente Aktin und die Kontrollen wurden auf 1 normiert (Mittelwerte±Standardfehler, n=2-4 in Doppelbestimmung, *unpaired Student* 's t test, **p≤0,01, ***p≤0,001, ****p≤0,0001).

In den Transfektanten (A1^{np} MP8-1/-2_Si, A1^{np} MP8-1_Si und B2-5^p MP8-1_Si) bei denen die Expression des *ehmp8-1* Gens gesilenct werden sollte, konnte dies bestätigt werden. Darüber hinaus wird aus den oben dargestellten Ergebnissen deutlich, dass das Silencing der *ehmp8-1* auch die Expression der *ehmp8-2* reduziert. Das Silencing der *ehmp8-2* beeinflusst dagegen die Expression der *ehmp8-1* nicht.

4.4.3 Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität

Die Cysteinproteasen von *E. histolytica* stellen einen wichtigen Virulenzfaktor des Parasiten dar und sind maßgeblich an der ALA-Bildung beteiligt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Überexpression bzw. des Silencings der Metalloproteasen auf diese Proteasefamilie untersucht. Dafür wurden von den *ehmp8-2*-überexprimierenden und -gesilencten Trophozoiten, sowie den Doppelsilencern A1^{np} MP8-1/-2_Si und den jeweiligen Kontrollen Lysate hergestellt. Diese wurden in lösliche und unlösliche Fraktion unterteilt, da die Lokalisation der EhMP8-2 auf Grund ihres Signalpeptids in der Membranfraktion vermutet wird.

Abbildung 4.18 ist zu entnehmen, dass die Cysteinproteaseaktivität sowohl in der löslichen (52 mU/mg), als auch in der unlöslichen (120 mU/mg) Fraktion des Lysates von *ehmp8-2-*überexprimierenden Trophozoiten im Vergleich zur Kontrolle (18 mU/mg bzw. 90 mU/mg) signifikant (* $p \le 0,05$, **** $p \le 0,0001$) erhöht ist.

Das Silencing der *ehmp8-2* führte im Vergleich zur Stammkultur A1^{np} (1,7 mU/mg bzw. 36 mU/mg) zu einer signifikanten (*p \leq 0,05) Reduktion der Cysteinproteaseaktivität in der unlöslichen Fraktion (23 mU/mg), wohingegen die Aktivität der Cysteinproteasen in der löslichen Fraktion des Lysates der Transfektanten A1^{np} MP8-1_Si nicht beeinflusst wurde (2,2 mU/mg).

Die Trophozoiten, in denen beide Metalloproteasen gesilenct vorliegen (A1^{np} MP8-1/-2_Si) zeigten eine signifikant (**p \leq 0,01) erhöhte Cysteinproteaseaktivität in der löslichen Fraktion (8,8 mU/mg), aber keinen Unterschied in der unlöslichen Fraktion (34 mU/mg) des Lysats, verglichen mit der Cysteinproteaseaktivität im Lysat der Stammkultur A1^{np} (1,7 mU/mg bzw. 36 mU/mg).



Abbildung 4.18: Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität von *ehmp8-2*überexprimierenden und -gesilencten *E. histolytica* Trophozoiten sowie von *ehmp8-1/-2*-Doppelsilencern. Zur löslichen und unlöslichen Fraktion der Amöbenlysate (unverdünnt, 1:10) wurde das Substrat Z-Arg-Arg-pNA gegeben, die Änderung der Extinktion über 20 min photometrische bei 450 nm gemessen und die Volumenaktivität berechnet. In Bezug auf die mittels BCA-Assay bestimmte Proteinkonzentration der Lysate ergab sich die spezifische Aktivität (Mittelwert±Standardfehler, n=3 in Doppelbestimmung, *unpaired Student's t test*, ns=p>0,05, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ****p \leq 0,0001).

Wie die Daten belegen hatte die Überexpression bzw. das Silencing der Metalloproteasen einen signifikanten Einfluss auf die Cysteinproteaseaktivität in den löslichen und unlöslichen Fraktionen von Amöbenlysaten.

4.4.4 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Zur Beurteilung des Einflusses einer gesteigerten oder reduzierten Expression der beiden Metalloproteasen-Gene auf die hämolytische Aktivität der Transfektanten wurden diese in einem Hämolyseassay untersucht.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.19 dargestellt. Die Überexpression der *ehmp8-2* in B2-5^p führte zu einer signifikant (** $p \le 0,01$) verstärkten Hämolyse durch die Transfektanten (3,5 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,85 %). Jeweils verglichen mit der Stammkultur A1^{np} (3,7 %) führte das alleinige Silencing der *ehmp8-1* zu einer signifikanten (** $p \le 0,01$) Reduktion der hämolytischen Aktivität (2,2 %), und auch das alleinige Silencing der *ehmp8-2* reduzierte die hämolytischen Aktivität der Transfektanten (3,1 %). In den Doppelsilencern (A1^{np} MP8-1/-2_Si), in denen keine der beiden Metalloprotease aktiv vorliegt, wurde ebenfalls eine signifikant (**** $p \le 0,0001$) reduzierte hämolytische Aktivität gemessen (2,2 %).

Die Trophozoiten des pathogenen Klons B2-5^p weisen bereits eine sehr geringe hämolyti-

sche Aktivität auf, so dass ein reduzierender Einfluss des *ehmp8-1-*Silencings auf die hämolytische Aktivität dieser Silencing-Transfektanten nicht messbar war.



Abbildung 4.19: Bestimmung der hämolytischen Aktivität von *ehmp8-1-* und *ehmp8-2-*Silencing- und Überexpressions-Transfektanten sowie von *ehmp8-1/-2-*Doppelsilencern. Inkubation von $1,25 \times 10^5$ Trophozoiten mit $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten für 1 h bei 37°C. Die hämolytische Aktivität der Trophozoiten wurde photometrisch bei 530 nm gemessen und im Vergleich zu 100-/0- % iger Hämolyse berechnet (Mittelwert±Standardfehler, n=3-12 in Vierfachbestimmung, *unpaired Student* 's t test, ns=p>0,05, **p $\leq 0,01$, ***p $\leq 0,001$).

Das Silencing der Metalloproteasen-codierenden Gene führte in den Trophozoiten des Klons A1^{np} zu einer signifikanten Reduktion der hämolytischen Aktivität. Die Überexpression der *ehmp8-2* im Klon B2-5^p rief eine signifikant erhöhte hämolytische Aktivität dieser Transfektanten hervor. Das Silencing der *ehmp8-1* im Klon B2-5^p führte zu keiner messbar veränderten hämolytischen Aktivität der Transfektanten.

4.4.5 Bestimmung der Erythrophagozytose

Da die Abwesenheit der Metalloproteasen die Fähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten reduziert, Erythrozyten zu lysieren, wurde nachfolgend untersucht, ob die Überexpression bzw. das Silencing der Metalloproteasen auch einen Einfluss auf die Fähigkeit der Trophozoiten zur Phagozytose von Erythrozyten hat. Dafür wurde der Erythrophagozytose-Assay durchgeführt, der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle als 100 % definiert und die gemessenen OD_{405 nm}-Werte in Relation dazu gesetzt.

Wie in Abbildung 4.20 dargestellt, phagozytierten jedoch lediglich die *ehmp8-1*-gesilencten Trophozoiten (A1^{np} MP8-1_Si) im Vergleich zur Stammkultur A1^{np} signifikant (* $p \le 0,05$) mehr Erythrozyten (138 %).



Abbildung 4.20: Bestimmung der Erythrophagozytose durch *ehmp8-1-* und *ehmp8-2-*Silencing- und Überexpressions-Transfektanten sowie durch *ehmp8-1/-*2-Doppelsilencer. $2x10^5$ Trophozoiten wurden mit $2x10^8$ Erythrozyten für 30 min bei 37°C inkubiert und die Erythrophagozytose photometrisch bei 405 nm gemessen. Die prozentuale Erythrophagozytose der Trophozoiten wurde jeweils in Relation zu der als 100 % definierten Kontrolle berechnet (Mittelwert±Standardfehler, n=3-8 in Doppelbestimmung, *unpaired Student* 's t test, *p \leq 0,05).

Wie aus der obigen Abbildung zu entnehmen, rief nur das Silencing der *ehmp8-1* einen Einfluss auf die Erythrophagozytose durch *E. histolytica* Trophozoiten hervor, indem es ihre Fähigkeit dazu verstärkte.

4.4.6 Bestimmung der Lyse und Phagozytose von THP1-Zellen

Zur Bestimmung, ob die Metalloprotease EhMP8-2 nur einen Effekt auf die hämolytische Aktivität von *E. histolytica* zeigt, oder auch die Lyse kernhaltiger Zellen beeinflusst, wurden die Transfektanten (B2-5^p MP8-2_ÜE und A1^{np} MP8-2_Si) mit Methylenblau-Färbelösung nach Löffler gefärbten THP1-Zellen inkubiert. Die in den Überstand abgegebene Farbe wurde photometrisch gemessen, der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle als 100 % definiert und die prozentuale lytische Aktivität in Bezug darauf berechnet.

Aus Abbildung 4.21 ist ersichtlich, dass die beiden untersuchten Transfektanten B2-5^p MP8-2_ÜE und A1^{np} MP8-2_Si in gleichem Maße THP1-Zellen lysieren wie die entsprechenden Kontrollen. Die mitgeführte Negativkontrolle (Inkubation mit NaPBS statt Trophozoiten) führte zu einer vergleichbaren, gemessenen OD_{660 nm}, so dass generell keine Lyse von THP1-Zellen in diesem Assay beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Da die THP1-Zellen von *E. histolytica* Trophozoiten nicht lysiert wurden, wurde nachfolgend geprüft, ob sie stattdessen von den Amöben phagozytiert werden.



Bestimmung Abbildung 4.21: der lytischen Aktivität ehmp8-2von überexprimierenden und -gesilencten E. histolytica Trophozoiten gegenüber **THP1-Zellen.** $2x10^6$ mit Methylenblau-Färbelösung nach Löffler gefärbte THP1-Zellen wurden mit 1×10^5 Trophozoiten für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde photometrische bei 450 nm gemessen und die prozentuale lytische Aktivität der Trophozoiten in Relation zu der jeweils als 100 % definierten Kontrolle berechnet (Mittelwert \pm Standardfehler, n=2 in Doppelbestimmung, unpaired Student's t test).

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Phagozytose von THP1-Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten, welche die *ehmp8*-2-überexprimieren, bzw. silencen oder beide Metalloproteasen silencen, wurden die Trophozoiten und THP1-Zellen jeweils mit einem unterschiedlich Zellfarbstoff gefärbt, zusammen inkubiert und durchflusszytometrisch im Vergleich zur Kontrolle analysiert.

Abbildung 4.22 A zeigt exemplarisch die grün-gefärbten Amöben und die rot-gefärbten THP1 Zellen, um die erfolgreiche Färbung zu bestätigen.

In Abbildung 4.22 B sind die Dotplots von gefärbten und ungefärbten THP1-Zellen und Trophozoiten dargestellt (obere Reihe), sowie exemplarisch der Zeitverlauf über eine 30minütige, gemeinsame Inkubation von THP1-Zellen und Amöben bei 37°C (untere Reihe). Die Population der THP1-Zellen verlagert sich durch die Färbung nach oben, in den Bereich roter Zellen. Die Amöben-Population verschiebt sich durch die grün-Färbung deutlich nach links in den 3. Quadranten. Trotz Färbung der Amöben ist eine kleinere Population im 4. Quadranten verblieben. Die Dotplots in denen Amöben und THP1-Zellen aufgenommen wurden, zeigen eine große Population der gefärbten THP1-Zellen im 1. Quadranten. Da deutlich weniger Amöben in den Assay eingesetzt wurden (3 THP1-Zellen auf 1 Amöbe), ist die Amöben-Population im Quadranten 3 deutlich kleiner. Mit zunehmender Inkubationszeit verlagert sich diese immer mehr nach oben, in den Bereich doppelt positiver Zellen. Dabei handelt es sich um Amöben, die den roten Farbstoff der THP1-Zellen aufgenommen haben.

Die Auswertung der doppelt positiven Zellen ist in Abbildung 4.22 C dargestellt. Alle untersuchten Amöben zeigten mit zunehmender Zeit eine stärkere rote Fluoreszenz, wobei die vom Klon B2^p abgeleiteten Trophozoiten eine deutlich geringere Zunahme an roter Fluoreszenz verzeichnen, als die von dem Klon A1^{np} abstammenden Trophozoiten. Die Transfektanten mit dem gesilencten EhMP8-2 codierend Gen zeigten einen nach unten versetzten Kurvenverlauf im Vergleich zur Kontrolle A1^{np}, welche nahezu identisch verläuft wie die Kurve der Doppelsilencer, die keine der beiden Metalloproteasen mehr exprimieren. Bei dem Unterschied handelt es sich jedoch lediglich um eine Tendenz, die nicht signifikant ist.



Abbildung 4.22: Bestimmung der Phagozytose gefärbter THP1-Zellen durch *ehmp8-2-*überexprimierende und -gesilencte *E. histolytica* Trophozoiten sowie durch *ehmp8-1/-2*-Doppelsilencer mittels FACS. (A) THP1-Zellen wurden einer roten, und Trophozoiten einer grünen Färbung unterzogen und diese am Fluoreszenzmikroskop verifiziert. (B) 7,5x10⁵ rot-gefärbte (1:320 Verdünnung des Farbstoffs CMTPX) THP1-Zellen wurden zu 2,5x10⁵ grün-gefärbten (1:200 Verdünnung des Farbstoffs CMFDA) Trophozoiten gegeben und diese am FACS nach 0, 15 und 30 min bei 37°C analysiert. Als Kontrolle und zum Definieren des *Gates* wurden gefärbt und ungefärbte THP1-Zellen und Trophozoiten eingesetzt. (C) Zunahme der doppelt positiven Zellen im 4. Quadranten der Dotplots mit zunehmender Zeit. (Mittelwert±Standardfehler, n=3, unpaired Student's t test).

Es konnte gezeigt werden, dass THP1-Zellen generell nicht durch *E. histolytica* Trophozoiten lysiert wurden und die *ehmp8*-2-überexprimierenden und -gesilencten Trophozoiten auch keinen Unterschied zu ihren Kontrollen in der Fähigkeit THP1-Zellen zu lysieren auswiesen.

Die Daten der durchflusszytometrischen Analyse zeigen, dass den Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 keine signifikante Auswirkung auf die Phagozytose von THP1-Zellen zugesprochen werden kann.

4.5 Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase

Die ADH stellt ebenfalls einen Faktor in *E. histolytica* dar, der in inverser Korrelation mit der Pathogenität des Parasiten steht. In dieser Arbeit sollen weitere Faktoren identifiziert werden, auf die eine Überexpression bzw. das Silencing der *adh* Einfluss nimmt, um diese ADH näher zu charakterisieren.

4.5.1 Charakterisierung phänotypischer Merkmale der Überexpressions- und Silencing-Transfektanten

Zunächst wurden die phänotypischen Parameter Größe, Beweglichkeit sowie die Teilungsrate von *E. histolytica* Transfektanten bestimmt, in denen das ADH-codierende Gen überexprimiert (B2^p ADH_ÜE) bzw. gesilenct (B8^{np} ADH_ÜE) ist.

Die Größe und Beweglichkeit der Trophozoiten wurde am Durchlichtmikroskop und mittels ImageJ bestimmt.

Die Überexpression der *adh* in B2^p zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss in Bezug auf die Größe der Trophozoiten (siehe Abb. 4.23 A), wohingegen das Silencing der *adh* in B8^{np} zu signifikant (**p \leq 0,01) größeren Trophozoiten (976 µm²) im Vergleich zur Kontrolle (896 µm²) führte. Allgemein sind die aus dem pathogenen Klon B2^p abstammenden Amöben jedoch größer (1046-1083 µm²) als die Trophozoiten der Stammkultur B8^{np} und der Silencer B8^{np} ADH_Si.

Aus Abbildung 4.23 B wird ersichtlich, dass die Motilität der *adh*-überexprimierenden Trophozoiten tendenziell gesteigert wurde. Im Gegensatz dazu legten die Trophozoiten (B8^{np} ADH_ÜE) in denen die *adh* gesilenct ist (342 µm) ebenfalls eine weitere Distanz in 10 min zurück als die Stammkultur B8^{np} (270 µm). Grundsätzlich wiesen die Trophozoiten aus dem Ursprungsklon B8^{np} eine stärkere Beweglichkeit auf, als die aus dem Klon B2^{np} abgeleiteten Trophozoiten.

Die Teilungsrate der Transfektanten gegenüber ihren Kontrollen (siehe Abb. 4.23 C) wurde durch die Überexpression bzw. das Silencing der *adh* nicht beeinflusst.



Abbildung 4.23: Phänotypische Merkmale von *adh*-überexprimierenden und -gesilencten *E. histolytica* Trophozoiten. $1x10^4$ *E. histolytica* Trophozoiten wurden in 25 mL Zellkulturflaschen gegeben und nach 48 h (A) Größe sowie (B) Beweglichkeit am Mikroskop und mittels ImageJ analysiert. (C) Die Teilungsrate wurde durch Auszählen der Trophozoiten am Mikroskop bestimmt (Mittelwerte±Standardfehler, n=3-4, unpaired Student's t test, ns=p>0,05, ** $p\leq0,01$).

Nur das Silencing der *adh* wirkt sich auf die Größe sowie die Beweglichkeit der Transfektanten (B8^{np} ADH_Si) aus. Auf die Proliferation der Transfektanten hatte weder die Überexpression noch das Silencing der *adh* einen Einfluss.

4.5.2 Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität

Im Folgenden wurde der Einfluss der *adh*-Überexpression bzw. des -Silencings auf Pathogenitätsindikatoren wie die Aktivität der Cysteinproteasen analysiert. Dafür wurden von den zu untersuchenden Transfektanten und den Kontrollen Lysate hergestellt und im Cysteinproteaseassay eingesetzt (siehe Abb. 4.24). Die Überexpression der *adh* in B2^p wirkte sich nicht auf die Cysteinproteaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle aus. Das Silencing der *adh* in B8^{np} führte im Vergleich zur Stammkultur B8^p (50 mU/mg) dagegen zu einer signifikant (**p≤0,01) geringeren Aktivität der Cysteinproteasen (34 mU/mg).



Abbildung 4.24: Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität adhin Überexpressions--Silencingund Transfektanten. Zum Amöbenlysat (unverdünnt, 1:5, 1:10) wurde das Substrat Z-Arg-Arg-pNA gegeben, die Änderung der Extinktion über 20 min photometrisch bei 450 nm gemessen und die Volumenaktivität berechnet. In Bezug auf die mittels BCA-Assay bestimmte Proteinkonzentration ergab sich die spezifische Aktivität $(Mittelwert \pm Standardfehler, n=2 in Dop$ pelbestimmung, unpaired Student's t test, $ns=p>0.05, **p\leq0.01$).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich nur das Silencing der *adh* auf die Cysteinproteasen auswirkte, indem es zu einer verminderten Cysteinproteaseaktivität in dem Lysat der Silencing-Transfektanten führte.

4.5.3 Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Erythrophagozytose

Die hämolytische Aktivität von *E. histolytica* Trophozoiten stellt ebenfalls einen wichtigen Faktor in Bezug auf ihre Pathogenität dar, so dass der Einfluss von verstärkter und inhibierter Expression der *adh* auf diesen Parameter untersucht wurde.

Wie in Abbildung 4.25 A zu erkennen, führte weder die Überexpression, noch das Silencing der *adh* zu einem Effekt auf die hämolytische Aktivität der Transfektanten (B2^p ADH_ÜE und B8^{np} ADH_ÜE) verglichen mit der jeweiligen Kontrolle. Allgemein konnte in den aus dem Klon B2^p abgeleiteten Trophozoiten einer höhere hämolytische Aktivität (ca. 4 %) gemessen werden als in den aus dem Klon B8^{np} stammenden Zellen (0-1 %).

Da kein Einfluss der *adh*-Expression auf die hämolytische Aktivität der Transfektanten nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob die Expression der *adh* die Phagozytose von Erythrozyten durch die *E. histolytica* Transfektanten verstärkt oder abschwächt (siehe Abb. 4.25 B). Weder die Überexpression, noch das Silencing der *adh* wirkten sich auf die Fähigkeit von Trophozoiten aus, Erythrozyten zu phagozytieren.



Abbildung 4.25: Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Erythrophagozytose von *adh*-Überexpressions- und -Silencing-Transfektanten. (A) Inkubation von $1,25 \times 10^5$ Trophozoiten mit $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten für 1 h bei 37°C. Die hämolytische Aktivität der Transfektanten wurde photometrisch bei 530 nm gemessen und im Vergleich zu 100-/0-% iger Hämolyse berechnet. n=3 in Vierfachbestimmung. (B) 2×10^5 Trophozoiten wurden mit 2×10^8 Erythrozyten für 30 min bei 37°C inkubiert und die Erythrophagozytose durch die Transfektanten photometrisch bei 405 nm gemessen. Die prozentuale Erythrophagozytose wurde jeweils in Relation zu der als 100 % definierten Kontrolle berechnet. n=3 in Doppelbestimmung. (Mittelwert±Standardfehler, *unpaired Student 's t test*, ns=p>0,05).

Weder durch die Überexpression, noch durch das Silencing der *adh* kam es zu einer veränderten Fähigkeit der Transfektanten (B2^p ADH_ÜE und B8^{np} ADH_Si), Erythrozyten zu lysieren oder zu phagozytieren.

4.5.4 Lokalisation der ADH mittels Westernblot

Zur Bestimmung der Lokalisation der ADH in der Zelle wurde eine lösliche Fraktion (LF) die mehrheitlich cytosolische Proteine beinhaltet und eine unlöslichen Fraktion (UF), in welcher Membranproteine enthalten sind, aus adh-überexprimierenden Transfektanten (B2^p ADH_ÜE), sowie Plasmid-transfizierten Kontrolle Transfektanten (B2^{np} pNC) im Westernblot mittels spezifischen Antikörpern analysiert. Dieser sowie die mit Coomassie gefärbte Ladekontrolle sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Das Protein der ADH auf Höhe von ca. 42 kDa ist im Lysat der untransfizierten Stammkultur B2-5^p (keine Unterteilung in Fraktionen), sowie in den löslichen Fraktionen des Lysates der adh-überexprimierenden Transfektanten und der Kontrolle erkennbar. Zusätzlich sind in der Spur zwei weitere Banden auf Höhe von ca. 34 und 20 kDa sichtbar. Während sich die Bandenintensität zwischen der Stammkultur B2-5^p und der Kontrolle B2^p pNC nicht unterscheidet, zeigen die Proteinbanden in der löslichen Fraktion der adh-überexprimierenden Trophozoiten ein deutlich stärkeres Signal als die Kontrollen. Auf der Ladekontrolle hingegen ist eine gleichmäßige Proteinauftragung zu erkennen. In der unlöslichen Fraktion des Lysates der adhüberexprimierenden Transfektanten konnte die ADH nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, in der unlöslichen Fraktion des Lysates der Kontrolle (B2^p pNC) konnte dagegen keine Bande detektiert werden.



Abbildung 4.26: Gegenüberstellung der löslichen und unlöslichen Fraktion adh-überexprimierenden Lysat von Trophozoiten Westernblot \mathbf{im} mit Coomassie-gefärbter Ladekontrolle. Zur Lokalisation der ADH im Lysat von adh-überexprimierenden Trophozoiten sowie der Kontrolle wurde dieses in lösliche (LF) und unlösliche Fraktion (UF) unterteilt und je 12 µg pro Spur auf ein 13 % iges SDS Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte im Westernblot. 1. Antikörper anti-ADH (Verdünnung 1:400), 2. Antikörper anti-Maus (Verdünnung 1:10.000). Die Coomassie-Färbung diente als Ladekontrolle.

Die ADH konnte in den löslichen Fraktionen der untersuchten Amöbenlysate nachgewiesen werden, wobei sie verstärkt in der löslichen Fraktion des Lysates der *adh*-überexprimierenden Trophozoiten detektiert wurde. Auch in der unlöslichen Fraktion des Lysates *adh*-überexprimierender Trophozoiten konnten sehr schwache Banden gezeigt werden, wohingegen in der unlöslichen Fraktion des Lysates der Kontrollgruppe keine Banden erkennbar waren.

4.5.5 Lokalisation der ADH mittels Immunfluoreszenz über einen Myc-*Tag* sowie Immunserum

Die Lokalisation der ADH wurde im Rahmen der Masterarbeit von Dirk Lercher gemeinsam untersucht. Dafür wurde ein Myc-Tag an das Protein fusioniert, der mittels spezifischer, gegen den Myc-Tag gerichteten Antikörper detektiert und im Anschluss mit einfacher Fluoreszenzmikroskopie oder konfokaler Laser-Scanning-Mikroskop lokalisiert werden kann. Abbildung 4.27 zeigt eine Übersicht verschiedener Trophozoiten (A1^{np} ADH-MYC_ÜE) die jeweils mit einem Fluoreszenzmikroskop (FM) oder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (confocal laser scanning microscope, CLSM) aufgenommen wurden. Diese wurden zur besseren Orientierung innerhalb der Zelle übereinander gelegt (Merge). Es wurden je zwei Fraktionen verglichen. Die Fraktionen ohne Saponin (-) ermöglichen Lokalisationen auf der Zellmembran, wohingegen die Trophozoiten der Fraktionen mit Saponin (+) eine für den Antikörper durchlässige Zellmembran besitzen, so dass dieser an Ziele innerhalb der Zelle binden kann. Die ADH konnte in der Fraktion ohne Saponin punktförmig verteilt nachgewiesen werden, wobei in der Fraktion mit Saponin das spezifische Signal im gesamten Zytoplasma erkennbar war. Dabei trat das Signal im Bereich der Zellmembran verstärkt auf. Aussparungen der grünen Fluoreszenz im CLSM deuten auf signal-negative Vakuolen hin.



Abbildung 4.27: Mikroskopische Analyse der Transfektanten A1^{np} ADH-MYC_ÜE zur Lokalisation der ADH mit dem anti-Myc Antikörper. Die Transfektanten A1^{np} ADH-MYC_ÜE wurden in eine Fraktion mit und ohne Saponin (+/-) unterteilt und mit dem anti-Myc Antikörper (Verdünnung 1:200), mit Hoechst (Verdünnung 1:400) gefärbt. Von jeder Fraktion wurden Bilder von je zwei Trophozoiten im Fluoreszezmikroskop (FM) und im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) aufgenommen und übereinander gelagert (Merge).

Um das Fusionsprotein ADH-MYC in der dreidimensionalen Zelle mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie lokalisieren zu können, wurden 42 Schnitte (*slices*) des Trophozoiten A1^{np} ADH-MYC_ÜE am CLSM aufgenommen. Da dessen Zellmembran nicht mit Saponin permeabilisiert wurde, ermöglicht es eine genaue Lokalisation der ADH auf der Membran. Abbildung 4.28 zeigt schematisch wie die Fluoreszenz auf verschiedenen Ebenen der Zelle mit einem Laser angeregt wurde. Nebenstehend sind vier Bilder vom oberen und unteren Bereich der Zelle dargestellt. Die jeweilige Nummerierung der einzelnen Bilder entspricht der jeweils betrachteten Schnittnummer.



Abbildung 4.28: Konfokale-Laser-Scanning Mikroskopie der Transfektanten A1^{np} ADH-MYC_ÜE zur Lokalisation der ADH auf der Zellmembran. Schematische Visualisierung der Funktionsweise eines CLSM und Darstellung von 4 Schnitten eines nicht permeabilisierten Trophozoiten A1^{np} ADH-MYC_ÜE zur exakten, dreidimensionalen Darstellung des Fusionsproteins ADH-MYC auf der Zelloberfläche.

Das Fusionsprotein ADH-MCY konnte mit einem gegen den Myc-*Tag* gerichteten Antikörper sowohl auf der Plasmamembran in punktueller, clusterartigen Anordnung lokalisiert werden, als auch ubiquitär im Cytoplasma des Trophozoiten. Dabei waren Vakuolenassoziierte Aussparungen, sowie ein verstärktes Signal in Zellmembran-nahen Bereichen erkennbar.

Im Rahmen der Masterarbeit von Tina Wallaschkowski wurde die Lokalisation der ADH ebenfalls mit einem spezifischen Antikörper (Immunserum) am Fluoreszenzmikroskop untersucht und die aufgenommenen Bilder übereinander gelegt (siehe Abb. 4.29). Dafür wurden die *adh*-überexprimierenden Trophozoiten (B2^p ADH_ÜE) sowohl mit dem spezifischen Antikörper, als auch mit dem Präimmunserum jeweils mit und ohne Saponin analysiert. Durch Inkubation mit dem Präimmunserum konnte kein Signal im roten Kanal detektiert werden. Mit dem spezifischen Antikörper konnte die ADH in der Fraktion ohne Saponin als Cluster auf der Zellmembran der *adh*-überexprimierenden Transfektanten visualisiert werden. Bei Verwendung von Saponin konnten die Antikörper in die Zelle gelangen, was zu einer relativ gleichmäßigen Färbung des Zytoplasmas führte. Lediglich der Zellkern weist keine rötliche Färbung auf.



Abbildung 4.29: Mikroskopische Analyse der Transfektanten B2^p ADH ÜE zur Lokalisation der ADH mit spezifischen Antikörpern (Immunserum) im Vergleich zum Präimmunserum. Die *adh*-überexprimierenden Trophozoiten wurden in eine Fraktion mit und ohne Saponin (+/-) unterteilt und jeweils mit dem 1. Antikörper anti-ADH (Verdünnung 1:200), oder dem Präimmunserum (Verdünnung 1:200) als Kontrolle, sowie mit Hoechst (Verdünnung 1:100) gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop (FM) wurden die Bilder aufgenommen und übereinander gelagert (Merge).

Auch mit dem spezifischen Antikörper gegen die ADH konnte diese auf der Zellmembran der *adh*-überexprimierenden Transfektanten in einzelnen Arealen lokalisiert werden. Bei einer permeablen Zellmembran zeigte das Zytoplasma eine umfangreiche, relativ einheitliche Färbung. Die Inkubation mit dem Präimmunserum führte zu keiner roten Fluoreszenz in oder auf den *adh*-überexprimierenden Transfektanten.

4.5.6 Bestimmung der Toleranz gegenüber Formaldehyd

In der Masterarbeit von Constantin König konnte die Aktivität der ADH gegenüber Formaldehyd in Anwesenheit von NADH nachgewiesen werden, wobei die potentielle Rückreaktion des Aldehyds zu seinem Alkoholpartner in Anwesenheit von NAD⁺ nicht bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde im Lysat der Transfektanten, in denen die *adh*-Expression gesilenct ist (B8^{np} ADH_Si) eine signifikant geringere Aktivität als im Lysat der Stammkultur (B8^{np}) gemessen. Die Überexpression der *adh* zeigte dagegen keinen Einfluss auf die im Lysat der Transfektanten gemessene Aktivität gegenüber Formaldehyd.

Daraufhin wurde die Toleranz der lebenden Trophozoiten, welche die *adh* überexprimieren (B2^p ADH_ÜE) gegenüber Formaldehyd untersucht. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen (0 %-0,01 %) Formaldehyd dem Medium der Amöben zugesetzt und die Teilungsrate pro Tag (24 h) im Vergleich zur Kontrolle bestimmt.

Abbildung 4.30 A stellt die Plasmid-transfizierten Kontrolle (B2^p pNC) dar, bei denen es bereits bei einer Konzentration von 0,001 % Formaldehyd zu einer signifikant geringeren Teilungsrate (1,6 Teilungen in 24 h) kommt im Vergleich zu den Trophozoiten die sich in Formaldehyd-freiem Medium befinden (1,8 Teilungen in 24 h). Ab 0,005 % Formaldehyd ist kein Wachstum der Trophozoiten B2^p pNC mehr möglich.

Die Überexpression der *adh* führt dagegen dazu, dass die Transfektanten (B2^p ADH_ÜE) bei einer Konzentration von 0,001 % Formaldehyd im Medium keine verminderte Teilungsrate zeigen (Abb. 4.30 B). Unter Anwesenheit von 0,005 % Formaldehyd im Medium können noch 50 % der *adh*-überexprimierenden Trophozoiten wachsen.



Abbildung 4.30: Bestimmung der Toleranz von *adh*-überexprimierenden Trophozoiten gegenüber Formaldehyd. 1x10⁴ Trophozoiten wurden in 50 mL Zellkulturflaschen gegeben und unter Zugabe von 0-0,01 % Formaldehyde bei 37°C inkubiert. Nach 48 h wurde die Anzahl lebender Zellen von (A) B2^p pNC und (B) B2^p ADH_ÜE mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (Mittelwert±Standardfehler, n=3 in Doppelbestimmung, *unpaired Student* 's t test, ** $p \le 0,01$, *** $p \le 0,001$, **** $p \le 0,0001$).

Die ermittelten Daten zeigen, dass durch die Überexpression der *adh* die Transfektanten den Zusatz von Formaldehyd im Medium besser tolerieren können als die Kontrollgruppe.

5 Diskussion

Eine Infektion mit dem weltweit verbreiteten, protozoischen Parasiten *E. histolytica* kann in verschiedenen Verlaufsformen auftreten. In über 90 % der Fälle verläuft diese Infektion asymptomatisch und in nur 10 % der Fälle kommt es zu Krankheitssymptomen einer invasiven, intestinalen Amöbiasis durch massive Gewebezerstörungen. Durch Penetration des Darmepithels gelangen die Parasiten in weniger als 1 % der Fälle über den Blutstrom in weitere Organe. Vorwiegend reichern sich die Parasiten daraufhin in der Leber an, wodurch ein ALA verursacht wird, die häufigste Form der extra-intestinalen Amöbiasis (Stanley, 2003). Sowohl Wirtsfaktoren wie Geschlecht, Alter und Immunantwort, sowie Pathogenitätsfaktoren des Parasiten spielen eine entscheidende Rolle bei der klinischen Manifestation einer *E. histolytica*-Infektion. Auf der Seite des Parasiten wurden Cysteinproteasen, *Amoebapores* und Lektine als wichtigste Pathogenitätsfaktoren beschrieben, die an der Pathogenität des Parasiten beteiligt sind (Ralston und Petri, 2011).

Zur Identifizierung weiterer, für die Pathogenese von *E. histolytica* relevanter Faktoren wurden unter anderem vergleichende Transkriptomstudien durchgeführt. Diese basierten auf dem Isolat HM-1:IMSS, woraus sich zwei verschiedene Zelllinien entwickelt haben: Die apathogene Zelllinie A, und die pathogene Zelllinie B. Als Pathogenität wird dabei die Fähigkeit der Amöben definiert, einen ALA nach intrahepatischer Injektion im Tiermodell (*Meriones unguiculatus* und *Mus musculus*) induzieren zu können. Aus den beiden Zelllinien wurden Klone generiert, welche aus der Ursprungszelllinie A stammend, alle denselben apathogenen Phänotyp ausprägen. Die Klone, die aus der pathogenen Zelllinie B generiert wurden zeichnen sich jedoch durch ein hoch diverses Pathogenitätsverhalten aus. Bei der Gegenüberstellung der apathogenen Klone A1^{np} und B8^{np} gegenüber dem pathogenen Klon B2^p wurden einige differentiell exprimierte Gene identifiziert. Bei zwei dieser putativen Pathogenitätsfaktoren handelt es sich um eine Metalloprotease (EHI_042870) und eine Alkoholdehydrogenase (EHI_088020), dessen Überexpression im Tiermodell jeweils zu einer verringerten ALA-Bildung geführt hat. Das Vorhandensein dieser Proteine korreliert daher mit eine reduzierten Pathogenität (Meyer et al., 2016).

Im Gegensatz dazu zeigte das Silencing der beiden Gene jedoch keinen signifikanten Effekt bei der ALA-Bildung im Tiermodell, so dass die Abwesenheit des Proteins nicht mit einer verstärkten ALA-Bildung einhergeht. Die Silencing-Transfektanten wurden mit einer auf RNAi-basierten Methode generiert (Matthiesen et al., 2018). Diese wurde erstmals 2013 von Morf et al. beschrieben und wird durch eine Trigger-Sequenz vermittelt. Dabei handelt es sich um ein Gen, wogegen eine hohe Anzahl an kleinen asRNAs gebildet und somit die Expression des Gens inhibiert wird. Durch die Fusion eines Gens an diese Trigger-Sequenz, werden diese RNAi-vermittelnden asRNAs ebenfalls gegen das fusioniert Gen gebildet (Morf et al., 2013). Solche so genannten as-Oligonukleotide wurden auch bereits als Alternative zu Antibiotika beschrieben. Sobald ein as-Oligonukleotid an eine spezifische mRNA bindet, wird die Anlagerung von ribosomalen Untereinheiten blockiert und damit die Translation inhibiert. Damit kann die Proteinbiosynthese einer bestimmten Gattung oder Bakterienart inhibiert werden, wodurch eine deutlich spezifischere Therapie als mit bekannten Antibiotika ermöglicht, und auch die Inzidenz von antibiotikabedingtem Diarrhöe verringert wird (Stewart, 2018).

In weiterführenden Anwendungen wurden beispielsweise transgene Pflanzen-Linien erzeugt (Weizen und Tomaten), welche asRNAs exprimieren, die auf potenziell lebenswichtige Gene von Pflanzenpathogenen (*Puccinia striiformis, Fusarium oxysporum*) abzielen. Dadurch konnte in normalerweise sensitiven Sorten eine stabile Resistenz gegenüber der Erreger erzielt werden (Qi et al., 2018; Bharti et al., 2017).

Obwohl eine RNAi-basierte Silencing-Methode vielfach zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren oder allgemeinen Genfunktionsanalysen in verschiedenen Organismen eingesetzt wird (Matthiesen et al., 2018; Bicalho Nogueira et al., 2019; Ge et al., 2019), wurden auch *Off-target* Effekte beschrieben. Dabei wurde die Expression ähnlicher Gene beeinflusst, was u. a. zytotoxische Effekte erzielte (Lin et al., 2005; Fedorov et al., 2006; Putzbach et al., 2018; Jackson und Linsley, 2010).

5.1 Etablierung des CRISPR/Cas-Systems in *E. histolytica*

Aufgrund der vorangehend beschriebenen Problematik, dass das RNAi-basierte Silencing verwandte Gene mit ähnlicher Sequenz beeinflusst, sollte das CRISPR/Cas-System in *E. his-tolytica* etabliert werden. Damit kann die Expression nur eines Gens spezifisch inhibiert werden. Beeinflusste Parameter, welche durch das Silencing identifiziert werden, können dann ausschließlich auf das eine, gesilencte Gen zurückgeführt werden und stellen somit keinen kombinatorischen Effekt aus mehreren gesilencten Genen dar.

5.1.1 Reduktion von Off-target Effekten des CRISPR/Cas-Systems

Auch bei dem Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems kann es jedoch nicht nur zu Spaltungen in der DNA der Zielsequenz kommen, sondern auch von Sequenzen, die sich um bis zu mehrere Nukleotide von den jeweiligen Zielsequenzen unterscheiden. Diese unerwünschten *Off-target* Effekte können zu unvorhersehbaren Mutationen und Chromosomenveränderungen führen. Daher sollte die Auswahl der Zielsequenz besonders sorgfältig erfolgen und mit Hilfe eines *Off-target-*Suchwerkzeugs bioinformatisch überprüft werden (Bae et al., 2014).

Untersuchungen mit einer katalytisch inaktiven Variante der Cas9 (*dead*, dCas9) zeigten eine Anzahl von *Off-target* Loci von 10 bis >1000, abhängig von der jeweiligen verwendeten sgRNA. Dabei lagert sich das inaktive Enzym nur an die Sequenz an, wodurch es zu keinem Schnitt kommt, die Stelle jedoch angezeigt wird. Die Analyse der *Off-target* Loci macht die Wichtigkeit der PAM-proximalen Region der sgRNA deutlich, so dass beim Design einer sgRNA darauf ein besonderes Augenmerk gelegt werden sollte (Lin et al., 2018). Um die Spezifität des Cas9-vermittelten *Genome-Editings* zu verbessern, haben Ran et al.

(2013) eine neuartige Strategie entwickelt, die die D10A-Mutanten-Nickase-Version von Cas9 (Cas9n) mit einem Paar versetzter sgRNAs kombiniert, die zu gegenüberliegenden Strängen der Zielsequenz komplementär sind. Während nur das Schneiden beider DNA-Stränge durch ein Paar Cas9-Nickasen zu sehr spezifischen DSBs und NHEJ führt, werden einzelne Nicks überwiegend ohne Auswirkungen repariert (Ran et al., 2013a).

Auf diesen Grundlagen können *Off-target* Effekte weitestgehend reduziert werden, wodurch das CRISPR/Cas-System für einen spezifischeren Gen-Knockout eingesetzt werden kann, im Vergleich zu einer RNAi-basierten Methode.

5.1.2 Analyse der Expression der cas9/cas9^{co} durch E. histolytica

Zunächst wurde in dieser Arbeit untersucht, ob in *E. histolytica* (A1^{np} und B2^p) überhaupt ein derart großes (ca. 140 kDa) und Amöben-fremdes Protein überexprimiert werden kann, um ggf. die Cas9 und die sgRNA durch *E. histolytica* selbst herstellen zu lassen.

Da in den beiden Transfektanten A1^{np} Cas9_ÜE und B2^p Cas9_ÜE nur die Expression der Cas9 auf mRNA-, nicht aber auf Protein-Ebene nachgewiesen werden konnte, wurde das Cas9-codierende Gen codonoptimiert (siehe 4.3.1). Da es im genetischen Code 64 mögliche Nukleotid-Triplett-Kombinationen, aber nur 20 AS zu codieren gibt können die meisten AS von mehr als einem Codon codiert werden. In jedem Organismus gibt es eine Präferenz für bestimmte Codons gegenüber anderen. Die Wahl der Codons kann vor allem die Proteinex-pression maßgeblich beeinflussen. In der Gentechnik wird die Codon-Optimierung oftmals eingesetzt, bei der Codons durch Synonyme ersetzt werden, um die Proteinexpression zu erhöhen (Athey et al., 2017). *E. histolytica* besitzt ein AT-reiches Genom, so dass beispiels-weise das Triplet CTG für die Aminosäure Leucin nur mit einer Frequenz von 0,06 % vorkommt, im Gegensatz zu dem Triplet CTT, welches mit einer Frequenz von 3 % vorkommt (http://www.kazusa.or.jp/codon/, 2019). Dementsprechend kann bei der Translation die gleiche Aminosäure durch eine andere, in *E. histolytica* häufiger vorkommende tRNA an das entstehende Polypeptid angehängt, und die Translationsrate somit gesteigert werden.

Aber auch von der codonoptimierten Variante der Cas9, konnte in den beiden Transfektanten A1^{np} Cas9^{co}_ÜE und B2^p Cas9^{co}_ÜE nur die Transkription der mRNA, nicht jedoch die Translation in ein Protein nachgewiesen werden (siehe 4.3.2). Dadurch konnte eine unterschiedliche tRNA-Nutzung zwischen den Organismen als Ursache für die fehlende Translation ausgeschlossen werden. Da im Westernblot jedoch mehrere kleinere, zwischen den Klonen unterschiedliche Banden detektiert wurden, scheint die Translation des Proteins an verschiedenen Stellen abzubrechen. Darüber hinaus können die Banden auch Degradationsprodukte darstellen, die aus dem sofortigen Abbau nach der Translation durch zelleigene Proteasen resultieren. Diese unterschiedlichen Bandenmuster im Westernblot zwischen den Klonen A1^{np} und B2^p, in denen verschiedene Gene überexprimiert werden sollten, konnte Dirk Lercher bereits 2017 im Rahmen seiner Masterarbeit in unserer Arbeitsgruppe "Protozoologie" zeigen. Dabei wurden verschiedene, Amöben-eigene Proteine (25-95 kDa) mit einem Myc-*Tag* fusioniert, die jedoch nicht in beiden Klonen gleichermaßen gebildet wurden (Lercher, 2017). Selbst manche Amöben-eigenen Proteine ohne *Tag* lassen sich in *E. histolytica* nicht überexprimieren (Meyer et al., 2016).

Bei dem Einsatz des CRISPR/Cas-Systems in Eukaryoten muss außerdem beachtet werden, dass es bakteriellen Ursprungs ist. Daher wurden von Cong et al. (2013) das Gen der *S. pyogenes* Cas9 sowie die angehängte Kernlokalisationssequenz (*Nuclear Localization Signal*, NLS) codonoptimiert, um zu gewährleisten, dass sie mit Säugerzellen kompatibel sind. Die Expression dieser Konstrukte in menschlichen Zellen ergab, dass zwei NLSs am effizientesten sind, um die Cas9 auf den Zellkern auszurichten (Cong et al., 2013). Für *E. histolytica* wurde das Vorhandensein von drei zweiteiligen NLSs durch bioinformatische Analysen eines Aktin-bindenden Proteins identifiziert (Uribe et al., 2012).

Bei erfolgreicher Expression der Cas9 durch *E. histolytica* könnte daher eine fehlende Kernlokalisation des Proteins durch Optimierung der verwendeten NLS behoben werden. Es wurden zunächst jedoch nur die Transkription und Translation des Proteins ohne *E. histolytica-*spezifische NLS analysiert.

Zu den Amoebazoa zählt neben *E. histolytica* auch *Dictyostelium discoideum*. Diese Amöben kommen in Laubwaldböden vor, wo sie sich von Bakterien ernähren. *Dictyostelium* ähnelt *E. histolytica* nicht nur durch den hohen AT-Gehalt des Genoms, sondern zeigt auch ungewöhnliche Telomerstrukturen, einen hohen Anteil an repetitiven Elementen und einen bemerkenswert hohen Gengehalt (Eichinger und Noegel, 2005).

Vor kurzem wurde auch die Anwendung des CRISPR/Cas-Systems in Dictyostelien beschrieben, wobei zwei verschiedene Systeme verwendet wurden. Zum einen wurde ein *allin-One-*System mit Cas9-Nuklease und sgRNA auf einem Expressions-Plasmid getestet und zum anderen ein zwei-Plasmid-basiertes System zur Expression von Cas9 und sgRNA aus zwei separaten Plasmiden. Zwei oder mehr Plasmide machen jedoch den Einsatz von mehreren Selektionsmarkern nötig, wodurch die Anwendbarkeit limitiert wird. Als Promotor
wurde der herkömmliche U6 Promotor mit der Kopplung von sgRNA und tRNA verglichen (Muramoto et al., 2019; Sekine et al., 2018). Bei U6-Promotoren handelt es sich um eine Klasse von Promotoren, die spezifisch für die Rekrutierung von RNA-Polymerasen III verantwortlich sind. Dadurch wird an die RNA kein 5'Cap und keinen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende angehängt, da die RNA sonst aus dem Zellkern hinaus transportiert werden würde (DeWitt et al., 2017; López-Camarillo et al., 2014). Der Expressionsgrad von tRNA abgeleiteten sgRNAs war etwa 10-mal höher als der des U6-Promotors. In menschlichen Zellen wurde die Korrelation von starker sgRNA-Expression mit erhöhter Zielgenauigkeit beschrieben, so dass sich eine große Menge vorliegender sgRNA vorteilhaft auswirkt (Muramoto et al., 2019; Sekine et al., 2018).

Würde der Ansatz, die Cas9 und auch die sgRNAs durch *E. histolytica* selbst herstellen zu lassen, weiterverfolgt werden, müsste daher ein besonderes Augenmerk auf den verwendeten Promotor gelegt werden und möglicherweise ebenfalls mehrere Promotoren auf ihre Effizienz hin getestet werden.

Die Wahl des Promotors stellt auch bei einem Multiplex-Ansatz, mit dem mehrere Gene gleichzeitig gesilenct werden können, einen wichtigen Faktor dar. Durch so einen Multiplex-Ansatz können mehrere Gene deutlich schneller gesilenct werden, als mit dem herkömmlichen RNAi-System. Dabei werden bekanntlich mehrere Wochen Kultivierung ohne Selektionsdruck benötigt, bis das Plasmid nicht mehr vorhanden ist, und ein neues Silencing-Plasmid in die Zelle eingebracht werden kann. Ein Multiplex Ansatz erfordert dagegen lediglich mehrere sgRNAs, welche durch die Amöben selbst hergestellt werden könnten. Xie und Kollegen entwickelten 2015 eine Strategie zur Herstellung zahlreicher sgRNAs aus einem einzigen, polycistronischen Gen in der Reispflanze. Durch die alternierende Abfolge aus sgRNAs und tRNAs kommt es zu einer Prozessierung durch endogene RNasen, so dass die einzelnen sgRNAs freigesetzt werden. Da das Verarbeitungssystem von tRNAs in allen lebenden Organismen weitgehend konserviert ist, könnte diese Methode auch in anderen Organismen eingesetzt werden, um mehrere Gene gleichzeitig mit dem CRISPR/Cas9-System zu modifizieren (Xie et al., 2015). In E. histolytica sind die tRNA-Gene ebenfalls als mehrere Tandem-Array-Einheiten organisiert, die durch Tandem-Wiederholungen von ATreichen Sequenzen voneinander getrennt sind (Irmer et al., 2010). Somit wäre der oben beschriebene Ansatz zur Kopplung von tRNAs mit sgRNAs in E. histolytica möglich.

Vor Kurzem wurde eine weitere Möglichkeit beschrieben, mehrere sgRNAs in Kombination mit mehreren miRNAs (shRNAs) in einem einzigen Transkript unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase-II-Promotors zu exprimieren. Das polycistronsche Transkript wird dann von einem Proteinkomplex, bestehend aus einer RNase III, dem Enzym Drosha samt seines Cofaktors und einem als DGCR8/Pasha bezeichnetem Enzym, prozessiert. Dadurch entstehen reife sgRNAs und miRNAs (oder shRNAs) (Xie et al., 2017). Da jedoch weder Droshanoch DGC8-Homologe im *E. histolytica* Genom gefunden wurden, scheint diese Möglichkeit der sgRNA-Produktion in E. histolytica auszuscheiden (López-Camarillo et al., 2014).

Zusammenfassend muss bei der Transkription einer oder mehrerer sgRNAs durch *E. histolytica* der Promotor und die Art und Weise der Prozessierung sorgfältig ausgewählt werden, sowie die Sequenz der sgRNA um *Off-target* Effekte zu vermeiden. Durch die Möglichkeit eines Multiplex Ansatzes könnten viel schneller als bei dem RNAi-basierten Silencing mehrere Gene modifiziert werden.

5.1.3 Analyse der Funktionalität von in vitro transkribierten sgRNAs

Für die Verwendung des CRISPR/Cas-Systems sind neben der Cas9 auch die sgRNAs von entscheidender Bedeutung. Aufgrund ihrer Komplementarität leiten sie die Cas9 zur Zielsequenz, wo dann der DSB induziert wird.

In dieser Arbeit wurden verschiedene sgRNAs designt, die jeweils einen vorderen und einen mittigen Schnitt in der DNA zwei verschiedener Zielsequenzen vermitteln sollten, und diese *in vitro* transkribiert. Zusammen mit einer rekombinanten Cas9 konnten alle 4 Schnitte induziert werden. Dabei war die Effizienz der vorderen Schnitte etwas schwächer als die der mittigen Schnitte, da bei gleicher Menge an eingesetzter DNA, sgRNA und Cas9 nicht die gesamte Menge an eingesetztem Amplifikat geschnitten wurde (siehe 4.3.3.1). Unterschiede in der Effizienz verschiedener sgRNAs wurden schon mehrfach beschrieben, so dass bereits online im Vorfeld berechnet werden kann, welche sgRNA sich voraussichtlich am besten eignet (Bae et al., 2014).

Unter Verwendung von Amöbenlysat der *cas9*^{co}-überexprimierenden Trophozoiten statt rekombinanter Cas9 konnte die DNA an der Zielsequenz nicht geschnitten werden (siehe 4.3.3.1). Im Amöbenlysat könnte die Cas9 bereits durch die vielen Proteasen, die in *E. histolytica* vorliegen, abgebaut worden sein. Zwar wurde der Protease-Inhibitor E64 eingesetzt, dieser inhibiert jedoch nur die Cysteinproteasen und nicht die Gesamtheit der in *E. histolytica* vorkommenden, verschiedenen Proteasen. In intakten Trophozoiten liegen diese abbauenden Enzyme in Vesikeln vor, im Lysat werden diese jedoch freigesetzt. Diese Annahme wird gestützt durch die deutlich schwächere Bande im Agarosegel bei dem unverdünnt eingesetzten Lysat. Da in den Assay immer dieselbe Menge an amplifizierter Zielsequenz eingesetzt wurde, haben möglicherweise die zelleigenen, freigesetzten DNasen während der 60-minütigen Inkubation bei 37°C zum Abbau der DNA geführt. Dabei wären dann jedoch auch Degradationsprodukte zu erwarten gewesen. Bei den verdünnt eingesetzten Lysaten ist keine Abschwächung der Bande mehr erkennbar. Sollte jedoch aktive Cas9^{co} im Lysat vorgelegen haben, wurde es wahrscheinlich zu niedrig konzentriert eingesetzt, um einen Effekt zu erzielen. Die für eine Spaltung durch Cas9 entscheidende Sequenz ist die PAM-Sequenz. Bei der hier verwendeten Cas9 besteht sie aus 5'-NGG-3'. Es wurde jedoch gezeigt, dass drei aufeinander folgende Basen Guanin die am häufigsten gebundene Sequenz darstellen (Kuscu et al., 2014). In AT reichen Genomen wie bei *E. histolytica* sind die Basenpaarungen zwischen der sgRNA und der Ziel-DNA daher weniger stabil. Zur Modifikation solcher AT-reichen Genome kann auch ein anderes CRISPR/Cas-System in Betracht gezogen werden. Die Cas12a aus *Francisella novicida* (früher Cpf1 genannt) erkennt eine 5'-TTTV-3' PAM-Sequenz und induziert in der Ziel-DNA einen gestaffelten, PAM-distalen DSB mit einem 4 oder 5-nt 5'-Überhang. Zahlreiche Studien in Bakterien-, Pflanzen-, Insekten- und Säugerzellen haben bereits gezeigt, dass Cas12a eine wirkungsvolle Alternative zur Cas9 darstellt (Swarts und Jinek, 2018).

Darüber hinaus stellt auch der Methylierungsgrad der Zielsequenz einen wichtigen Faktor für die Bindung von sgRNA und Cas9 dar. Wu et al. zeigten 2015 dass der Grad der methylierten Bereiche auf der Zielsequenz negativ mit der Bindungsaffinität korreliert, da Methylierungen die Bindung der sg RNA und Cas9 behindern (Wu et al., 2014). Im Gegensatz zu Säugetieren, bei denen Cytosin überwiegend innerhalb der CpG-Dinukleotide methyliert ist, ist das DNA-Methylierungsmuster in *E. histolytica* nicht auf CpG-Nukleotide beschränkt, sondern kann auch an Nicht-CpG-Stellen auftreten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Fähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten, bei denen das für die Methylierung verantwortliche Enzym inhibiert wurde, ALAs in Hamstern zu induzieren, signifikant reduziert wurde (Tovy und Ankri, 2010).

Die Funktionalität von sgRNAs wird im Allgemeinen von dem Methylierungsgrad der Zielsequenz sowie der PAM-Sequenz beeinflusst. In einem AT-reichen Genom wie dem von *E. histolytica* würde sich eine Cas eignen, welche eine AT-reiche PAM-Sequenz erkennt wie beispielsweise die Cas12a. Diese Faktoren sollten bei der Auswahl einer weiteren Zielsequenz berücksichtigt werden.

5.1.4 CRISPR/Cas-System mit einem Ribonukleoprotein-Komplex

Um das CRISPR/Cas System unabhängig von der Cas9-Expression durch die Amöben verwenden zu können, wurde als nächster Ansatz die Transfektion mit einem RNP-Komplex verfolgt. Dieser Komplex besteht aus einer aktiven Cas9, einer Fluoreszenz-markierten tracrRNA und der sequenzspezifischen crRNA. Die Transfektion mit solch einem vorgeformten RNP-Komplex stellt entscheidende Vorteile dar. Zum einen sind Indels bereits sehr kurz nach der Transfektion messbar, wohingegen Zellen, die mit dem Cas9-Plasmid transfiziert wurden, das Protein deutlich länger exprimieren. Dadurch kommt es zunehmend zu unerwünschten Spaltungen an *Off-target-*Stellen und vermehrt zum Zelltod. Zum anderen birgt die DNA-Transfektion auch das Risiko einer Insertionsmutagenese durch Integration des Vektors nach dem Zufallsprinzip in das Genom (DeWitt et al., 2017).

Durch die Transfektion des RNP-Komplexes mittels Elektroporation konnte in kultivierten, humanen Zellen (Fibroblasten, induzierten pluripotenten Stammzellen, Leukämiezelllinie) eine Indel-Effizienz von bis zu 79 % erreicht werden (Liang et al., 2015b). Daneben wurden diese Methode auch in Fischzellen erfolgreich eingesetzt (Liu et al., 2018), sowie zur Transfektion von pflanzlichen Protoplasten, woraus jeweils eine gesamte Pflanze regeneriert werden konnte (Park et al., 2019).

Der in dieser Arbeit zur Transfektion verwendetet RNP-Komplex enthielt eine rot fluoreszierende tracrRNA, wodurch er innerhalb der Zelle mittels durchflusszytometrischen und mikroskopischen Methoden detektiert werden kann (siehe 4.3.3.2.1). Eine erhöhte Menge an zur Transfektion eingesetztem RNP-Komplex ging mit einer prozentualen Zunahme der RNP-Komplex-positiven Zellpopulation einher. Bei der sechsfachen Menge (30,6 µM) an eingesetztem RNP-Komplex wurde eine Transfektionseffizienz von annähernd 100 % erreicht. Am Fluoreszenzmikroskop konnte keine Aussage über die Transfektionseffizienz getroffen werden, da nicht genügend Amöben vorhanden und auswertbar waren. Allerdings waren bei Trophozoiten die mit einer größeren Menge an RNP-Komplex transfiziert wurden mehr rote Bereiche innerhalb der Zellen erkennbar. Diese rote Fluoreszenz ist auf die rot fluoreszierende tracrRNA im RNP-Komplex zurückzuführen, so dass diese Fluoreszenz die Lokalisation des RNP-Komplexes anzeigt. In den mikroskopischen Aufnahmen wurde deutlich, dass die Amöben den leuchtenden RNP-Komplex in Vesikel zu verpacken scheinen und diese aus der Zelle ausschleusen (siehe 4.3.3.2.2). Möglicherweise gelangt trotzdem vorher ein kleiner Teil des Komplexes in den Kern. Bei der Transfektion mit Plasmid-DNA gelangt diese mit Hilfe eines Stromimpulses durch die Zellmembran in den Zellkern. Da die ca. 6-10 kb großen Plasmide jedoch in einer superspiralisierten Form vorliegen und ganz andere Eigenschaften aufweisen als der RNP-Komplex, ist dieser Vorgang nicht unmittelbar übertragbar. Möglicherweise müssten die Transfektionsparameter für eine Transfektion mit dem RNP-Komplex weiter optimiert werden.

Caenorhabditis elegans wurde beispielsweise durch Mikroinjektion des CRISPR/Cas9-Systems gentechnisch verändert (Iyer et al., 2019).

Resümierend beinhaltet die Transfektion mit einem RNP-Komplex zwar einige Vorteile, aber auch andere Arten der Transfektion stellen mögliche Optionen dar.

Aus Kostengründen wurden die nachfolgenden Versuche mit den Trophozoiten durchgeführt, die mit einfacher Menge (5,1 μ M) RNP transfiziert wurden, obwohl der Einsatz von mehr RNP-Komplex in einer höheren Transfektionseffizienz resultiert und somit die Wahrscheinlichkeit einer eingefügten Modifikation erhöht.

5.1.5 Analyse von Mutationen auf DNA-Ebene

Bei einer CRISPR/Cas-induzierten Spaltung in der DNA des Zielgens wird dieser DSB bestenfalls durch das zelleigene NHEJ System inkorrekt repariert.

López-Camarillo et al. (2009) beschrieben, dass das *E. histolytica* Genom nur eine der beiden Sequenzen der Untereinheiten für die NHEJ enthält. Die beiden Proteine arbeiten normalerweise als ein Komplex, um DSB zu erkennen und andere DNA-Reparaturfaktoren zu rekrutieren. Das Fehlen einer Untereinheit wurde jedoch auch für andere eukaryotische Parasiten wie *Trichomonas vaginalis* und *Encephalitozoon cuniculi* berichtet und es gibt Hinweise darauf, dass einige NHEJ-Untereinheiten entbehrlich sein könnten. In *E. histolytica* könnte der NHEJ-Signalweg somit über ein multifunktionales Protein vermittelt werden (López-Camarillo et al., 2009).

Auch in dem Erreger der Malaria, *P. falciparum*, welcher ebenfalls ein AT-reiches Genom besitzt, wurde das CRISPR/Cas9-System bereits erfolgreich eingesetzt. Wenn ein DSB in der DNA des Parasiten induziert wird, erzwingt dies die Einleitung von Reparaturmechanismen in dem Organismus. Da dieser Parasit nicht über die notwendige Maschinerie verfügt, um DNA-Brüche durch NHEJ zu reparieren, nutzt er homologe Rekombinationsmechanismen und integriert transfizierte, homologe DNA-Vorlagen, um den induzierten DSB zu reparieren (Kudyba et al., 2018). Dieser Ansatz könnte auch in *E. histolytica* verfolgt werden, indem eine Reparaturvorlage mit transfiziert wird.

Außerdem könnten statt der Cas9 zwei Nickasen simultan verwendet werden, welche in geringem Abstand voneinander auf je einem der beiden DNA Stränge einen Einzelstrangbruch einfügen. Ran et al. zeigten 2013, dass es durch den Einsatz von zwei sgRNAs und Nickasen zu Mikrodeletionen im Gen kommt und die Reparatur über HDR stimuliert wird (Ran et al., 2013a).

5.1.5.1 Mutationsnachweis mit dem Genome Editing Detection Kit

Für den Nachweis einer eingefügten Mutation in der Zielsequenz durch das CRISPR/Cas-System wurde in dieser Arbeit ein Kit verwendet, das auf der Identifizierung und Spaltung von inkongruenten DNA-Heteroduplexen durch die T7EI basiert. Somit sollten mögliche Mutation der RNP-transfizierten Trophozoiten auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. Da die Positivkontrolle des Kits Spaltprodukte hervorgebracht hat, kann seine generelle Funktionalität nicht angezweifelt werden. In Bezug auf die RNP-transfizierten Amöben wurden jedoch keine Modifikationen in einem Pool aus je 4 Transfektanten detektiert (siehe 4.3.3.3.1). Sollte es in den Transfektanten immer zur selben Mutation gekommen sein, wäre es von Vorteil, die amplifizierten Zielsequenzen von Transfektanten mit denen vom Wildtyp zu kombinieren, da somit immer ein nicht modifiziertes Gen vorliegt. In einigen Studien wurde der T7EI Assay erfolgreich zur Detektion von Mutationen eingesetzt (Liang et al., 2015a). Allerdings werden auch falsch negative Ergebnisse des Assays beschrieben (Kim et al., 2014). Einen weiteren Nachteil zieht der Assay mit sich, da durch ihn nur Indels erfasst werden, die größer als 1 bp sind. Fand also nur eine Insertion bzw. Deletion einer einzigen Base statt, wird dies als native Sequenz angezeigt. Sentmanat et al. (2018) zeigten, dass der T7EI-Assay nur 30 bis 40 % der CRISPR/Cas9-editierten Bereiche anzeigte (Sentmanat et al., 2018). Die negativen Ergebnisse des T7EI-Assays könnten daher entweder auf ein falsch negatives Ergebnis, bzw. eine Indel Mutation von nur einem Nukleotid zurückzuführen sein, oder es wurde keine Mutation durch das CRISPR/Cas induziert.

5.1.5.2 Mutationsnachweis durch DNA-Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass es sich nicht um ein falsch negatives Ergebnis des T7EI-Assays handelt, wurde die gDNA der transfizierten Amöben isoliert, die Zielsequenz mittels PCR amplifiziert und in den TOPO-Vektor kloniert. Die Sequenzierung des daraus hervorgegangenen Klons zeigte einen Basenaustausch von A zu G an Position sieben vor der PAM-Sequenz. Daraus würde der Einbau von Glycin statt Glutaminsäure in der Aminosäuresequenz resultieren. Zusätzlich wurde der zur Klonierung in den TOPO-Vektor verwendete PCR-Ansatz sequenziert, welcher keine Mutation auswies. Sollte es zu Modifikationen kurz vor der PAM-Sequenz gekommen sein, dürfte die Sequenzierung von dort an nicht mehr eindeutig sein und müsste ein erhöhtes Hintergrundsignal zeigen. Dies wurde jedoch nicht beobachtet (siehe 4.3.3.3.2).

Der PCR-Ansatz besteht aus vielen Molekülen, die exponentiell zur Ausgangsmenge vervielfältigt wurden. Lag zu Beginn nur ein Molekül modifiziert vor, so ist dieses am Ende nur noch in einer verschwindend geringen Menge vertreten. Daher war nicht zu erwarten, dass in den PCR-Produkten eine Mutation nachweisbar war. Bei einer Klonierung in den TOPO-Vektor wird dagegen nur ein einziges Molekül in den Vektor ligiert, so dass keine Mischpopulation vorliegt wie bei einer PCR. Möglicher Weise könnte es sich dabei um eins der wenigen modifizierten Amplifikate gehandelt haben.

In der Literatur wird angegeben, dass die Cas9 aus *S. pyogenes* drei Nukleotide vor der PAM-Sequenz die DNA schneidet (Jinek et al., 2014). Marina Borschiwer zeigte 2014 in ihrer Diplomarbeit, dass in embryonalen Stammzellen die DBS durch die Cas9 im Durchschnitt ca. sechs Nukleotide vor der PAM-Sequenz auftraten (Borschiwer, 2014). Somit ist eine Mutation im Gen von *E. histolytica* an einer Position sieben Nukleotide vor der PAM-Sequenz durchaus realistisch.

Bei der hier identifizierten Mutation handelt es sich jedoch um eine Basen-Substitution, nicht um die in der Literatur beschriebenen, durch NHEJ induzierten, Indels. Durch diesen Basenaustausch an Position 243 kommt es an Position 82 des Proteins zum Einbau der sauren AS Glutaminsäure statt der neutralen AS Glycin. Das aktive Zentrum ($Q_{112}C_{118}H_{259}N_{279}$) wird von dem Austausch der AS nicht direkt beeinflusst, trotzdem könnte es aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der substituierten AS zur Fehlfaltung und damit verbundenen Inaktivierung des Enzyms gekommen sein.

Zur Etablierung des CRISPR/Cas-Systems *in E. histolytica* könnte im Allgemeinen die Induktion der HRR durch zwei versetzt schneidende Nickasen, statt NHEJ von Vorteil sein. Zusätzlich stellt der Mutationsnachweis mittels T7EI-Assay nicht die beste Option dar, so dass weitere Nachweismethoden für Mutationen in Betracht gezogen werden sollten.

5.1.6 Analyse von Mutationen auf Proteinebene

Um die Aktivität der Cysteinprotease zu untersuchen, dessen codierendes Gen (*ehcp-a1*) mit dem CRISPR/Cas-System gesilenct werden sollte, wurde ein Substratgel verwendet. Dabei werden die im Amöbenlysat enthaltenen Cysteinproteasen durch Aktivitätsbanden sichtbar, da sie die im Gel enthaltene Gelatine verdauen und diese Bereiche nicht mit Coomassie angefärbt werden und als weiße Banden visualisiert werden können.

Im Lysat von zwei RNP-transfizierten Klonen ist die Aktivitätsbande der EhCP-A1 deutlich schwächer sichtbar als bei der untransfizierten Kontrolle. Das Ergebnis konnte einige Tage später mit denselben Lysaten jedoch nicht reproduziert werden (siehe 4.3.3.4.1).

Zusätzlich wurden die Amöbenlysate im Cysteinprotease-Assay eingesetzt und dabei die Lysate direkt nach der Klonierung der Transfektanten sowie Lysate nach dreiwöchiger Kultivierung miteinander verglichen. Im Vergleich zur untransfizierten Stammkultur wiesen die RNP-transfizierten Amöben eine deutlich geringere Cysteinproteaseaktivität auf, sowohl direkt nach der Klonierung als auch nach dreiwöchiger Kultivierung (siehe 4.3.3.4.2).

Da auch nach dreiwöchiger Kultivierung noch eine reduzierte Proteaseaktivität im Lysat der RNP-transfizierten Amöben vorlag, scheint sich dieses Phänomen über einen längeren Kultivierungszeitraum nicht zu ändern. Demgegenüber stehen jedoch die unstimmigen Ergebnisse der Substartgele, so dass der Versuch unbedingt wiederholt werden sollte.

Abschließend stellt das CRISPR/Cas System prinzipiell eine vielversprechende Methode dar, Gene auch in *E. histolytica* zu modifizieren. Dabei müssen jedoch einige wichtige Parameter beachtet werden um diese Methode erfolgreich zu etablieren: Im Vorfeld sollten sowohl *Off-target* Effekte, sowie die Effizienz der sgRNAs bestimmt werden. Darüber hinaus spielen die Transfektionsmethode, ggf. der verwendete Promotor und NLS, sowie die Prozessierung der sgRNAs bei einem Multiplex-Ansatz eine große Rolle. Ebenfalls sollten verschiedene Cas-Proteine, Reparaturwege, und Systeme zu Detektion von Mutationen in Betracht gezogen werden.

5.2 Charakterisierung der Metalloprotease

In dem Genom von E. histolytica wurden 22 Gene vorhergesagt, welche mutmaßliche Metalloproteasen codieren. Diese lassen sich auf 7 verschiedene Stämme und 11 verschiedene Familien unterteilen. Zu dem Stamm MA gehört die Familie M8, deren beiden Mitglieder EhMP8-1 und EhMP8-2 neben dem charakteristischen Zink-Bindungsmotiv aus zwei Histidinresten, einen weiteren, C-terminalen Histidinrest aufweisen, welcher eine dritte Zinkbindungsstelle darstellt. Beide Metalloproteasen werden bestehend aus einer extrazellulären Domäne, in der das katalytische Zentrum liegt, sowie einer TMB und einer zytoplasmatische Domäne beschrieben (Tillack et al., 2007). Darüber hinaus stellen die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 das Pendant zum Leishmanolysin dar, welches auch als gp63 bezeichnet wird und eine oberflächenlokalisierte, zinkabhängige Metalloprotease darstellt. Diese Protease wird von allen pathogenen Leishmanien exprimiert und dient als Ligand zur Bindung von Makrophagenkomplementen und Fibronektinrezeptoren. Vor dem Eintreten von Parasiten in den Wirtsmakrophagen verleiht Leishmanolysin dem Parasiten Resistenz gegenüber der Komplement-vermittelten Lyse und erleichtert die Internalisierung der Promastigoten durch Makrophagen. Innerhalb des Wirtsmakrophagen schützt Leishmanolysin die Parasiten ebenfalls vor intraphagolysosomalem Abbau in Makrophagen, vermutlich durch Inaktivierung hydrolytischer Enzyme (Kulkarni et al., 2006; Isnard et al., 2012).

E. histolytica ist generell wenig suszeptibel gegenüber antimikrobiellen Peptiden, so dass bisher keine derartige Schutzfunktion für die Metalloproteasen gezeigt wurde (Marien, 2007). Die spezielle, cholesterolhaltige Phospholipidzusammensetzung der Zellmembran, verleiht den Trophozoiten wahrscheinlich nicht nur Resistenz gegenüber dem eigenen antimikrobielle Peptid *Amoebapore*, sondern auch anderen antimikrobiellen Peptiden (Andrä et al., 2004). Für die EhMP8-1 wurde darüber hinaus eine signifikante Proteaseaktivität gegenüber succinyliertem Casein gezeigt (Teixeira et al., 2012). In der hier vorliegenden Dissertation konnte die entsprechende Aktivität in den *ehmp8-2*-überexprimierenden Trophozoiten jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dafür wurde in dieser Arbeit allerdings die gesamte Membranfraktion des Lysates der *ehmp8-2*-überexprimierenden Trophozoiten verwendet und nicht das gereinigte und konzentrierte Protein, wie bei der Analyse der EhMP8-1.

Das EhMP8-2-codierende Gen wurde in vergleichenden Transkriptionsstudien zwischen dem pathogenen Klon B2^p und dem apathogenen Klon A1^{np} als differentiell exprimiert identifiziert. Dabei zeigte der apathogene Klon A1^{np} eine 150-fach stärkere Expression als der pathogene Klon B2^p. Die Überexpression dieser Metalloprotease führte im Tiermodell zu einer signifikant geringeren ALA-Bildung (Meyer et al., 2016).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte daher in dieser Arbeit die Metalloprotease EhMP8-2 näher charakterisiert werden.

5.2.1 Verifizierung von Überexpression und Silencing der ehmp8-2

Zur funktionellen Untersuchung von Molekülen auf ihren Einfluss auf eine Zelle oder auch zur Verifizierung von Pathogenitätsfaktoren bestehen mehrere Möglichkeiten auf verschiedenen Ebene.

Zum einen können die zu analysierenden Moleküle auf Proteinebene ausgeschaltet werden. Dafür werden oftmals blockierende Antikörper eingesetzt und deren jeweilige, inhibierende Wirkung analysiert. So wurde beispielsweise das als Pathogenitätsfaktor beschriebene Gal/GalNAc-Lektin der *E. histolytica* Trophozoiten mittels monoklonaler Antikörper näher untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Bindung der Antikörper an verschiedene Epitope der 170 kDa Untereinheit des Gal/GalNAc-Lektin unterschiedliche Effekten auf die Adhärenz der Trophozoiten hervorrief (Petri et al., 1990). Daneben können auch andere Inhibitoren verwendet werden, um Pathogenitätsfaktoren auf Protein-Ebene auszuschalten. Mit Hilfe des spezifischen Cysteinprotease-Inhibitors E64 konnte ebenfalls auf Protein-Ebene die Funktion der als Pathogenitätsfaktor identifizierten Cysteinproteasen bestätigt werden. Die mit E64 behandelten Trophozoiten induzierten signifikant kleine ALAs im Tiermodell, wodurch der Einfluss der Cysteinproteasen auf die Pathogenität von *E. histolytica* belegt wurde (Stanley et al., 1995).

Zum anderen stellt die Veränderung der Genexpression mittels Überexpression bzw. Silencings eine weit verbreitete Methode dar. Vor kurzem haben Shahi et al. (2019) das codierende Gen für eine Cyclooxygenase (EhCox) von *E. histolytica* gesilenct um die davon beeinflussten biologischen Funktionen des Parasiten zu analysieren (Shahi et al., 2018).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Genexpression putativer Pathogenitätsfaktoren auf mRNA-Ebene verstärkt bzw. vermindert um diese Faktoren näher zu charakterisieren. Die Expressionsinhibierung erfolge dabei durch ein RNAi-basiertes Verfahren, welches derzeit das Mittel der Wahl darstellt, um eine Genexpression in *E. histolytica* zu inhibieren.

RNAi ist ein grundlegender Prozess, der die Genexpression in vielen Organismen reguliert und zu einem Standardsystem in der Molekularbiologie zählt. Entscheidend dafür sind kleine, gegenläufige RNAs. In *E. histolytica* wurde ein reichhaltiges Repertoire von asRNAs nachgewiesen. Diese besitzen überwiegend eine Länge von 27 nt und werden auf Grund ihres 5´-Polyphosphatterminus mit dem *E. histolytica* Argonaut Protein assoziiert. Das Silencing eines Gens, wird durch die asRNAs in Kombination mit dem Argonaut-Protein vermitteln (Suresh et al., 2016; Morf et al., 2013).

Grundlage für das Silencing in *E. histolytica* ist somit eine Gensequenz, zu der eine große Anzahl an kleinen asRNAs gebildet wird, wodurch die Expression dieses Gens in der Zelle unterdrückt wird. Diese Sequenz wird als Trigger-Sequenz bezeichnet und führt dazu, dass auch gegen ein daran fusioniertes Gen asRNAs gebildet werden. Das daraus resultierenden Silencing ist unabhängig von der Position der Trigger-Sequenz, erfordert aber die Transkription der fusionierten Trigger-Gen-Sequenz. Gene mit einer chromosomalen Kopie können trotz Verlust des episomalen Silencing-Plasmids stabil gesilenct werden, so dass die Bildung der asRNAs fortbesteht, unabhängig vom initiierenden Plasmid. Diese Persistenz von asRNAs deutet darauf hin, dass der chromosomale Locus in der Lage ist, die asRNA-Produktion aufrechtzuerhalten (Morf et al., 2013). Diese Silencing-Methode wurde mittlerweile auch auf *E. invadens* zugeschnitten und das damit erzielte Silencing wird ebenfalls bei der Transition von Trophozoiten zu Zysten aufrechterhalten (Suresh et al., 2016).

Zur Analyse der EhMP8-2 wurden in dieser Arbeit Transfektanten verwendet, welche das codierende Gen überexprimieren bzw. silencen. Da im Klon A1^{np} das Gen *ehmp8-2* stärker exprimiert wird als im Klon B2-5^p wurden somit die Expressionslevel der *ehmp8-2* in Überexpressions-Transfektanten im Klon B2-5p (B2-5^p MP8-2_ÜE) und in Silencing-Transfektanten im Klon A1^{np} (A1^{np} MP8-2_Si) analysiert. Mittels einer qPCR konnten die Überexpression und das Silencing des EhMP8-2 codierenden Gens in den entsprechenden Transfektanten verifiziert werden (siehe 4.1.2).

Da sich nicht alle Proteine in Amöben mit dem hier verwendeten System überexprimieren bzw. silencen lassen (Morf et al., 2013; Matthiesen et al., 2018) stellte dies die erste Voraussetzung für nachfolgende Analysen dar. Da gegen die Metalloprotease keine Antikörper zum Nachweis des Proteins verfügbar waren, konnte in der vorliegenden Arbeit nur eine erhöhte oder reduzierte Menge von mRNA des codierenden Gens nachgewiesen werden. Es wurde davon ausgegangen, dass dieser Sachverhalt auch zur gesteigerten oder verminderten Menge an aktivem Protein in den Trophozoiten führt. Die Auswirkungen wurden anschließend mit verschiedenen Assays analysiert.

5.2.2 Generierung und Verifizierung von *ehmp8-1-Silencing* -Transfektanten und *ehmp8-1/ehmp8-2* Doppelsilencern

Neben der EhMP8-2 existiert eine verwandte Metalloprotease, die EhMP8-1, in *E. histolytica*, welche sowohl im apathogenen Klon A1^{np}, als auch im pathogenen Klon B2^p exprimiert wird. Ihr wurde eine Beteiligung an den Prozessen Phagozytose, Motilität und Adhärenz zugesprochen (Teixeira et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transfektanten im Klon A1^{np} und B2-5^p generiert, in denen die *ehmp8-1* gesilenct vorliegt (A1^{np} MP8-1_Si und B2-5^p MP8-1_Si). Daneben wurden außerdem Doppelsilencer im Klon A1^{np} generiert, in denen die Expression der codierenden Gene für die EhMP8-1 und EhMP8-2 gesilenct wurde (A1^{np} MP8-1/-2_Si). Dieses Silencing wurde ebenfalls mittels qPCR bestätigt (siehe 4.4.2).

Um ein stabiles Silencing zu erreichen, welches durch den Verlust des initiierenden Silencing-Plasmids charakterisiert ist, ist eine Kultivierung der Trasfektanten über mehrere Wochen ohne Selektionsdruck notwendig. Erst dann ist die Transfektion mit einem weiteren Silencing-Plasmid möglich. Für die Generierung von Doppel- oder Mehrfachsilencern ist dieses Verfahren daher sehr langwierig und zeitlich limitiert. Da in dem apathogenen A1^{np} das RNAibasierte Silencing häufig fehlgeschlagen ist (Matthiesen et al., 2018), ist es umso erstaunlicher, dass sogar ein Doppelsilencing in diesem Klon erzielt werden konnte. Als Gründe für die unterschiedliche Wirksamkeit der Silencing-Methode werden die Eigenschaften des Klons (A1^{np}), der Trigger-Sequenz oder der Gene, die gesilenct werden sollen, vermutet. Darüber hinaus könnten auch epigenetische Faktoren existieren, die Schutz vor kleinen asRNAs vermitteln (Matthiesen et al., 2018).

5.2.3 Einfluss des Silencings der *ehmp8-2* und *ehmp8-2* auf verwandte Gene

Bei dem RNA-Interferenz-basierten Silencing wurden bereits *Off-target* Effekte zwischen Genen mit starker Sequenzhomologie beschrieben. Dadurch werden unbeabsichtigt auch andere mRNAs abgebaut, so dass es sich daher bei dieser Methode nicht um eine selektive Genabschaltung handelt (Putzbach et al., 2018). Dieser *Off-target* Effekt wurde auch in Bezug auf die Expression der beiden hier untersuchten Metalloproteasen ermittelt (siehe 4.4.2). Dabei wurde festgestellt, dass auch die Expression der *ehmp8-1* in den Transfektanten A1^{np} MP8-2_Si signifikant reduziert wurde. Dagegen wurde im Umkehrschluss gezeigt, dass das Silencing der *ehmp8-2* keinen Einfluss auf die Expression der *ehmp8-1* hat. Der Unterschied zwischen den beiden Silencing-Konstrukten besteht darin, dass zum Silencen der *ehmp8-1* lediglich die ersten 270 bp des codierenden Gens verwendet wurden, aber bei der *ehmp8-2* die komplette Gensequenz von 1989 bp. Es wurde bereits gezeigt, dass der Anfang eines Gens ausreicht, um dieses, vermittelt durch eine Trigger-Sequenz, zu silencen (Khalil et al., 2016). Möglicherweise führte die kürzere Gensequenz der *ehmp8-1* zu einem spezifischeren Silencing, wenn die asRNAs nur zu einem kompakten Bereich des Gens gebildet werden, weshalb die Expression der *ehmp8-2* nicht affektiert wurde.

5.2.4 Phänotypische Merkmale der Überexpressions- und Silencing-Transfektanten

Um den Einfluss der Metalloprotease EhMP8-2 auf die Überexpressions- und Silencing-Transfektanten zu untersuchen, wurden zunächst phänotypische Parameter beurteilt. Bei der Charakterisierung der verschiedenen Klone (A1^{np}, B2^p und B8^{np}) konnten Meyer und Kollegen (2016) bereits zeigen, dass diese Merkmale zwischen den Klonen unterschiedlich ausgeprägt werden. Die Trophozoiten des pathogenen Klons B2^p waren am größten und proliferierten am schnellsten. Dagegen war der apathogene Klon B8^{np} am beweglichsten, gefolgt von dem pathogenen Klon B2^p und dem apathogenen Klon A1^{np} (Meyer et al., 2016).

In Bezug auf die untersuchte Größe und Beweglichkeit der E. histolytica Transfektanten wur-

de kein Einfluss der Überexpression bzw. des Silencings der *ehmp8-2* festgestellt (siehe 4.4.1). Die von dem Klon B2^p abgeleiteten Trophozoiten waren insgesamt kleiner und beweglicher als die von dem Klon A1^{np} abstammenden Trophozoiten. Generell sind die in dieser Arbeit ermittelten Werte geringer als in der Publikation von Meyer et al. (2016), die Tendenzen stimmen jedoch überein (Meyer et al., 2016).

In einer Studie wurde gezeigt, dass die Mobilität der Trophozoiten durch die Abwesenheit der EhMP8-1 gesteigert wurde (Teixeira et al., 2012). Dies ließ sich jedoch für die verwandte EhMP8-2 nicht bestätigen.

Die *ehmp8-2-*überexprimierenden Transfektanten teilten sich signifikant schneller als die Kontrollen. Dieser Sachverhalt konnte im Umkehrschluss mit den Silencern jedoch nicht bestätigt werden. Eine erhöhte Proteaseaktivität durch die Überexpression der *ehmp8-2* könnte möglicherweise dazu führen, dass die Amöben mehr Nahrung aufnehmen können, die vor der Verwertung proteolytisch gespalten werden muss, was eine erhöhte Teilungsrate bewirken könnte.

5.2.5 Einfluss von Überexpression und Silencing der *ehmp8-2* auf Pathogenitätsindikatoren

Im Folgenden wurde der Einfluss der Überexpression des EhMP8-2-codierenden Gens, sowie das alleinige oder kombinierte Silencing der EhMP8-1- und EhMP8-2-codierenden Gene auf die jeweiligen Transfektanten untersucht. Dafür wurden verschiedene Assays durchgeführt, mit denen Pathogenitätsindikatoren untersucht wurden. Es handelt sich dabei um Eigenschaften der *E. histolytica* Trophozoiten, die mit der Pathogenität assoziiert sind, wie Cysteinproteaseaktivität, sowie Lyse und Phagozytose von Erythrozyten und eukaryotischen Zellen.

5.2.5.1 Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität

Für *E. histolytica* wurden unter anderen die Cysteinproteasen als wichtiger Pathogenitätsfaktor beschrieben (Faust et al., 2011; Ankri et al., 1999). Das *E. histolytica* Genom enthält eine Vielzahl von Genen (mindestens 50), die für Cysteinproteasen codieren. Die Mehrheit gehört davon der C1-Papain-Superfamilie an (Tillack et al., 2007).

Zur Beurteilung des Einflusses der *ehmp8*-2-Expression, sowie des Doppelsilencings beider Metalloproteasen auf die Aktivität der Cysteinproteasen der Transfektanten wurde ein Cysteinprotease-Assay durchgeführt. Die Aktivität der Cysteinproteasen wird dabei durch ihren Substratumsatz (Z-Arg-Arg-pNA) in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Da die EhMP8-2 aufgrund ihrer TMB in der Zellmembran vermutet wird, wurden die Lysate in lösliche und unlösliche Fraktionen unterteilt. Die Überexpression der *ehmp8*-2 führte zu einer signifikant höheren Cysteinproteaseaktivität in beiden Fraktionen, das Silencing der *ehmp8-2* zeigte nur in der unlöslichen Fraktion eine signifikante Reduktion der Cysteinproteaseaktivität. Die Doppelsilencer wiesen dagegen eine signifikant erhöhte Cysteinproteaseaktivitätin der löslichen Fraktion auf (siehe 4.4.3).

Grundsätzlich ist die Cysteinproteaseaktivität in den Trophozoiten, die von dem Klon B2^p abgeleitet wurden, höher als in den vom Klon A1^{np} abstammenden Trophozoiten. Dieses Ergebnis stimmt tendenziell mit den publizierten Cysteinproteaseaktivitäten der Klone überein, bei denen ebenfalls für den Klon B2^p die höchste Cysteinproteaseaktivität angegeben wurde (Meyer et al., 2016).

Unter Ausschluss der Doppelsilencer passen die Ergebnisse, bei denen die Überexpression der *ehmp8-2* eine gesteigerte Aktivität und das Silencing der *ehmp8-2* eine verminderte Aktivität der Cysteinproteasen induziert, zusammen.

Trotz der unterschiedlichen Familien, denen die Metallo- und Cysteinproteasen angehören, könnten sie sich gegenseitig beeinflussen. Zwar wurde noch kein direkter Zusammenhang zwischen Metallo- und Cysteinproteasen beschrieben, jedoch konnten beide Proteasen durch das Peptid β -Amyloid in humanen Makrophagen aktiviert werden (Castellano et al., 2014). Daneben wurde bereits postuliert, dass manche Cysteinproteasen sich gegenseitig prozessieren und miteinander gekoppelt sind (Tillack et al., 2006). Auch für Metalloproteasen wurde gezeigt, dass sie andere Metalloproteasen spalten und somit aktivieren können (Cui et al., 2017). Daher ist es durchaus denkbar, dass Metalloproteasen auch Cysteinproteasen beeinflussen können.

Die Doppelsilencer zeigten dagegen eine konträre Verschiebung, da in der löslichen Fraktion ihres Lysates eine erhöhte Cysteinproteasenaktivität gemessen wurde. Das legt die Vermutung nahe, dass die Amöbe andere Proteasen in größeren Mengen produziert, wenn zwei Metalloproteasen gleichzeitig ausfallen.

Bruchhaus et al. (2003) konnten nur für EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 die Expression unter Kulturbedingungen nachweisen, welche alleine für 90 % der gesamten Cysteinproteaseaktivität in Lysaten von axenisch kultivierten *E. histolytica* Trophozoiten verantwortlich sind (Bruchhaus et al., 2003). Somit resultiert die hier gemessene Aktivität nahezu nur aus diesen drei Cysteinproteasen.

Innerhalb der Zelle wurde die EhCP-A1 überwiegend in der Membranfraktion mit Oberflächenlokalisation beschrieben, wohingegen EhCP-A2 und EhCP-A5 sowohl Membran- als auch Zytoplasma-assoziiert sind (Meléndez-López et al., 2007a; Biller et al., 2009). Dadurch könnten die gemessenen Cysteinproteaseaktivitäten der löslichen Fraktion überwiegend auf die Aktivität der EhCP-A2 und EhCP-A5 zurückzuführen sein.

Um genauer zu untersuchen welche Cysteinproteasen für die verstärkte oder verminderte Cysteinproteaseaktivität verantwortlich ist, könnten diese eventuell durch spezifische Inhibitoren ausgeschaltet werden. Meléndez-López et al. beschrieben bereits 2007 ein als WRR483 bezeichnetes Molekül, welches spezifisch die EhCP1 inhibieren soll (MeléndezLópez et al., 2007b). Mit Hilfe eines Substratgels könnten darüber hinaus die spezifischen Aktivitätsbanden der einzelnen Cysteinproteasen analysiert werden. Dies würde eine exakte Beurteilung der beeinflussten Cysteinprotease erlauben.

Sollte das im Cysteinprotease-Assay als Substrat eingesetzt Z-Arg-Arg-pNA ebenfalls in durch die EhMP8-2 umgesetzt werden können, könnte darin die gemessene Aktivitätssteigerung in den *ehmp8-2*-überexprimierenden Transfektanten begründet liegen. Der dadurch zu erwartende inverse Effekt ließ sich durch die Silencing-Transfektanten jedoch nicht zeigen.

5.2.5.2 Bestimmung der Erythrophagozytose

Die außerordentliche phagozytische Aktivität der *E. histolytica* Trophozoiten gegenüber Erythrozyten wurde ebenfalls als einer der Pathogenitätsindikatoren dieses Parasiten beschrieben. Der Vergleich von *E. histolytica* mit der apathogenen Art *E. dispar* zeigte beispielsweise, dass ihr apathogener Phänotyp mit einer geringeren erythrophagozytischen Aktivität einhergeht (Talamás-Lara et al., 2014). Meyer und Kollegen (2016) zeigten dagegen im Vergleich der beiden apathogenen Klone A1^{np} und B8^{np} mit dem pathogenen Klon B2^p, dass dieser überraschender Weise die geringste Aktivität aufwies, Erythrozyten zu phagozytieren (Meyer et al., 2016).

In dieser Arbeit unterschied sich die gemessene Fähigkeit der Trophozoiten Erythrozyten zu phagozytieren kaum. Da alle untersuchten Trophozoiten eine ähnliche Aktivität zeigten, konnte auch kein diesbezüglicher Einfluss der Metalloproteasen beobachtet werden. Lediglich das alleinige Silencing der *ehmp8-1* im Klon A1^{np} rief einen signifikanten Effekt hervor (siehe 4.4.5). Diese Transfektanten phagozytierten signifikant mehr Erythrozyten als die Stammkultur A1^{np}.

Aufgrund der hohen Abweichung der gemessenen Werte sind weitere Wiederholungen des Versuchs erforderlich, um verlässlichere Aussagen treffen zu können.

5.2.5.3 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Über die hämolytische Aktivität wird ermittelt, in welchem Maße die Trophozoiten in der Lage sind Erythrozyten zu lysieren, wodurch ebenfalls ihre Pathogenität beeinflusst werden könnte.

Das Expressionslevel der beiden hier untersuchten Metalloproteasen zeigten einen signifikanten Einfluss auf die hämolytische Aktivität der Transfektanten (siehe 4.4.4). So führte die Überexpression der *ehmp8*-2 zu einer signifikant verstärkten hämolytischen Aktivität. Im Umkehrschluss reduzierte das Silencing der beiden Metalloproteasen (einzeln und in Kombination) im Klon A1^{np} jeweils die durch *E. histolytica* induzierte Hämolyse. Das alleinige Silencing der *ehmp8-1* im Klon B2^p zeigte keinen Effekt, da die Hämolyse der B-Klone bereits sehr gering ist, im Vergleich zu den vom Klon A1^{np} abgeleiteten Trophozoiten. Damit wurde auch der Unterschied zwischen den beiden Klonen, wie in der Veröffentlichung von Meyer et al. (2016) angegeben, als Tendenz bestätigt (Meyer et al., 2016).

Um das Resultat der gesteigerten hämolytischen Aktivität durch die putative Metalloprotease EhMP8-2 zu erklären, stellt sich zunächst die generelle Frage, ob die Hämolyse direkt durch die Metalloprotease hervorgerufen wird, oder diese beispielsweise ein weiteres Enzym aktiviert oder eine Komponente freilegt, welche wiederum die Lyse der Erythrozyten bewirkt. Um den direkten Einfluss der EhMP8-2 zu testen, könnte eventuell in einem weiteren Versuch das Amöbenlysat der Transfektanten mit zugehörigen Kontrollen mit Erythrozyten inkubiert und die hämolytische Aktivität beurteilen werden. Bereits 1987 untersuchten Said-Fernández und López-Revilla die hämolytische Aktivität von Amöbenlysaten. Sie identifizierten drei Komponenten in der vesikulären Fraktion, denen die Hauptaktivität im E. histolytica Lysat gegen Erythrozyten zugesprochen wurde (Said-Fernández und López-Revilla, 1988). Da es sich bei dieser Untersuchung nicht um intakte Amöben, sondern lediglich um verschiedene Fraktionen des Amönenlysates gehandelt hat, sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten. Der Effekt der im Lysat enthaltenen, weiteren Zellbestandteile sollte dabei nicht unterschätzt und vernachlässigt werden. Um den alleinigen Einfluss der Metalloproteasen beurteilen zu können, müssten diese rekombinant produziert werden und dann ohne weitere Komponenten auf die Erythrozyten gegeben werden. Als Kontrolle könnte man hierfür eine inaktive Variante des Proteins einsetzen.

Ein weiteres, mit der hämolytischen Aktivität von *E. histolytica* assoziiertes Protein stellt die mittlere (intermediär, I) Untereinheit des Gal/GalNAc-Lektins auf der Oberfläche von *E. histolytica* dar. Über dieses Gal/GalNAc-Lektin wird die Adhäsion der Trophozoiten an die Wirtszellen vermittelt und darüber hinaus wird es als wichtiger Pathogenitätsfaktor beschrieben. Von dieser GPI-verankerten 150 kDa Zwischenuntereinheit (Igl, 150 kDa) existieren zwei Isoformen, die als Igl1 und Igl2 bezeichnet werden. Der Expressionsgrad von Igl1 ist bei *E. histolytica* HM-1:IMSS etwa doppelt so hoch wie bei der apathogenen Art *E. dispar*, während der von Igl2 bei den beiden Arten vergleichbar ist. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass Igl1 mit der Pathogenität von *E. histolytica* assoziiert ist. Kato et al. (2017) haben festgestellt, dass Igl1 von *E. histolytica* sowohl hämolytische als auch zytotoxische Aktivitäten besitzt. Unter Verwendung des Gen-Silencings wurde die Expression von Igl1 in *E. histolytica* reduziert und die Wirkung auf die hämolytische Aktivität bewertet. Es konnte gezeigt werden, dass eine 40 % ige Reduktion der Igl1-Proteinexpression zu einem signifikanten Rückgang der hämolytischen Aktivität führte (Kato et al., 2017).

Es wäre denkbar, dass die in dieser Arbeit untersuchte Metalloprotease einen weiteren Akteur beeinflusst, welcher dann wiederum zur Förderung der Hämolyse führt. Wird also beispielsweise die oben beschriebene mittlere Untereinheit des Gal/GalNAc-Lektins freigelegt, könnte diese zur gesteigerten Hämolyse führen und der Effekt wäre nur indirekt auf die Anwesenheit der Metalloprotease zurückzuführen. Da sich wahrscheinlich beide Moleküle in der Membran der Trophozoiten befinden, ist für diese Theorie zumindest die räumliche Nähe der Moleküle gegeben.

In der Veröffentlichung von Meyer et al. (2016) wurde gezeigt, dass die Überexpression der *ehmp8-2* in den Trophozoiten von *E. histolytica* die ALA-Bildung im Tiermodell signifikant reduzierte. Somit führt das Vorhandensein der EhMP8-2 zu einem apathogenen Verhalten der Transfektanten und es besteht ein konträrer Zusammenhang zwischen ALA-Induktion und hämolytischer Aktivität (Meyer et al., 2016). Dies würde die oben beschriebene Theorie der IgI1 vermittelten Hämolyse stützen, da durch die Abspaltung der Untereinheit von dem als Pathogenitätsfaktor beschriebene Gal/GalNAc-Lektin dieses nicht mehr intakt ist und in einer reduzierten ALA-Bildung resultieren könnte.

Bei der ALA-Bildung handelt es sich um einen sehr komplexen Vorgang, an dem nicht nur die Amöben, sondern auch die Wirtszellen und vor allem das wirtseigene Immunsystem beteiligt sind. Die verstärkte Fähigkeit von Trophozoiten Erythrozyten zu lysieren könnte das Immunsystem des Wirts auch dahingehend manipulieren, dass ein ALA im Tiermodell schneller ausheilt. Aufgrund dieses komplexen Zusammenspiels vieler beteiligter Faktoren, ist noch weitere Forschung notwendig, um den Einfluss der Metalloprotease sowie der durch sie verursachten Hämolyse weiter aufzuklären.

Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um ein artifizielles Tiermodell und *in vitro* Assays handelt. Um Einflüsse auf die ALA-Bildung besser untersuchen zu können stellen künstliche Organe eine ethisch unumstrittenere Alternative zu Tierversuchen dar. Derartige künstliche Organe oder Organsegmente wie Lebersinusoide wurden bereits entwickelt um z. B. Medikamententoxizitäten zu analysieren (Lee et al., 2007; Beckwitt et al., 2018).

5.2.5.4 Bestimmung der Lyse und Phagozytose von THP1-Zellen

Die Lyse von pro- und eukaryotischen Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten wurde in der Literatur bereits ausgiebig beschrieben. Als Grund dafür werden vor allem die als Pathogenitätsfaktor identifizierten *Amoebapores* genannt. Dabei handelt es sich um eine Familie von kleinen amphipathischen Peptiden, die in der Lage sind, in bakterielle oder eukaryotische Membranen einzudringen und eine zelluläre Lyse zu verursachen (Zhang et al., 2004).

Zur Klärung der Frage, ob die Überexpression oder das Silencing der *ehmp8-2* in Trophozoiten von *E. histolytica* auch die Lyse von kernhaltigen Zellen beeinflusst, wurde die humane Monozytenzelllinie THP1 verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine humane Monozytenzelllinie, wie sie auch im Wirt vorkommen könnte. Somit wäre eine Begegnung zwischen Trophozoiten und Monozyten im Wirt durchaus denkbar und naturgetreu, weshalb diese Zelllinie ausgewählt wurde.

Jedoch wurden die THP1-Zellen generell nicht durch *E. histolytica* Trophozoiten lysiert und die *ehmp8-2*-überexprimierenden und -gesilencten Trophozoiten zeigten keinen Unterschied zu ihren Kontrollen (siehe 4.4.6).

Die EhMP8-1 wurde 2012 bereits von Teixeira et al. charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Silencing der *ehmp8-1* zu einer verstärkten Aufnahme, sowohl von lebenden als auch toten Jurkat Zellen führte (Teixeira et al., 2012).

Aufgrund dessen wurde nachfolgend mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob die Trophozoiten kernhaltige Zellen phagozytieren, statt zu lysieren. Dabei konnte den Metalloproteasen jedoch keine signifikante Auswirkung auf die Phagozytose von THP1-Zellen zugesprochen werden.

In der Literatur wird als Phagozytose vorrangig die Aufnahme von toten Zellen bezeichnet. Die Internalisierung von Fragmenten lebender Zielzellen wird als Markenzeichen der amöboiden Trogozytose (vom griechischen Trogo=Knabbern) beschrieben. Dieser Vorgang wurde auch zwischen Immunzellen beobachtet, aber die amöboide Trogozytose grenzt sich dahingehend ab, dass sie zum Tod der Zielzelle führt. Nach dem Absterben lösen sich die Trophozoiten ab und hören auf zu "schlucken". Die Aufnahme der Zellfragmente ist für den Zelltod erforderlich bzw. verantwortlich und trägt auch zur Invasion des Darmgewebes bei (Ralston et al., 2012).

Für kultivierte Trophozoiten, aber auch für Trophozoiten im Wirtsdarm ist die Nährstoffaufnahme durch endozytotischen Prozesse essentiell. Die meisten dieser Prozesse, wie Makropinozytose, Phagozytose und Trogozytose hängen von Phosphoinositiden und dem Aktin-Zytoskelett ab. Die Signalereignisse, die diese beiden Komponenten koppeln, sind in *E. histolytica* noch unvollständig verstanden und es ist nicht klar, wie sich die verschiedenen Prozesse auf molekularer Ebene voneinander unterscheiden (Somlata et al., 2017).

Die hier untersuchten Metalloproteasen scheinen demnach diese endozytären Prozesse von *E. histolytica* nicht zu beeinflussen.

Da bereits viele Fälle von Trogozytose durch *E. histolytica* beschrieben wurden, so zum Beispiel von Jurkat Zellen, CHO-Zellen oder einer epithelialen, kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie ist die Trogozytose von kernhaltigen Zellen per se möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Metalloprotease EhMP8-2 zwar nicht vollständig charakterisiert werden, jedoch wurde ein signifikanter Einfluss der *ehmp8*-2-Expression auf die hämolytische Aktivität der Transfektanten gezeigt. Darüber hinaus wurde auch die Aktivität der Cysteinproteasen durch die unterschiedliche Expression der *ehmp8*-2 beeinflusst. Um den Effekt der EhMP8-2 auf die *E. histolytica* Trophozoiten, sowie den Grund für eine geringere ALA-Induktion von *ehmp8*-2-überexprimierenden Trophozoiten genauer zu bestimmen müssen weiterführende Experimente folgen. Ein spezifischer Antikörper gegen die EhMP82 wäre dafür, sowie für die Lokalisationsbestimmung des Proteins von Vorteil. Ebenfalls wäre es von zentraler Bedeutung das Substrat dieses Enzyms zu identifizieren.

5.3 Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase

Im Genom von *E. histolytica* werden verschiedene ADHs codiert, von denen als erste der ADHs eine ADH1 charakterisiert wurde. Dabei handelt es sich um NADPH-abhängige Enzyme, wovon drei codierende Gene mit fast identischer Sequenz und eins mit 67 % Sequenzhomologie beschrieben wurden. Daneben sind sechs Gene codierend für eine weitere Gruppe von ADHs (ADH2) im Genom des Parasiten enthalten. Davon weisen fünf Gene die volle Länge und eins eine verkürzte Länge auf, wovon alle zwischen 98 und 100 % Sequenzidentität besitzen. Die weitere Gruppe von ADHs (ADH3) wird durch insgesamt 11 Gene codiert und weist eine 44-100 % ige Übereinstimmung der AS-Sequenz auf (Clark et al., 2007). ADHs sind für den anaeroben Parasiten *E. histolytica* unerlässlich, da es ihm an Mitochon-

ADHS sind für den anaeroben Parasiten *E. histolytica* unerlässlich, da es inm an Mitochondrien fehlt und er somit auf andere Art und Weise Energie gewinnen muss. Diese Energiegewinnung vollzieht der Parasit durch die Fermentation von Glukose. In den letzten Phasen dieses Weges wird Acetyl-CoA durch die enzymatischen Aktivitäten der Aldehyddehydrogenase und der ADH in Ethanol umgewandelt. Diese Funktionen sind beispielsweise in der EhADH2 fusioniert. Homologe von EhADH2 sind das AdhE-Enzym von *E. coli* und andere Enzyme von anaeroben und fakultativen anaeroben Bakterien, was auf eine Übertragung mittels lateralen Gentransfer hindeutet (Espinosa et al., 1997, 2009; Bruchhaus und Tannich, 1994)

Auch die Beteiligung von ADHs an der Pathogenität von *E. histolytica* wurde bereits mehrfach beschrieben. Bei vergleichenden Transkriptionsstudien zwischen *E. histolytica* und der als apathogenen Kommensale bezeichneten Art *E. dispar* wurde eine ADH3 identifiziert, deren Überexpression zu einer erhöhten Pathogenität der Trophozoiten führte (Davis et al., 2009). Daneben wurden in einer Proteomanalyse von *E. histolytica* Trophozoiten sekretorische Proteine analysiert, die eine wichtige Rolle bei der Invasion des Wirts, dem Stoffwechsel und der Verteidigung spielen. Dabei wurden ebenfalls mehrere ADHs identifiziert (Ujang et al., 2016).

Die hier zu charakterisierende putative ADH wurde bei transkriptionellen Vergleichen der apathogenen Klone A1^{np} und B8^{np} mit dem pathogenen Klon B2^p identifiziert. Das codierende Gen wird im Klon B8^{np} 3,5-fach stärker und im Klon A1^{np} 2,9-fach stärker exprimiert als in dem pathogenen Klon B2^p. Die Überexpression dieses Gens (EHI_088020) in B2^p führte zu einer signifikant reduzierten ALA-Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, so dass eine negative Korrelation zwischen Vorhandensein des Proteins und der ALA-Größe vorliegt (Meyer et al., 2016). In dieser Arbeit sollte daher der Einfluss dieser ADH näher charakterisiert werden.

5.3.1 Verifizierung von Überexpression und Silencing der adh

Die hier untersuchte ADH wird im Klon B8^{np} stärker exprimiert als im Klon B2^p. Somit wurden die überexprimierenden Transfektanten B2^p ADH_ÜE und die Silencer B8^{np} ADH_Si verwendet, um die Auswirkung der verstärkten oder verminderten *adh*-Expression auf die Transfektanten zu analysieren. Zunächst wurde mit Hilfe einer qPCR die Transkriptmenge des codierenden Gens untersucht und sowohl das Silencing als auch die Überexpression in den Transfektanten bestätigt (siehe 4.1.1).

Im Rahmen der Doktorarbeit von Martin Meyer (2016) wurden Antikörper gegen die ADH generiert, so dass die Überexpression und das Silencing auch auf Proteinebene mittels Westernblot Analyse gezeigt werden konnte. Dadurch war die Voraussetzung für weitere Analysen der *adh*-Überexpressions- und -Silencing-Transfektanten gegeben.

5.3.2 Einfluss des Silencings der adh auf verwandte Gene

Um auch bei dem Silencing der *adh* die bereits beschriebenen *Off-target* Effekte auf verwandte ADH-codierende Gene zu analysieren, wurde die Expression drei weiterer ADHcodierender Gene mit unterschiedlicher Sequenzhomologie in den *adh*-Silencing-Transfektanten mittels qPCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Silencing der *adh* großen Einfluss auf verwandte Gene hat, da diese auch gesilenct, bzw. ihre Transkription signifikant reduziert wurde. Die *adh* mit der größten Sequenzhomologie (79 %) wird in den Silencing-Transfektanten ebenfalls komplett gesilenct. Interessant ist bei der Beeinflussung jedoch, dass die *adh* mit 70 % Sequenzhomologie nicht affektiert wird, die *adh* mit der geringsten Sequenzhomologie (56 %) dagegen eine signifikante Expressionsminderung zeigte. Dabei handelt es sich zwar nicht um ein komplettes Silencing wie bei der *adh* mit der größten Sequenzhomologie, der Reduktionseffekt ist jedoch nicht von der Hand zu weisen. Das Silencing-Konstrukt der *adh* besteht aus der kompletten Gensequenz, fusioniert an die Trigger-Sequenz, so dass auch gegen die komplette Sequenz die kleinen asRNAs gebildet werden könnten. Diese scheinen somit besser an das Gen mit der höchsten und geringsten Sequenzhomologie zu passen.

Das Phänomen des Einflusses von RNAi-basiertem Silencing auf verwandte Gene wurde in der Literatur bereits beschrieben und auch in Bezug auf die Metalloproteasen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt (siehe 5.2.3).

5.3.3 Phänotypische Merkmale der Überexpressions- und Silencing-Transfektanten

Zur Bestimmung der Effekte der *adh*-Überexpression bzw. des *adh*-Silencings auf phänotypische Merkmal der Transfektanten wurden Parameter wie Größe, Beweglichkeit und Teilungsrate der Trophozoiten untersucht. Diese Parameter dienten auch zu näheren Charakterisierung der Klone A1^{np}, B2^p und B8^{np} (Meyer et al., 2016).

Es zeigte sich, dass nur in den Trophozoiten, in denen die *adh* gesilenct vorliegt ein signifikanter Größenunterschied zur Kontrolle bestand, wobei die vom B8^{np} Klon abgeleiteten Trophozoiten generell kleiner waren als die von dem Klon B2^p abstammenden Trophozoiten (siehe 4.5.1). Dieser Unterschied wurde bereits beschrieben (Meyer et al., 2016). Wodurch der Größenunterschied zwischen den Silencern und der Stammkultur bedingt wurde ist jedoch unklar.

In Bezug auf die Motilität der *E. histolytica* Trophozoiten konnte eine stärkere Beweglichkeit der *adh*-Silencer, verglichen mit ihrer Kontrolle verzeichnet werden. Generell sind die von dem Klon B8^{np} abgeleiteten Trophozoiten beweglicher als die vom Klon B2^p abstammenden Trophozoiten, was ebenfalls der veröffentlichten Tendenz entspricht (Meyer et al., 2016).

Die Teilungsraten stellten sich als annähern gleich zwischen allen vier untersuchten Klonen dar und wurden durch Unterschiede in der *adh*-Expression nicht beeinflusst.

5.3.4 Einfluss von Überexpression und Silencing der *adh* auf Pathogenitätsindikatoren

Des Weiteren wurde der Einfluss der *adh*-Überexpression und des *adh*-Silencings auf die jeweiligen Transfektanten untersucht. Dafür wurden verschiedene Assays durchgeführt, mit denen verschiedene Eigenschaften von *E. histolytica* Trophozoiten analysiert wurden. Zu diesen Pathogenitätsindikatoren zählte die Cysteinproteaseaktivität der Trophozoiten, sowie Lyse und Phagozytose von Erythrozyten.

5.3.4.1 Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität

Die als Pathogenitätsfaktor beschriebenen Cysteinproteasen wurden im Amöbenlysat der zu untersuchenden Transfektanten auf ihre Aktivität hin analysiert. Der dafür eingesetzte Cysteinproteaseassay zeigte, dass die Überexpression der *adh* keinen Einfluss hat, das Silencing hingegen zu einer reduzierten Cysteinproteaseaktivität im Lysat der Transfektanten führte (siehe 4.5.2). Generell wiesen die vom apathogenen Klon B8^{np} abgeleiteten Trophozoiten eine geringere Aktivität der Cysteinproteasen auf als die vom pathogenen Klon B2^p abstammenden Trophozoiten. Auch diese Tendenz wurde bereits von (Meyer et al., 2016) beschrieben.

In einer Studie von Shahi et al. (2019) wurde gezeigt, dass die enzymatische Aktivität von Cysteinproteasen durch das Silencing des EhCox-codierenden Gens in den Transfektanten erhöht wurde, obwohl keine erhöhte mRNA Konzentration des codierenden Gens nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EhCox in die Regulierung der Cysteinproteasen auf translationaler Ebene, unabhängig von der Transkription involviert ist und als negativer Regulator fungiert (Shahi et al., 2018). Auch das Silencing des codierenden Gens für ein hypothetisches Protein (EHI_127670) im pathogenen Klon B2^p führte zu einer signifikanten Reduktion der Cysteinproteaseaktivität in den Transfektanten (Haferkorn, 2018).

Somit scheinen die Cysteinproteasen eine Enzymgruppe darzustellen, welche stark von anderen Faktoren beeinflusst wird. Möglicherweise besteht somit auch eine Korrelation zwischen der ADH und den Cysteinproteasen, weshalb das Silencing der *adh* zu einer reduzierten Cysteinproteaseaktivität geführt hat. Um genauere Aussagen über die beeinflussten Cysteinproteasen treffen zu können würde sich auch hierbei ein Substratgel eignen.

5.3.4.2 Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Erythrophagozytose

Als weitere Pathogenitätsindikatoren wurde die Lyse und Phagozytose der *adh*-überexprimierenden und -gesilencten Trophozoiten untersucht. Im Gegensatz zu der Cysteinproteaseaktivität wurde weder die lytische noch die phagozytische Aktivität gegenüber Erythrozyten durch die Transfektanten in denen die *adh* überexprimiert oder gesilenct ist manipuliert (siehe 4.5.3). Im Allgemeinen lag die hämolytische Aktivität der untersuchten Trophozoiten die von dem Klon B8^{np} abstammen bei annähernd 0 %. Konträr dazu lysierten die vom pathogenen Klon B2^p abstammenden Klone mehr Erythrozyten, was schon 2016 von Meyer et al. publiziert wurde. Im Unterschied dazu wurde in der Veröffentlichung eine höhere Erythrophagozytose durch die Trophozoiten der Stammkultur B8^{np} als durch B2^p beschrieben. Dieser Unterschied konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Da die beiden Versuche mit anderen Assays durchgeführt wurden, könnte der Unterschied darin begründet liegen (Meyer et al., 2016).

5.3.5 Lokalisationsstudien

Auch die Lokalisation eines Proteins spielt in Bezug auf seine Funktionalität bzw. Eigenschaften eine große Rolle. Um Aussagen über die Lokalisation der ADH treffen zu können, wurden verschiedene Lokalisationsstudien durchgeführt.

5.3.5.1 Westernblot-Analyse

Zunächst wurde mittels Westernblot Analyse untersucht, inwiefern die ADH in der löslichen und/oder unlöslichen Fraktion des Amöbenlysates zu finden ist (siehe 4.5.4). Die ADH konnte dabei generell in den löslichen Fraktionen der untersuchten Amöbenlysate nachgewiesen werden, und nur in verschwindend geringen Mengen in der unlöslichen Fraktion der *adh*-überexprimierenden Trophozoiten. Möglicherweise ist bei der Beladung der SDS-PAGE etwas Probe in die benachbarte Tasche gelaufen, woraus das sehr schwache Signal resultieren könnte. Zudem zeigten die Überexpressions-Transfektanten eine deutlich stärkere Intensität der Banden, wodurch die Überexpression der *adh* erneut bestätigt wurde. Demnach kommt die ADH nur im Zytoplasma der Trophozoiten vor, wodurch das Ergebnis in der Dissertation von Meyer (2016) verifiziert wurde.

5.3.5.2 Immunfluoreszenzanalyse

Zur Lokalisation der ADH innerhalb der Trophozoiten wurde im Rahmen der Masterarbeit von Dirk Lercher (2017) die ADH mit einem Mcy-*Tag* versehen (siehe 4.5.5). Das Fusionsprotein (ADH-MCY) konnte daraufhin mit einem gegen den *Tag* gerichteten Antikörper in den überexprimierenden Trophozoiten lokalisiert werden. Dadurch konnte das Fusionsprotein sowohl auf der Plasmamembran in punktueller, clusterartigen Anordnung lokalisiert werden, als auch ubiquitär im Zytoplasma der Trophozoiten. Das Signal schien sich dabei im Plasmamembran-nahen Bereich zu akkumulieren und Vakuolen-assoziierte Bereiche auszusparen.

Daneben wurde die ADH auch mit spezifischen Antikörpern (Immunserum, generiert von Meyer, 2016) im Rahmen der Masterarbeit von Tina Wallaschkowski (2019) lokalisiert (siehe 4.5.5). Mit diesen spezifischen Antikörpern gegen die ADH konnte ebenfalls eine Lokalisation des Enzyms auf der Plasmamembran von überexprimierenden Trophozoiten in einzelnen Arealen beobachtet werden. Bei Saponin-behandelten Zellen die sich durch eine permeabilisierte Zellmembran auszeichnen, zeigte das Zytoplasma ebenfalls eine umfangreiche Färbung. Die IFA mit dem Präimmunserum zeigte dagegen kein nennenswertes Signal, wodurch die spezifische Bindung des Antikörpers bestätigt, und Kreuzreaktionen des Immunserums ausgeschlossen wurden.

Die cytosolische Lokalisation der ADH wurde sowohl mit dem Fusionsprotein ADH-MCY und Antikörpern gegen diesen *Tag*, als auch mit spezifischen Antikörpern gezeigt. Damit wurden die Ergebnisse der Dissertation von Martin Meyer (2016) reproduziert, in der ebenfalls eine zytosolische Lokalisation der ADH dargestellt wurde. Der Myc-*Tag* scheint die Lokalisation des Proteins somit nicht beeinflusst zu haben.

Unterschiede der drei Ergebnisse bestehen in der Oberflächenlokalisation des Proteins. So konnten in nicht allen Studien ein Nachweis über das Protein auf der Oberfläche erbracht werden. Allerdings wurde diese ADH auch bereits durch Proteomanalysen auf der Zelloberfläche von *E. histolytica* Trophozoiten nachgewiesen (Biller et al., 2014). Obwohl die ADH keine TMB besitzt wäre eine, zumindest temporäre, Oberflächenlokalisation damit belegt.

In einer vergleichenden Sekretom-Studie zwischen dem pathogenen *E. histolytica* Stamm HM-1:IMSS und dem nicht-pathogenen *E. histolytica* Stamm Rahman wurden auch sekretorischen Proteine ohne Signalpeptid identifiziert. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass diese Proteine nicht in einen Sekretionsprozess involviert sind, sondern Abbauprodukte darstellen. Alternativ könnte *E. histolytica* diese Proteine durch extrazelluläre Vesikel freisetzen, wie es metazoische Parasiten ausführen. In der Studie wurde unter anderem eine Alkoholdehydrogenase identifiziert, die verminderte Sekretion in dem nicht-pathogenen Rahman-Isolat aufwies (Ahn et al., 2018).

Für aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich einer möglichen Oberflächenlokalisation müssten deutlich mehr Trophozoiten analysiert werden. Außerdem muss beachtet werden, dass die ADH grundsätzlich in *E. histolytica* exprimiert wird, und auch die Stammkultur ein Signal in der IFA aufweist (Meyer, 2016).

Bei Lokalisierungsstudien einer EhADH3 mit polyklonalem Antiserum gegen rekombinante EhADH3 auf der Oberfläche von lebenden *E. histolytica* HM-1:IMSS Trophozoiten wurde eine Vorinkubation der anti-EhADH3-Antikörper mit rekombinanter EhADH3 vor dem Färben durchgeführt. Dies hemmte signifikant die Bindung der Antikörper an die Oberfläche der Trophozoiten (Davis et al., 2009). Dieser Ansatz der Vorinkubation des Antikörpers mit rekombinanter ADH könnte in weiterführenden Versuchen die Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper verifizieren.

5.3.6 Toleranz gegenüber Formaldehyd

Für die hier charakterisierte ADH wurde in vorangegangenen Studien (Meyer, 2016; Matthies, 2017; König, 2018) sowohl Acetaldehyd als auch Formaldehyd als Substrat identifiziert. Die jeweiligen Rückreaktionen mit den Alkoholpartnern (Methanol und Ethanol) konnte dagegen nicht gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass Formaldehyd und/oder Acetaldehyd durch intestinale Bakterien oder durch die Darmmukosa produziert wird und die ADH der Entgiftung dieser starken Reduktionsmittel dient. Weiterhin könnte die hier untersuchte ADH auch die Reaktionsprodukte anderer ADHs weiter metabolisieren.

In der Masterarbeit von Constantin König (2018) wurde zusätzlich gezeigt, dass die Lysate der Silencing-Transfektanten weniger Form- und Acetaldehyd umsetzten als die *adh*überexprimierenden Transfektanten sowie die dazugehörigen Kontrollen. Interessanter Weise zeigen nur die Lysate der *adh*-Silencer einen verminderten Formaldehydumsatz (König, 2018). Da das Silencing der *adh* auch zu einem Silencing bzw. einer reduzieren Expression von zwei weiteren ADH-codierenden Gene führt, könnte der Effekt darauf zurückzuführen sein. Die Auswirkung der alleinigen Überexpression dieser *adh* scheint unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht messbar gewesen zu sein.

Zur Beurteilung der Toleranz von *adh*-Überexprimierenden, lebenden Trophozoiten gegenüber Formaldehyd wurde in dieser Arbeit ihr Wachstum in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Formaldehyd im Vergleich zur Kontrolle bestimmt (siehe 4.5.6). Die *adh*-überexprimierenden Transfektanten konnten Formaldehyd im Medium besser tolerieren und zeigten eine stärkere Proliferation als die Trophozoiten der Kontrollgruppe. Dies bestätigt die Beteiligung der ADH an der Entgiftungsreaktion von Formaldehyd. In weiterführenden Versuchen könnte ebenfalls die Toleranz der *adh*-überexprimierenden Transfektanten gegenüber der Anwesenheit von Acetaldehyd untersucht werden um auch dieses Aldehyd als Substrat zu bestätigen.

In dieser Arbeit konnte die ADH nicht abschließend charakterisiert werden, es wurden jedoch Parameter identifiziert (Größe, Motilität und Cysteinproteaseaktivität der Transfektanten) auf die das Silencing der *adh* Einfluss nimmt. Die Lokalisation der ADH konnte im Zytoplasma, sowie punktuell auf der Oberfläche der Trophozoiten gezeigt werden. Darüber hinaus konnte Formaldehyd als eins der Substrate dieser ADH verifiziert werden. Weiterführende Experimente könnten zusätzliche Parameter identifizieren, welche durch die ADH beeinflusst werden. Dadurch könnte die Ursache für eine geringere ALA-Induktion von *adh*überexprimierenden Trophozoiten bestimmt werden.

6 Zusammenfassung & Abstract

6.1 Zusammenfassung

Entamoeba histolytica ist ein protozoischer Parasit und der Erreger der Amöbiasis. Warum es jedoch nur in ca. 10 % der Infektionen zu einer klinischen Manifestation in Form einer invasiven Amöbiasis und nur in 1 % der Fälle zu einer extra-intestinalen Verlaufsform kommt, ist noch unklar. Bisher wurden Cysteinproteasen, Amoebapores und das Gal/GalNAc-Lektin als wichtigste Pathogenitätsfaktoren dieses intestinalen Parasiten identifiziert. Ferner wurden vergleichende Studien zwischen verschiedenen pathogenen und apathogenen Isolaten durchgeführt, um weitere, putative Faktoren zu identifizieren, welche in die Pathogenese von E. histolytica involviert sein könnten. Darüber hinaus wurden vergleichende Transkriptomstudien von apathogenen und pathogenen Zelllinien bzw. davon abgeleiteten Klonen durchgeführt. Diese stammen von dem Isolat HM-1:IMSS ab und zeichnen sich durch einen identischen genetischen Hintergrund aus. Als Pathogenität wird hierbei die Fähigkeit der Amöben definiert, nach intrahepatischer Injektion im Tiermodell (Meriones unguiculatus und Mus musculus) einen Amöbenleberabszess (ALA) auszubilden. Die Zelllinie A konnte keinen ALA induzieren und auch die aus dieser apathogenen Zelllinie A abstammenden Klone zeigten alle denselben apathogenen Phänotyp. Dagegen zeichnen sich die Klone, welche aus der pathogenen Zelllinie B generiert wurden durch ein hoch diverses Pathogenitätsverhalten aus.

Durch die Gegenüberstellung der Transkriptomanalysen der apathogenen Klone A1^{np} und B8^{np} gegenüber dem pathogenen Klon B2^p wurden mehrere differentiell exprimierte Gene identifiziert, wovon einige in nachfolgenden Experimenten in *E. histolytica* Trophozoiten überexprimiert wurden. Durch diese verstärkte Expression konnten zwei Gene identifiziert werden, deren Überexpression im pathogenen Klon B2^p mit einer Reduktion der Pathogenität einherging, so dass eine inverse Korrelation zwischen dem Vorhandensein des Proteins und induzierter ALA-Bildung vorliegt.

In der vorliegenden Dissertation sollten diese beiden Proteine, eine Metalloprotease (EhMP8-2) und eine Alkoholdehydrogenase (ADH) näher charakterisiert werden. Dafür standen *E. histolytica*-Transfektanten zur Verfügung, in denen die entsprechenden Gene (*adh* und *ehmp8-2*) entweder überexprimiert oder gesilenct wurden, um deren Einfluss auf verschiedene Merkmale genauer zu analysieren. Die dafür verwendete Silencing-Methode basiert auf dem Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi), bei der ein Einfluss auf Gene mit hoher Sequenzhomologie allerdings nicht auszuschließen war. Daher wurde untersucht, ob die verwendeten Silencing-Transfektanten einen Einfluss auf Gene mit Sequenzhomologie aufweisen. Das Silencing der *adh* in dem apathogenen Klon B8^{np} führte zu einem Silencing eines Gens mit 79 % Sequenzhomologie und einer signifikanten Reduktion der Expression eines Gens mit nur 56 % Sequenzhomologie. Daneben bewirkte auch das Silencing der *ehmp8*-2 in dem apathogenen Klon A1^{np} eine signifikant reduzierte Expression der verwandten *ehmp8*-1, welche eine Sequenzhomologie von 57 % aufweist.

Aufgrund dieses relativ unspezifischen Silencings wurde versucht, das Gen-Silencing mittels CRISPR/Cas-System in *E. histolytica* zu etablieren. Zur Etablierung dieses Systems wurde zunächst das codierende Gen einer Cysteinprotease (EhCP-A1) ausgewählt, da einige geeignete Analysemethoden zur Verfügung stehen, um den Einfluss einer veränderten Genexpression zu untersuchen.

Als erster Ansatzpunkt wurde die Expression eines Cas9-codierenden Gens durch den Parasiten untersucht, wobei nur die Transkription und nicht die Translation bzw. Aktivität der Cas9 nachgewiesen werden konnte. Überdies wurde eine weitere Herangehensweise getestet, bei der ein Komplex in die Trophozoiten transfiziert wurde, der alle für das CRISPR/Cas-System benötigten Komponenten (rekombinante Cas9, Fluoreszenz-markierte tracrRNA und sequenzspezifische crRNA) enthielt. Mittels FACS-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie wurde bestätigt, dass dieser Komplex in die Zelle gelangt ist, aber weder die Sequenzierung noch ein *Genome Editing Detection* Assay lieferten ein eindeutiges Ergebnis bezüglich einer Mutation im Zielgen *ehcp-a1*. Auch durch die Verwendung etablierter Aktivitätstests - Substratgel und Cysteinprotease-Assay - konnte eine verminderte Aktivität des codierten Proteins EhCP-A1 nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass das CRISPR/Cas-System in *E. histolytica* prinzipiell für die genetische Manipulation des protozoischen Parasiten eingesetzt werden könnte, jedoch müssten sowohl einige Parameter noch optimiert und geeignetere Methoden zur Überprüfung des Silencings etabliert werden. Aufgrund der für *E. histolytica* noch nicht vollständig etablierten CRISPR/Cas-Methode wurden demzufolge die putativen Pathogenitätsfaktoren (EhMP8-2 und ADH) mit den vorhandenen Silencing-Transfektanten charakterisiert, bei denen das Silencing durch RNAi erzielt wurde.

Weder die Überexpression noch das Silencing der *ehmp8-2* in den Transfektanten beeinflusste die untersuchten phänotypischen Parameter Größe und Mobilität sowie die Pathogenitätsindikatoren Erythrophagozytose, Lyse und Phagozytose von THP1-Zellen. Allerdings zeigten die *ehmp8-2*-überexprimierenden Transfektanten in der löslichen und unlöslichen Fraktion des Lysates eine signifikant erhöhte Cysteinproteaseaktivität, während *ehmp8-2*gesilencte Transfektanten eine signifikant geringere Cysteinproteaseaktivität in der unlöslichen Fraktion des Lysates aufwiesen. Zudem konnte ein Einfluss der *ehmp8-2*-Expression auf die hämolytische Aktivität der Transfektanten nachgewiesen werden. Die *ehmp8-2*-überexprimierenden Transfektanten zeigten eine signifikant erhöhte und die *ehmp8-2*-gesilencten Transfektanten eine signifikant reduzierte hämolytische Aktivität. Das Silencing der verwandten *ehmp8-1* reduzierte ebenfalls die Fähigkeit der Transfektanten, Erythrozyten zu lysieren.

Des Weiteren konnten erfolgreich Doppel-Silencer generiert werden, in denen sowohl das

codierende Gen für die EhMP8-2, als auch für die EhMP8-1 im apathogenen Klon A1^{np} gesilenct vorliegt. Durch das Silencing beider Metalloproteasen-codierender Gene wurde die hämolytische Aktivität der Transfektanten jedoch nicht weiter reduziert als bereits durch das alleinige Silencing einer der beiden Gene. Ferner führte das Doppel-Silencing zu einer signifikant verstärkten Cysteinproteaseaktivität der löslichen Lysatfraktion der Transfektanten.

Die näheren Analysen der *adh*-überexprimierenden und -gesilencten Transfektanten haben gezeigt, dass das Silencing der *adh* zu größeren, beweglicheren Trophozoiten führte, die eine geringere Aktivität der Cysteinproteasen aufwiesen. Die Teilungsrate und die Fähigkeit zur Lyse oder Phagozytose von Erythrozyten der Transfektanten wurden weder durch die Überexpression noch durch das Silencing der *adh* beeinflusst. Durch Westernblot- und Immunfluoreszenzanalysen mit verschiedenen Antikörpern konnte die Lokalisation der ADH im Zytoplasma bestätigt werden. Ebenfalls wurde die ADH punktuell auf der Oberfläche der Trophozoiten nachgewiesen. Darüber hinaus konnte Formaldehyd als eins der Substrate dieser ADH verifiziert werden, da die *adh*-überexprimierenden Trophozoiten den Zusatz von Formaldehyd im Medium besser tolerieren konnten und eine stärkere Proliferation zeigten als die Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die EhMP8-2 und ADH einen Einfluss auf die pathogenitätsbezogenen Eigenschaften der Trophozoiten haben. Bis jedoch ein spezifisches CRISPR/Cas-basiertes Silencing für *E. histolytica* etabliert ist, um die Wirkung bestimmter Gene zu identifizieren, ist das RNAi-basierte Silencing sowie klassische Überexpression von Pathogenitätsfaktoren immer noch das Mittel der Wahl, um die Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* zu charakterisieren.

6.2 Abstract

Entamoeba histolytica is a protozoan parasite and the causative agent of amoebiasis. However, it is still unclear why a clinical manifestation in the form of invasive amoebiasis occurs only in approximately 10 % of infections and why an extra-intestinal progression occurs only in 1 % of cases. Cysteine proteases, amoebapores and Gal/GalNAc specific lectin have been identified as the most important pathogenicity factors. Furthermore, comparative transcriptome and proteome studies of different pathogenic and non-pathogenic isolates were performed to identify further putative factors that might be involved in the pathogenesis of *E. histolytica*. Recently comparative transcriptome studies of non-pathogenic and pathogenic cell lines and clones with an identical genetic background which were derived from the isolate HM-1:IMSS were conducted. In this approach, pathogenicity is defined as the ability of the amoebae to induce an amoebic liver abscess (ALA) after intrahepatic injection in the

animal model (*Meriones unguiculatus* and *Mus musculus*). Non-pathogenic cell line A could not induce ALA, and all clones derived from this non-pathogenic cell line A showed the same non-pathogenic phenotype. On the contrary, the clones generated from the pathogenic cell line B showed a highly diverse pathogenic behavior.

By comparing the transcriptome analysis of the non-pathogenic clones A1^{np} and B8^{np} with the pathogenic clone B2^p, several differentially expressed genes were identified. Some of them were overexpressed in further experiments in *E. histolytica* trophozoites. By this increased expression two genes could be identified, whose overexpression in the pathogenic clone B2^p was associated with a reduction of pathogenicity. An inverse correlation between the presence of the protein and induction of ALA formation could be observed.

In this thesis, these two proteins, a metallo protease (EhMP8-2) and an alcohol dehydrogenase (ADH), should be characterized in detail. *E. histolytica* transfectants in which the corresponding genes (*adh* and *ehmp8-2*) were either overexpressed or silenced were used to analyze the influence of these two genes on various parameters. The applied silencing method was based on the principle of RNA interference, but this method can influence other genes with high sequence homology, leading to an unspecific silencing. Therefore, it was tested if RNA interference has an influence on genes with a sequence homology in the silencing transfectants.

The silencing of *adh* in the non-pathogenic clone B8^{np} led to a silencing of a gene with 79 % sequence homology and a significant reduction of the expression of a gene with only 56 % sequence homology. In addition, the silencing of *ehmp8-2* in the non-pathogenic clone A1^{np} caused a significantly reduced expression of the related *ehmp8-1*, which has a sequence homology of 57 %.

Because of this more unspecific silencing, a more specific approach was needed and it was tried to establish gene silencing via the CRISPR/Cas system in *E. histolytica*. As a proof of principle and due to various analyzing methods available to test the influence of gene expression a cysteine protease (EhCP-A1) was selected to be silenced by CRISPR/Cas.

After introducing the Cas9 coding gene into the parasite it was possible to show that a successful transcription was achieved but not a translation of *cas9*. Also an activity of Cas9 could not be detected. Hence, another approach was tested in which a complex containing all components (recombinant Cas9, fluorescence labelled tracrRNA and sequence-specific crRNA) required for the CRISPR/Cas system was transfected into the trophozoites. Via FACS analysis and fluorescence microscopy it was confirmed that this complex entered the cell, but neither sequencing nor a Genome Editing Detection Assay provided a distinct result regarding a mutation in the target gene *ehcp-a1*. By using established activity tests - a substrate gel and cysteine protease assay - a reduced activity of the encoded protein EhCP-A1 could not be clearly detected.

It could be shown that the CRISPR/Cas system in *E. histolytica* could in principle be used for the genetic manipulation of the protozoan parasite but many parameters have yet to be

optimized and better methods for the verification of the silencing need to be established. Due to the not yet fully established CRISPR/Cas method for *E. histolytica*, the EhMP8-2 and ADH were therefore characterized using the existing silencing transfectants in which silencing was achieved by RNA interference.

Neither for overexpression nor for silencing of the *ehmp8-2* in the transfectants an influence on the investigated phenotypic parameters size and mobility, as well as pathogenicity indicators erythrophagocytosis, lysis and phagocytosis of THP1 cells could be shown. However, *ehmp8-2* overexpressing transfectants showed in the soluble and insoluble lysate fraction a significantly increased cysteine protease activity, while *ehmp8-2* silenced transfectants showed significantly lower cysteine protease activity in the insoluble lysate fraction. Interestingly, an influence on hemolytic activity could be demonstrated. It could be shown that the ability of transfectants to lyse erythrocytes was significantly increased in *ehmp8-2*-silenced transfectants. The silencing of the related *ehmp8-1* also leads to a reduction in hemolytic activity.

Furthermore, double silencers were successfully generated in which the coding genes for EhMP8-2 and EhMP8-1 were both silenced in the nonpathogenic clone A1^{np}. However, the silencing of both metallo protease coding genes did not further reduce the hemolytic activity of the transfectants than the individual silencing of one of the two genes. Moreover, double silencing induced a significant increase of the cysteine protease activity of the soluble lysate fraction.

More detailed analysis of *adh* transfectants showed that silencing of the *adh* led to trophozoites being larger, proliferating faster and having lower cysteine protease activity. The division rate and the ability to lyse or phagocytose erythrocytes of transfectants were not affected by overexpression or silencing of *adh*. Western blot analysis as well as immunofluorescence analysis with different antibodies confirmed the localization of ADH in the cytoplasm as well as punctually on the surface of trophozoites. In addition, formaldehyde could be verified as one of the substrates of this ADH, as the *adh* overexpressing trophozoites tolerated formaldehyde in the medium better and showed a stronger proliferation than the control trophozoites.

To sum up, this results show that the EhMP8-2 and ADH have an impact on pathogenicityrelated characteristics of the trophozoites. But until a specific CRISPR/Cas silencing is established for the protozoan *E. histolytica* to identify the effect of certain genes, silencing via RNA interference or classic overexpression of pathogenicity factors is still the tool of choice to analyze the pathogenicity of *E. histolytica*.

7 Ausblick

Bei der komplexen Interaktion von Mensch und *E. histolytica* wurden sowohl auf der Seite des Wirts, als auch auf der Seite des Parasiten bereits Faktoren identifiziert, die maßgeblich an der Entstehung eines ALAs beteiligt sind. Zur Charakterisierung weiterer, putativer Pathogenitätsfaktoren des Parasiten ist die Möglichkeit einer genetischen Manipulation des Organismus von zentraler Bedeutung. Das CRISPR/Cas-System bietet dafür sehr vielseitige Einsatzmöglichkeiten.

In dieser Arbeit konnte das Gen-Silencing mittels CRISPR/Cas zwar nicht vollständig etabliert werden, es wurde jedoch die Basis für nachfolgende Versuche gelegt. Ein vielversprechender Ansatzpunkt stellt die Transfektion mit einem RNP-Komplex dar, wodurch bereits alle benötigten Komponenten des CRISPR/Cas-Systems einsatzbereit in die Zelle gelangen. Zielführend stellt sich dafür die Optimierung der Transfektionsparameter dar, um eine möglichst hohe Transfektions- und Mutationseffizienz zu erzielen. Die Wahl des Zielgens und die Schnittstelle stellen die Voraussetzung für einer Mutation und ihre Detektion dar. Liegt die Schnittstelle beispielsweise in der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzyms, lässt sich eine Mutation darüber problemlos nachweisen. Aktivitätsassays des codierten Proteins und spezifische Antikörper könnten ebenfalls der Verifizierung einer erfolgreichen, CRISPR/Cas-vermittelten Mutation dienen.

Zur Charakterisierung der EhMP8-2 und der ADH, die als putative Pathogenitätsfaktoren identifiziert wurden, wurden in dieser Arbeit Überexpressions- und Silencing-Transfektanten verwendet. Da noch keine Silencing-Trasfektanten mittels CRISPR/Cas System generiert werden konnten, wurde hierfür eine RNAi-basierte Methode verwendet, welche auch teilweise die Expression verwandter Gene beeinflusst. Um das gesamte Ausmaß an beeinflussten und möglicherweise zusammenhängenden Genexpressionen beurteilen zu können, könnten die Transkriptome zwischen gesilencten Transfektanten und der Stammkultur verglichen werden.

Der EhMP8-2 konnte ein starker Einfluss auf die hämolytische Aktivität der überexprimierenden und gesilencten Transfektanten zugesprochen werden. Für weiterführende Analysen der *ehmp8*-2-Transfektanten, sowie zur Bestimmung der Lokalisation und damit zusammenhängenden Funktionen des Proteins, könnten spezifische Antikörper dienen.

Mit der Perspektive kombinatorische Effekte analysieren zu können, stellt die erfolgreiche Generierung von Doppelsilencern, in denen die Expression von zwei Genen gesilenct wurde, die Grundlage dar. Zur Analyse von Zusammenhängen zwischen verschiedenen Proteinen, bietet sich auch die Überexpression in Transfektanten an, die bereits ein Gen stabil silencen. Dadurch könnten auch weitere putative Pathogenitätsfaktoren näher charakterisiert werden, deren Überexpression in vorangegangenen Studien entweder im pathogenen Klon zu einer reduzierten Pathogenität, oder in apathogenen Klonen zu einer verstärkten

ALA-Bildung führte.

Um diese Effekte auch auf die ALA-Bildung untersuchen zu können stellen künstliche Organe eine ethisch unumstrittenere Alternative zu Tierversuchen dar. Somit könnten die Einflüsse der genetischen Manipulation auf das komplexe System von Mensch und Parasit besser und realistischer analysiert werden, als mit Zellkultur-basierten Assays.

Literaturverzeichnis

- M. Adli. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*, 9(1):1911, 05 2018.
- C. S. Ahn, J. G. Kim, M. H. Shin, Y. A. Lee, und Y. Kong. Comparison of Secretome Profile of Pathogenic and Non-Pathogenic Entamoeba histolytica. *Proteomics*, 18(7):e1700341, Apr 2018.
- J. Andrä, O. Berninghausen, und M. Leippe. Membrane lipid composition protects Entamoeba histolytica from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett.*, 564(1-2):109– 115, Apr 2004.
- S. Ankri, T. Stolarsky, R. Bracha, F. Padilla-Vaca, und D. Mirelman. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects Entamoeba histolytica-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect. Immun.*, 67(1):421–422, Jan 1999.
- J. Athey, A. Alexaki, E. Osipova, A. Rostovtsev, L. V. Santana-Quintero, U. Katneni, V. Simonyan, und C. Kimchi-Sarfaty. A new and updated resource for codon usage tables. *BMC Bioinformatics*, 18(1):391, Sep 2017.
- C. Aurrecoechea, A. Barreto, J. Brestelli, B. P. Brunk, E. V. Caler, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. T. Kraemer, W. Li, V. Nayak, C. Pennington, D. F. Pinney, B. Pitts, D. S. Roos, G. Srinivasamoorthy, C. J. Stoeckert, C. Treatman, und H. Wang. AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue):D612–619, Jan 2011.
- S. Bae, J. Park, und J. S. Kim. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10): 1473–1475, May 2014.
- R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, und P. Horvath. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819):1709–1712, Mar 2007.
- C. H. Beckwitt, A. M. Clark, S. Wheeler, D. L. Taylor, D. B. Stolz, L. Griffith, und A. Wells. Liver 'organ on a chip'. *Exp. Cell Res.*, 363(1):15–25, 02 2018.
- P. Bharti, P. Jyoti, P. Kapoor, V. Sharma, V. Shanmugam, und S. K. Yadav. Host-Induced Silencing of Pathogenicity Genes Enhances Resistance to Fusarium oxysporum Wilt in Tomato. *Mol. Biotechnol.*, 59(8):343–352, Aug 2017.
- G. Bicalho Nogueira, L. V. Dos Santos, C. B. de Queiroz, T. L. Ribeiro Correa, R. Pedrozo Menicucci, D. M. Soares Bazzolli, E. F. de Araujo, und M. V. de Queiroz. The histidine kinase slnCl1 of Colletotrichum lindemuthianum as a pathogenicity factor against Phaseolus vulgaris L. *Microbiol. Res.*, 219:110–122, Feb 2019.
- L. Biller, H. Schmidt, E. Krause, C. Gelhaus, J. Matthiesen, G. Handal, H. Lotter, O. Janssen, E. Tannich, und I. Bruchhaus. Comparison of two genetically related Entamoeba histolytica cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. *Proteomics*, 9(17):4107–4120, Sep 2009.

- L. Biller, J. Matthiesen, V. Kuhne, H. Lotter, G. Handal, T. Nozaki, Y. Saito-Nakano, M. Schumann, T. Roeder, E. Tannich, E. Krause, und I. Bruchhaus. The cell surface proteome of Entamoeba histolytica. *Mol. Cell Proteomics*, 13(1):132–144, Jan 2014.
- J. Blessmann, I. K. Ali, P. A. Nu, B. T. Dinh, T. Q. Viet, A. L. Van, C. G. Clark, und E. Tannich. Longitudinal study of intestinal Entamoeba histolytica infections in asymptomatic adult carriers. J. Clin. Microbiol., 41(10):4745–4750, Oct 2003.
- Marina Borschiwer. Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems im Epha4-Lokus von embryonalen Stammzellen, 2014.
- L. M. Bredeston, C. E. Caffaro, J. Samuelson, und C. B. Hirschberg. Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of Entamoeba histolytica. *J. Biol. Chem.*, 280(37):32168–32176, Sep 2005.
- I. Bruchhaus und E. Tannich. Purification and molecular characterization of the NAD(+)dependent acetaldehyde/alcohol dehydrogenase from Entamoeba histolytica. *Biochem. J.*, 303 (Pt 3):743–748, Nov 1994.
- I. Bruchhaus, B. J. Loftus, N. Hall, und E. Tannich. The intestinal protozoan parasite Entamoeba histolytica contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryotic Cell*, 2(3):501–509, Jun 2003.
- G. Burchard und E. Tannich. Amoebiasis. Deutsches Ärzteblatt, 101, 2004.
- J. Castellano, L. Badimon, und V. Llorente-Cortes. Amyloid-*β* increases metallo- and cysteine protease activities in human macrophages. *J. Vasc. Res.*, 51(1):58–67, 2014.
- A. I. Cederbaum. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*, 16(4):667–685, Nov 2012.
- A. Chihi, C. R. Stensvold, I. Ben-Abda, R. Ben-Romdhane, K. Aoun, E. Siala, und A. Bouratbine. Development and evaluation of molecular tools for detecting and differentiating intestinal amoebae in healthy individuals. *Parasitology*, pages 1–7, Jan 2019.
- C. G. Clark, U. C. Alsmark, M. Tazreiter, Y. Saito-Nakano, V. Ali, S. Marion, C. Weber, C. Mukherjee, I. Bruchhaus, E. Tannich, M. Leippe, T. Sicheritz-Ponten, P. G. Foster, J. Samuelson, C. J. Noel, R. P. Hirt, T. M. Embley, C. A. Gilchrist, B. J. Mann, U. Singh, J. P. Ackers, S. Bhattacharya, A. Bhattacharya, A. Lohia, N. Guillen, M. Duchene, T. Nozaki, und N. Hall. Structure and content of the Entamoeba histolytica genome. *Adv. Parasitol.*, 65:51–190, 2007.
- S. N. Cohen, A. C. Chang, und L. Hsu. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69(8):2110–2114, Aug 1972.
- L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, und F. Zhang. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121):819–823, Feb 2013.
- F. E. Cox. History of Human Parasitology. Clin. Microbiol. Rev., 15(4):595-612, Oct 2002.
- N. Cui, M. Hu, und R. A. Khalil. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 147:1–73, 2017.

- P. H. Davis, J. Schulze, und S. L. Stanley. Transcriptomic comparison of two Entamoeba histolytica strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 151(1):118–128, Jan 2007.
- P. H. Davis, M. Chen, X. Zhang, C. G. Clark, R. R. Townsend, und S. L. Stanley. Proteomic comparison of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar and the role of E. histolytica alcohol dehydrogenase 3 in virulence. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(4):e415, 2009.
- D.D. Despommier und P.J. Gwadz, R.W.and Hotez. *Parasitic Diseases*. Springer-Verlag, New York, 1995.
- H. Deveau, R. Barrangou, J. E. Garneau, J. Labonte, C. Fremaux, P. Boyaval, D. A. Romero, P. Horvath, und S. Moineau. Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus. *J. Bacteriol.*, 190(4):1390–1400, Feb 2008.
- M. A. DeWitt, W. Magis, N. L. Bray, T. Wang, J. R. Berman, F. Urbinati, S. J. Heo, T. Mitros, D. P. Munoz, D. Boffelli, D. B. Kohn, M. C. Walters, D. Carroll, D. I. Martin, und J. E. Corn. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med*, 8(360):360ra134, 10 2016.
- M. A. DeWitt, J. E. Corn, und D. Carroll. Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. *Methods*, 121-122:9–15, 05 2017.
- L. S. Diamond, D. R. Harlow, und C. C. Cunnick. A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72(4):431–432, 1978.
- L. Eichinger und A. A. Noegel. Comparative genomics of Dictyostelium discoideum and Entamoeba histolytica. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8(5):606–611, Oct 2005.
- S. Elleuche, K. Fodor, B. Klippel, A. von der Heyde, M. Wilmanns, und G. Antranikian. Structural and biochemical characterisation of a NADâ?^o-dependent alcohol dehydrogenase from Oenococcus oeni as a new model molecule for industrial biotechnology applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(20):8963–8975, Oct 2013.
- A. Espinosa, L. Wang, E. Li, und S. L. Stanley. Expression of the alcohol dehydrogenase (ADH) domain of Entamoeba histolytica EhADH2 enzyme. *Arch. Med. Res.*, 28 Spec No: 78–80, 1997.
- A. Espinosa, G. Perdrizet, G. Paz-Y-Mino C, R. Lanfranchi, und M. Phay. Effects of iron depletion on Entamoeba histolytica alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) and trophozoite growth: implications for antiamoebic therapy. J. Antimicrob. Chemother., 63(4):675–678, Apr 2009.
- D. M. Faust, J. Marquay Markiewicz, J. Santi-Rocca, und N. Guillen. New insights into host-pathogen interactions during Entamoeba histolytica liver infection. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 1(1):10–18, Mar 2011.
- Y. Fedorov, E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall, und A. Khvorova. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. RNA, 12(7):1188–1196, Jul 2006.

- L. Q. Ge, H. T. Gu, X. Li, S. Zheng, Z. Zhou, H. Miao, und J. C. Wu. Silencing of triazophosinduced Hexokinase-1-like reduces fecundity in Nilaparvata lugens (Stål) (Hemiptera: Delphacidae). *Pestic Biochem Physiol*, 153:176–184, Jan 2019.
- R. L. Guerrant. Amebiasis: Introduction, Current Status, and Research Questions. *Rev. Infect. Dis.*, 8(2):218–227, 1986.
- Anne Haferkorn. Charakterisierung des hypothetischen Proteins (127670) mittels Überexpression bzw. Silencing in pathogenen und apathogenen Entamoeba histolytica Trophozoiten. Master's thesis, Universität Hamburg, 2018.
- D. H. Haft, J. Selengut, E. F. Mongodin, und K. E. Nelson. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.*, 1(6):e60, Nov 2005.
- A. Hernández Ceruelos, L. C. Romero-Quezada, J. C. Ruvalcaba Ledezma, und L. López Contreras. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 23(1):397–401, Jan 2019.
- J. R. Herricks, P. J. Hotez, V. Wanga, L. E. Coffeng, J. A. Haagsma, M. G. Basanez, G. Buckle, C. M. Budke, H. Carabin, E. M. Fevre, T. Furst, Y. A. Halasa, C. H. King, M. E. Murdoch, K. D. Ramaiah, D. S. Shepard, W. A. Stolk, E. A. Undurraga, J. D. Stanaway, M. Naghavi, und C. J. L. Murray. The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs? *PLoS Negl Trop Dis*, 11(8):e0005424, 08 2017.
- K. Hjort, A. V. Goldberg, A. D. Tsaousis, R. P. Hirt, und T. M. Embley. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 365(1541):713–727, Mar 2010.
- R. D. Horstmann, M. Leippe, und E. Tannich. Host tissue destruction by Entamoeba histolytica: molecules mediating adhesion, cytolysis, and proteolysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 5:57–60, 1992.
- P. Horvath, D. A. Romero, A. C. Coute-Monvoisin, M. Richards, H. Deveau, S. Moineau, P. Boyaval, C. Fremaux, und R. Barrangou. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus. *J. Bacteriol.*, 190(4):1401–1412, Feb 2008.
- Horvath, Patent WO 2007/025097, 18. Februar 2019. URL https://patentscope.wipo.int/ search/de/search.jsf.
- http://www.kazusa.or.jp/codon/, 2019. URL https://www.kazusa.or.jp/codon/.
- H. Irmer, I. Hennings, I. Bruchhaus, und E. Tannich. tRNA gene sequences are required for transcriptional silencing in Entamoeba histolytica. *Eukaryotic Cell*, 9(2):306–314, Feb 2010.
- Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, und A. Nakata. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, 169(12):5429–5433, Dec 1987.
- A. Isnard, M. T. Shio, und M. Olivier. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol*, 2:72, 2012.

- J. Iyer, N. DeVaul, T. Hansen, und B. Nebenfuehr. Using Microinjection to Generate Genetically Modified Caenorhabditis elegans by CRISPR/Cas9 Editing. *Methods Mol. Biol.*, 1874: 431–457, 2019.
- A. L. Jackson und P. S. Linsley. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, 9(1):57–67, Jan 2010.
- R. Jansen, J. D. Embden, W. Gaastra, und L. M. Schouls. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, 43(6):1565–1575, Mar 2002.
- F. Jiang und J. A. Doudna. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 30:100–111, Feb 2015.
- M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, und E. Charpentier. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096):816–821, Aug 2012.
- M. Jinek, F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A. T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales, und J. A. Doudna. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343 (6176):1247997, Mar 2014.
- M. Karimova, N. Beschorner, W. Dammermann, J. Chemnitz, D. Indenbirken, J. H. Bockmann, A. Grundhoff, S. Luth, F. Buchholz, J. Schulze zur Wiesch, und J. Hauber. CRISPR/-Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep*, 5:13734, Sep 2015.
- K. Kato, T. Makiuchi, X. Cheng, und H. Tachibana. Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar lectins. *PLoS ONE*, 12(7):e0181864, 2017.
- M. I. Khalil, B. M. Foda, S. Suresh, und U. Singh. Technical advances in trigger-induced RNA interference gene silencing in the parasite Entamoeba histolytica. *Int. J. Parasitol.*, 46 (3):205–212, Mar 2016.
- J. M. Kim, D. Kim, S. Kim, und J. S. Kim. Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNAguided endonucleases. *Nat Commun*, 5:3157, 2014.
- Constantin König. Entgiftungsmechanismen von Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903): Peroxisomen und die Alkoholdehydrogenase EHI_088020. Master's thesis, Universität Hamburg, 2018.
- H. M. Kudyba, D. W. Cobb, A. Florentin, M. Krakowiak, und V. Muralidharan. CRISPR/-Cas9 Gene Editing to Make Conditional Mutants of Human Malaria Parasite P. falciparum. *J Vis Exp*, (139), 09 2018.
- M. M. Kulkarni, W. R. McMaster, E. Kamysz, W. Kamysz, D. M. Engman, und B. S. McGwire. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, Leishmania, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol. Microbiol.*, 62(5):1484–1497, Dec 2006.
- C. Kuscu, S. Arslan, R. Singh, J. Thorpe, und M. Adli. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.*, 32(7):677–683, Jul 2014.
- U. K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–680, 1970.
- P. J. Lee, P. J. Hung, und L. P. Lee. An artificial liver sinusoid with a microfluidic endotheliallike barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 97(5):1340–1346, Aug 2007.
- M. Leippe, J. Andra, R. Nickel, E. Tannich, und H. J. Muller-Eberhard. 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(5):895–904, Dec 1994.
- Dirk Lercher. Die Lokalisation putativer Pathogenitätsfaktoren in Entamoeba histolytica [Schaudinn, 1903]. Master's thesis, Universität Hamburg, 2017.
- P. Liang, Y. Xu, X. Zhang, C. Ding, R. Huang, Z. Zhang, J. Lv, X. Xie, Y. Chen, Y. Li, Y. Sun, Y. Bai, Z. Songyang, W. Ma, C. Zhou, und J. Huang. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6(5):363–372, May 2015a.
- X. Liang, J. Potter, S. Kumar, Y. Zou, R. Quintanilla, M. Sridharan, J. Carte, W. Chen, N. Roark, S. Ranganathan, N. Ravinder, und J. D. Chesnut. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.*, 208:44–53, Aug 2015b.
- L. Lin, Y. Liu, F. Xu, J. Huang, T. F. Daugaard, T. S. Petersen, B. Hansen, L. Ye, Q. Zhou, F. Fang, L. Yang, S. Li, L. Floe, K. T. Jensen, E. Shrock, F. Chen, H. Yang, J. Wang, X. Liu, X. Xu, L. Bolund, A. L. Nielsen, und Y. Luo. Genome-wide determination of on-target and off-target characteristics for RNA-guided DNA methylation by dCas9 methyltransferases. *Gigascience*, 7(3):1–19, 03 2018.
- X. Lin, X. Ruan, M. G. Anderson, J. A. McDowell, P. E. Kroeger, S. W. Fesik, und Y. Shen. siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.*, 33(14):4527–4535, 2005.
- Q. Liu, Y. Yuan, F. Zhu, Y. Hong, und R. Ge. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein approach in cultured Medaka fish cells. *Biol Open*, 7(8), Aug 2018.
- B. Loftus, I. Anderson, R. Davies, U. C. Alsmark, J. Samuelson, P. Amedeo, P. Roncaglia, M. Berriman, R. P. Hirt, B. J. Mann, T. Nozaki, B. Suh, M. Pop, M. Duchene, J. Ackers, E. Tannich, M. Leippe, M. Hofer, I. Bruchhaus, U. Willhoeft, A. Bhattacharya, T. Chillingworth, C. Churcher, Z. Hance, B. Harris, D. Harris, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, R. Squares, S. Whitehead, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, H. Norbertczak, C. Price, Z. Wang, N. Guillen, C. Gilchrist, S. E. Stroup, S. Bhattacharya, A. Lohia, P. G. Foster, T. Sicheritz-Ponten, C. Weber, U. Singh, C. Mukherjee, N. M. El-Sayed, W. A. Petri, C. G. Clark, T. M. Embley, B. Barrell, C. M. Fraser, und N. Hall. The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica. *Nature*, 433(7028):865–868, Feb 2005.
- C. López-Camarillo, M. Lopez-Casamichana, C. Weber, N. Guillen, E. Orozco, und L. A. Marchat. DNA repair mechanisms in eukaryotes: Special focus in Entamoeba histolytica and related protozoan parasites. *Infect. Genet. Evol.*, 9(6):1051–1056, Dec 2009.
- C. López-Camarillo, I. López-Rosas, J. D. Ospina-Villa, und L. A. Marchat. Deciphering molecular mechanisms of mRNA metabolism in the deep-branching eukaryote Entamoeba histolytica. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5(2):247–262, 2014.

- H. Ma, N. Marti-Gutierrez, S. W. Park, J. Wu, Y. Lee, K. Suzuki, A. Koski, D. Ji, T. Hayama, R. Ahmed, H. Darby, C. Van Dyken, Y. Li, E. Kang, A. R. Park, D. Kim, S. T. Kim, J. Gong, Y. Gu, X. Xu, D. Battaglia, S. A. Krieg, D. M. Lee, D. H. Wu, D. P. Wolf, S. B. Heitner, J. C. I. Belmonte, P. Amato, J. S. Kim, S. Kaul, und S. Mitalipov. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668):413–419, 08 2017.
- P. Magon. Neonatal amoebiasis. Indian J Pediatr, 77(8):903-904, Aug 2010.
- Dennis Marien. Expression der Peptidasen und weiterer putativer Pathogenitätsfaktoren von Entamoeba histolytica während der Leberabszessbildung. Master's thesis, Universität Hamburg, 2007.
- L. A. Marraffini und E. J. Sontheimer. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 463(7280):568–571, Jan 2010.
- M. Martinez-Castillo, J. Pacheco-Yepez, N. Flores-Huerta, P. Guzmán-Téllez, R. A. Jarillo-Luna, L. M. Cárdenas-Jaramillo, R. Campos-Rodriguez, und M. Shibayama. Flavonoids as a Natural Treatment Against Entamoeba histolytica. *Front Cell Infect Microbiol*, 8:209, 2018.
- Thorben Matthies. Strukturelle und biochemische Charakterisierung der putativen alkoholdehydrogenase EHI_088020 aus Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903). Master's thesis, Universität Hamburg, 2017.
- J. Matthiesen, C. Lender, A. Haferkorn, H. Fehling, M. Meyer, T. Matthies, E. Tannich, T. Roeder, H. Lotter, und I. Bruchhaus. Trigger-induced RNAi gene silencing to identify pathogenicity factors of Entamoeba histolytica. *FASEB J.*, 33(2):1658–1668, 2018.
- Jenny Matthiesen. Charakterisierung des pathogenen Phänotyps von Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903). PhD thesis, Universität Hamburg, 2012.
- H. Mehlhorn. Die Parasiten des Menschen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012.
- S. G. Meléndez-López, S. Herdman, K. Hirata, M. H. Choi, Y. Choe, C. Craik, C. R. Caffrey, E. Hansell, B. Chávez-Munguia, Y. T. Chen, W. R. Roush, J. McKerrow, L. Eckmann, J. Guo, S. L. Stanley, und S. L. Reed. Use of recombinant Entamoeba histolytica cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryotic Cell*, 6(7):1130–1136, Jul 2007a.
- S. G. Meléndez-López, S. Herdman, K. Hirata, M. H. Choi, Y. Choe, C. Craik, C. R. Caffrey, E. Hansell, B. Chávez-Munguia, Y. T. Chen, W. R. Roush, J. McKerrow, L. Eckmann, J. Guo, S. L. Stanley, und S. L. Reed. Use of recombinant Entamoeba histolytica cysteine proteinase 1 to identify a potent inhibitor of amebic invasion in a human colonic model. *Eukaryotic Cell*, 6(7):1130–1136, Jul 2007b.
- M. Meyer, H. Fehling, J. Matthiesen, S. Lorenzen, K. Schuldt, H. Bernin, M. Zaruba, C. Lender, T. Ernst, H. Ittrich, T. Roeder, E. Tannich, H. Lotter, und I. Bruchhaus. Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and Pathogenic Entamoeba histolytica Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation. *PLoS Pathog.*, 12(8):e1005853, 08 2016.
- Martin Meyer. Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren durch Überexpression differentiell exprimierter Gene in pathogenen und nicht-pathogenen Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903) Klonen. PhD thesis, Universität Hamburg, 2016.

- L. Morf und U. Singh. Entamoeba histolytica: a snapshot of current research and methods for genetic analysis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 15(4):469–475, Aug 2012.
- L. Morf, R. J. Pearson, A. S. Wang, und U. Singh. Robust gene silencing mediated by antisense small RNAs in the pathogenic protist Entamoeba histolytica. *Nucleic Acids Res.*, 41 (20):9424–9437, Nov 2013.
- J. A. Moss. Waterborne Pathogens: The Protozoans. Radiol Technol, 88(1):27-48, Sep 2016.
- T. Muramoto, H. Iriki, J. Watanabe, und T. Kawata. Recent Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Dictyostelium. *Cells*, 8(1), Jan 2019.
- R. A. Nesbitt, F. W. Mosha, H. A. Katki, M. Ashraf, C. Assenga, und C. M. Lee. Amebiasis and comparison of microscopy to ELISA technique in detection of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar. *J Natl Med Assoc*, 96(5):671–677, May 2004.
- A. Nurkanto, G. Jeelani, T. Yamamoto, Y. Naito, T. Hishiki, M. Mori, M. Suematsu, K. Shiomi, T. Hashimoto, und T. Nozaki. Characterization and validation of Entamoeba histolytica pantothenate kinase as a novel anti-amebic drug target. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8 (1):125–136, 04 2018.
- J. Park, S. Choi, S. Park, J. Yoon, A. Y. Park, und S. Choe. DNA-Free Genome Editing via Ribonucleoprotein (RNP) Delivery of CRISPR/Cas in Lettuce. *Methods Mol. Biol.*, 1917: 337–354, 2019.
- W. a. Petri. Amebiasis and the Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin: from lab bench to bedside. *J. Investig. Med.*, 44(2):24–36, Feb 1996.
- W. A. Petri, T. L. Snodgrass, T. F. Jackson, V. Gathiram, A. E. Simjee, K. Chadee, und M. D. Chapman. Monoclonal antibodies directed against the galactose-binding lectin of Entamoeba histolytica enhance adherence. *J. Immunol.*, 144(12):4803–4809, Jun 1990.
- W. Putzbach, Q. Q. Gao, M. Patel, A. Haluck-Kangas, A. E. Murmann, und M. E. Peter. DISE: A Seed-Dependent RNAi Off-Target Effect That Kills Cancer Cells. *Trends Cancer*, 4(1):10–19, 01 2018.
- T. Qi, X. Zhu, C. Tan, P. Liu, J. Guo, Z. Kang, und J. Guo. Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in Puccinia striiformis f. sp. tritici enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnol. J.*, 16(3):797–807, 03 2018.
- K. S. Ralston. Chew on this: amoebic trogocytosis and host cell killing by Entamoeba histolytica. *Trends Parasitol.*, 31(9):442–452, Sep 2015.
- K. S. Ralston und W. A. Petri. The ways of a killer: how does Entamoeba histolytica elicit host cell death? *Essays Biochem.*, 51:193–210, 2011.
- K. S. Ralston, M. D. Solga, N. M. Mackey-Lawrence, Somlata, A. Bhattacharya, und W. A. Petri. Trogocytosis by Entamoeba histolytica contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature*, 508(7497):526–530, Apr 2012.
- F. A. Ran, P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang, und F. Zhang. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6):1380–1389, Sep 2013a.

- F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, und F. Zhang. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11):2281–2308, Nov 2013b.
- C. Richter, J. T. Chang, und P. C. Fineran. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. *Vi*-*ruses*, 4(10):2291–2311, Oct 2012.
- S. Said-Fernández und R. López-Revilla. Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of Entamoeba histolytica trophozoites. *Infect. Immun.*, 56(4):874–879, Apr 1988.
- R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, und H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487–491, Jan 1988.
- J. M. Salles, L. A. Moraes, und M. C. Salles. Hepatic amebiasis. *Braz J Infect Dis*, 7(2):96–110, Apr 2003.
- J. D. Sander und J. K. Joung. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.*, 32(4):347–355, Apr 2014.
- F. Sanger, S. Nicklen, und A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12):5463–5467, Dec 1977.
- N. E. Sanjana, L. Cong, Y. Zhou, M. M. Cunniff, G. Feng, und F. Zhang. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*, 7(1):171–192, Jan 2012.
- H. Scholze und E. Tannich. Cysteine endopeptidases of Entamoeba histolytica. *Meth. Enzymol.*, 244:512–523, 1994.
- R. Sekine, T. Kawata, und T. Muramoto. CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in Dictyostelium. *Sci Rep*, 8(1):8471, May 2018.
- M. F. Sentmanat, S. T. Peters, C. P. Florian, J. P. Connelly, und S. M. Pruett-Miller. A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Sci Rep*, 8(1):888, 01 2018.
- P. Shahi, F. Moreau, und K. Chadee. Entamoeba histolytica Cyclooxygenase-Like Protein Regulates Cysteine Protease Expression and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*, 8:447, 2018.
- Somlata, K. Nakada-Tsukui, und T. Nozaki. AGC family kinase 1 participates in trogocytosis but not in phagocytosis in Entamoeba histolytica. *Nat Commun*, 8(1):101, Jul 2017.
- S. L. Stanley, T. Zhang, D. Rubin, und E. Li. Role of the Entamoeba histolytica cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.*, 63(4):1587–1590, Apr 1995.
- S. L. Jr Stanley. Amoebiasis. Lancet, 361:1025–1034, 2003.
- M. J. Stern, G. F. Ames, N. H. Smith, E. C. Robinson, und C. F. Higgins. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37(3):1015–1026, Jul 1984.
- D. B. Stewart. Anti-Sense Antibiotic Agents as Treatment for Bacterial Infections. *Surg Infect* (*Larchmt*), Sep 2018.

- L. Stryer, J. M. Berg, und G. J. Tymoczko, J. L. Gatto. *Stryer Biochemie*. Springer-Verlag, Berlin, 2018.
- S. Suresh, G. Ehrenkaufer, H. Zhang, und U. Singh. Development of RNA Interference Trigger-Mediated Gene Silencing in Entamoeba invadens. *Infect. Immun.*, 84(4):964–975, Apr 2016.
- D. C. Swarts und M. Jinek. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, page e1481, May 2018.
- D. Talamás-Lara, B. Chávez-Munguia, A. González-Robles, P. Talamás-Rohana, L. Salazar-Villatoro, A. Durán-Diaz, und A. Martinez-Palomo. Erythrophagocytosis in Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar: a comparative study. *Biomed Res Int*, 2014:626259, 2014.
- J. E. Teixeira, A. Sateriale, K. E. Bessoff, und C. D. Huston. Control of Entamoeba histolytica adherence involves metallosurface protease 1, an M8 family surface metalloprotease with homology to leishmanolysin. *Infect. Immun.*, 80(6):2165–2176, Jun 2012.
- M. Tillack, N. Nowak, H. Lotter, R. Bracha, D. Mirelman, E. Tannich, und I. Bruchhaus. 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(1):58–64, Sep 2006.
- M. Tillack, L. Biller, H. Irmer, M. Freitas, M. A. Gomes, E. Tannich, und I. Bruchhaus. The Entamoeba histolytica genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics*, 8:170, Jun 2007.
- A. Tovy und S. Ankri. Epigenetics in the unicellular parasite Entamoeba histolytica. *Future Microbiol*, 5(12):1875–1884, Dec 2010.
- T. K. Tsui und H. Li. Structure Principles of CRISPR-Cas Surveillance and Effector Complexes. *Annu Rev Biophys*, 44:229–255, 2015.
- J. A. Ujang, S. H. Kwan, M. N. Ismail, B. H. Lim, R. Noordin, und N. Othman. Proteome analysis of excretory-secretory proteins of Entamoeba histolytica HM1:IMSS via LC-ESI-MS/MS and LC-MALDI-TOF/TOF. *Clin Proteomics*, 13:33, 2016.
- R. Uribe, M. d. e. J. Almaraz Barrera, M. Robles-Flores, G. Mendoza Hernandez, A. Gonzalez-Robles, R. Hernandez-Rivas, N. Guillen, und M. Vargas. A functional study of nucleocytoplasmic transport signals of the EhNCABP166 protein from Entamoeba histolytica. *Parasitology*, 139(13):1697–1710, Nov 2012.
- Z. Wang, Q. Pan, P. Gendron, W. Zhu, F. Guo, S. Cen, M. A. Wainberg, und C. Liang. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep*, 15(3):481–489, Apr 2016.
- G. D. Weedall und N. Hall. Evolutionary genomics of Entamoeba. *Res. Microbiol.*, 162(6): 637–645, 2011.
- A. F. Widmer und Mary D. Nettleman. Amebiasis. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 12(12):735–739, 1991.
- B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, und J. A. Doudna. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385):331–338, Feb 2012.

- X. Wu, D. A. Scott, A. J. Kriz, A. C. Chiu, P. D. Hsu, D. B. Dadon, A. W. Cheng, A. E. Trevino, S. Konermann, S. Chen, R. Jaenisch, F. Zhang, und P. A. Sharp. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 32(7):670–676, Jul 2014.
- T. Wuerz, J. B. Kane, A. K. Boggild, S. Krajden, J. S. Keystone, M. Fuksa, K. C. Kain, R. Warren, J. Kempston, und J. Anderson. A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting. *Can. J. Gastroenterol.*, 26(10):729–733, Oct 2012.
- C. Xie, Y. L. Chen, D. F. Wang, Y. L. Wang, T. P. Zhang, H. Li, F. Liang, Y. Zhao, und G. Y. Zhang. SgRNA Expression of CRIPSR-Cas9 System Based on MiRNA Polycistrons as a Versatile Tool to Manipulate Multiple and Tissue-Specific Genome Editing. *Sci Rep*, 7(1): 5795, 07 2017.
- K. Xie, B. Minkenberg, und Y. Yang. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(11):3570–3575, Mar 2015.
- X. Zhang, Z. Zhang, D. Alexander, R. Bracha, D. Mirelman, und S. L. Stanley. Expression of amoebapores is required for full expression of Entamoeba histolytica virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis. *Infect. Immun.*, 72(2):678–683, Feb 2004.

Publikationen

Meyer, M., Fehling, H., Matthiesen, J., Lorenzen, S., Schuldt, K., Bernin, H., Zaruba, M., **Lender, C.**, Ernst, T., Ittrich, H., Roeder, T., Tannich, E., Lotter, H. and Bruchhaus, I. (2016). "Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and Pathogenic Entamoeba histolytica Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation" PLoS Pathog 12(8):e1005853

Choy, S. L., Bernin, H., Aiba, T., Bifeld, E., **Lender, S. C.**, Muhlenpfordt, M., Noll, J., Eick, J., Marggraff, C., Niss, H., Roldan, N. G., Tanaka, S., Kitamura, M., Fukase, K., Clos, J., Tannich, E., Fujimoto Y., and Lotter, H. (2017). "Synthetic analogs of an Entamoeba histolytica glycolipid designed to combat intracellular Leishmania infection." Sci Rep 7(1): 9472

Matthiesen, J., Lender, C., Haferkorn, A., Fehling, H., Meyer, M., Matthies, T., Tannich, E., Roeder, T., Lotter, H. and Bruchhaus, I. (2018). "Trigger-induced RNAi gene silencing to identify pathogenicity factors of Entamoeba histolytica." FASEB J 33(2):1658-1668

Abbildungsverzeichnis

1.1	Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i> und klinische Manifestationen	2
1.2 1.3	Übersicht der verwendeten <i>E. histolytica</i> Klone und ihr Ursprung Schematische Darstellung der schrittweisen Abtötung und Aufnahme von	5
	Wirtszellen durch <i>E. histolytica</i>	7
1.4	Übersicht der differentiell exprimierten Gene zwischen den <i>E. histolytica</i> Klo- nen A1 ^{np} und B2 ^p sowie B8 ^{np} und B2 ^p	9
1.5	Analyse der ALA-Formation nach Infektion von <i>Meriones unguiculatus</i> mit verschiedenen <i>E. histolutica</i> Transfektanten	11
1.6	Schematische Darstellung des Gens EHI_042870 codierend für die putative	10
1 7	Reference Environmente Resultion sin en Alleshaldshades and as	12
1.7 1.8	Übersicht über das adaptive Immunsystem CRISPR/Cas und die verschiede-	13
	nen Typen.	17
1.9 1.10	Reparaturmechanismen von DSB	20
	<i>Editing</i> hinaus	22
31	Ablauf der Klonierung von Cas9 und Cas9 ^{co} in das Expressionsplasmid pNC	51
3.2	Ablauf der Klonierung der Plasmidkonstrukte pNSiA MP8-1 u. pNSiB MP8-1.	53
3.3	nen auf DNA-Ebene durch die T7EI Endonuklease.	57
4.1	Nachweis von <i>adh</i> -Überexpression und -Silencing in <i>E. histolytica</i> Trophozoiten.	59
4.2	Expressionsprofil EhMP8-2 codierender mRNA in <i>ehmp8</i> -2-überexprimierenden	
	und -gesilencten <i>E. histolytica</i> Trophozoiten mittels qPCR	60
4.3	Einfluss des Silencings der adh auf die Expression verwandter, ADH-codierender	
	Gene mittels qPCR.	62
4.4	Einfluss des Silencings der <i>ehmp8-2</i> auf die Expression des <i>ehmp8-1</i> Gens mit-	
4 5	tels qPCK. \ldots	62 64
4.5	Westernblot Analyse der Cas9-Expression in <i>E. histolytica</i> Transfektanten.	64 67
4.6	westernblot Analyse der <i>cas</i> ² -Expression in <i>E. nistolytica</i> Transfektanten.	00
4.7	SgRINA-Induzierte Spaltung der Zielgene.	00
4.0	Aktivitätstest in ouro transkridierter sgrinds im Cleuouge-Assay.	01
4.9	Lokansation des KNP-Komplexes in transfiziente <i>E. misiolyticu</i> frophozoiten.	08
4.10	mittels EACS	60
<u>4</u> 11	Analyse der RNP-Transfektanten im Eluoreszenzmikroskon	70
<u>4</u> 12	Analyse von Mutationen in RNP-Transfektanten auf DNA-Fhene	70
4.13	Sequenzierung der Zielsequenz aus RNP-transfizierten <i>E. histolytica</i> Tropho-	12
	zoiten.	73
4.14	Analyse der Lysate von klonierten RNP-transfizierten Trophozoiten im Sub-	
4.15	stratgel	74
	Trophozoiten mittels Cysteinproteaseassay.	75

4.16	Phänotypische Merkmale von <i>ehmp8-2-</i> überexprimierenden und -gesilencten	77
4.17	mRNA-Expressionsprofil der <i>ehmp8-1</i> und <i>ehmp8-2</i> in <i>ehmp8-1</i> - und <i>ehmp8-2</i> -	11
4.18	Silencing-Transfektanten sowie <i>ehmp8-1/-2</i> -Doppelsilencern mittels qPCR Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität von <i>ehmp8-2</i> -überexprimierenden	78
	und -gesilencten <i>E. histolytica</i> Trophozoiten sowie von <i>ehmp8-1/-2</i> -Doppelsil-	00
4.19	Bestimmung der hämolytischen Aktivität von <i>ehmp8-1-</i> und <i>ehmp8-2-</i> Silencing-	80
4.20	und Uberexpressions-Transfektanten sowie von <i>ehmp8-1/-2</i> -Doppelsilencern. Bestimmung der Erythrophagozytose durch <i>ehmp8-1-</i> und <i>ehmp8-2-</i> Silencing-	81
1 01	und Überexpressions-Transfektanten sowie durch <i>ehmp8-1/-2</i> -Doppelsilencer.	82
4.21	gesilencten <i>E. histolytica</i> Trophozoiten gegenüber THP1-Zellen.	83
4.22	Bestimmung der Phagozytose gefärbter THP1-Zellen durch <i>ehmp8</i> -2-überex- primierende und -gesilencte <i>E. histolutica</i> Trophozoiten sowie durch <i>ehmp8</i> -1/-	
	2-Doppelsilencer mittels FACS.	84
4.23	Phänotypische Merkmale von <i>adh</i> -überexprimierenden und -gesilencten <i>E. his-</i> <i>tolytica</i> Trophozoiten.	86
4.24	Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität in <i>adh-</i> Überexpressions- und -Silencing	5- 87
4.25	Bestimmung der hämolytischen Aktivität und Erythrophagozytose von <i>adh</i> -	01
4.26	Uberexpressions- und -Silencing-Transfektanten	88
	exprimierenden Trophozoiten im Westernblot mit Coomassie-gefärbter Lade- kontrolle.	89
4.27	Mikroskopische Analyse der Transfektanten A1 ^{np} ADH-MYC_ÜE zur Loka- lisation der ADH mit dem anti-Myc Antikörper	00
4.28	Konfokale-Laser-Scanning Mikroskopie der Transfektanten A1 ^{np} ADH-MYC_ÜE	30 ¦
4.29	zur Lokalisation der ADH auf der Zellmembran	91
	der ADH mit spezifischen Antikörpern (Immunserum) im Vergleich zum Präim-	0.0
4.30	munserum	92
	über Formaldehyd.	94

Tabellenverzeichnis

3.1	Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Herstellern	26
3.2	Auflistung der verwendeten Reaktionskits mit Herstellern	27
3.3	Auflistung der verwendeten Marker und Ladepuffer mit Herstellern	27
3.4	Auflistung der verwendeten Enzyme und Enzyminhibitoren mit Herstellern	28
3.5	Auflistung der verwendeten Antikörper mit Herstellern	28
3.6	Auflistung der verwendeten Farbstoffe mit Herstellern	28
3.7	Auflistung der verwendeten Plasmide	29
3.8	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation des Gens	29
3.9	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide für die qPCR	29
3.10	Auflistung der sonstigen verwendeten Oligonukleotide	30
3.11	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern	33
3.12	Auflistung der verwendeten Geräte mit Herstellern	33
3.13	Auflistung der verwendeten Software mit Herstellern	34
3.14	Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE	39
3.15	Auflistung durchgeführter PCRs	49
3.16	Temperaturprofil der verwendeten qPCR	55

Danksagung

Der Titel ist nun in greifbarer Nähe, und ich möchte DANKE sagen bevor ich gehe:

Als erstes möchte ich mich bei meinen beiden Doktormüttern Prof. Dr. Iris Bruchhaus und Prof. Dr. Hanna Lotter für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen bedanken!

Liebe Iris, liebe Hanna, vielen Dank für eure engagierte und umfangreiche Betreuung, sowie die konstruktive Kritik und Hilfestellungen, die meinen wissenschaftlichen Horizont enorm erweitert haben.

Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Julia Kehr danke ich für den Beisitz in meiner Prüfungskommission.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Molekulare Infektionsimmunologie für die schöne Arbeitsatmosphäre und die unvergessliche gemeinsame Zeit bedanken, insbesondere bei Helena und Julie, Marie, Klossi und Stefan. Ihr habt das Labor 6 zu einem zweiten Zuhause für mich gemacht.

Meiner besseren Hälfte Siew Ling gilt der größte Dank! Du bist mein Fels in der Brandung, auf den ich mich immer retten kann. Und nun haben wir es gemeinsam geschafft. Es heißt Freundschaft, weil man mit Freunden alles schafft!

Bei den Kollegen der Arbeitsgruppe Protozoologie möchte ich mich auch ganz herzlich bedanken, besonders bei Lisa, Mila und Jana.

Und auch Hannah, Jill und Heidrun danke ich für die große anfängliche Unterstützung.

Clemens, Lea und Lars möchte ich für die Hilfe mit der gummierten Kartoffel mit Milchschaum an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für den Beistand, die Rücksichtnahme in der stressigen Zeit und die vielen aufmunternden Worte. Es ist schön, dass es euch gibt!

Eidesstattliche Erklärung

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, den 28. Februar 2019

Ort, Datum

S. Corinna Lender