

**Einfluss der Cysteinpeptidasen auf die Pathogenität von
Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903)**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Nicolas Nowak
aus Hamburg

Hamburg, 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. I. BRUCHHAUS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. H. BRETTING
Tag der Disputation: 08. April 2005

Hamburg, den 24. März 2005



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VIII
1 EINLEITUNG	12
1.1 <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i> : Allgemeine Information	12
1.2 Peptidasen: Klassifizierung und Nomenklatur	13
1.3 Cysteinpeptidasen: Definition, Aufbau und katalytischer Mechanismus	15
1.4 Cysteinpeptidasen von <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	16
1.4.1 Expression von Cysteinpeptidasen in <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	16
1.4.2 Die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 von <i>E. histolytica</i>	17
1.4.3 Die Bedeutung der Cysteinpeptidasen für die Pathogenität von <i>E. histolytica</i>	18
1.5 Cysteinpeptidaseinhibitoren: Klassifikation und Funktion	19
1.5.1 Peptid-Epoxyde	19
1.5.2 Peptidyl Diazomethylketone	21
1.5.3 p-Hydroxymyrcuribenzoat (pHMB)	21
1.6 Funktionen von Cysteinpeptidasen in parasitischen Protozoen	22
1.6.1 Cysteinpeptidasen parasitischer Protozoen als "drug-target"	22
1.7 Zielsetzung	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Reagenzien und Chemikalien	25
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Geräte und Materialien	26
2.1.3 Enzyme und Enzyminhibitoren	27
2.1.4 Immunreagenzien und Seren	27
2.1.5 Marker	27
2.1.6 Puffer und Lösungen	28
2.2 Organismen und Plasmide	29
2.2.1 Organismen	29
2.2.2 Plasmide	30
2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen	31
2.3.1 Medien	31
2.3.2 Kultivierung und Ernte von Amöben	32
2.3.3 Kultivierung weiterer Organismen	33
2.4 Isolierung von Nukleinsäuren	33
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Plasmid-Mini-Präparation)	33

2.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Plasmid-Mega-Präparation)	33
2.4.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Entamoeba sp.</i>	33
2.5	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	34
2.5.1	Fällung von Nukleinsäuren	34
2.5.2	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	34
2.6	Enzymatische Modifikation von DNA	34
2.6.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.6.2	Radioaktive Markierung von DNA	34
2.7	Trennung von DNA und DNA-Fragmenten	35
2.7.1	Agarosegelelektrophorese	35
2.7.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit "Elution Tubes"	35
2.8	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	36
2.8.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α und <i>E. coli</i> BL21DE3 für die Transformation	36
2.8.2	Transformation von <i>E. coli</i>	36
2.9	Transfektion von <i>Entamoeba sp.</i>	37
2.9.1	Präparation der Amöben für die Elektroporation	37
2.9.2	Transfektion der Amöben	37
2.9.3	Selektion rekombinanter Amöben	37
2.10	Northern-Blot	38
2.11	Hybridisierung von Nukleinsäuren mit radioaktiv markierter DNA	39
2.12	Rekombinante Expression der EhCP5 in <i>Escherichia coli</i>	39
2.13	Herstellung zellfreier Extrakte	40
2.13.1	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> durch Ultraschall	40
2.13.2	Präparation zellfreier Extrakte von <i>Entamoeba sp.</i>	40
2.14	Gewinnung von Antikörpern	41
2.14.1	Immunisierung von Hühnern und Mäusen	41
2.14.2	Gewinnung von Antikörpern aus Hühnereiern	41
2.14.3	Gewinnung von Antiseren aus Blut	41
2.15	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	41
2.16	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
2.17	Zweidimensionale Gelelektrophorese	43
2.17.1	Vorbereitung der Zellextrakte für die Isoelektrische Fokussierung	43
2.17.2	Isoelektrische Fokussierung	43
2.17.3	Vorbereitung der Gelstreifen für die zweite Dimension	44
2.17.4	Tris-Tricin Gelelektrophorese	44
2.17.5	Vorbereitung differentieller Spots für die Massenspektrometrie	45
2.17.6	Tryptischer Verdau differentieller Spots	45

2.17.7	Äquilibrieren der "ZIP-TIPS"	46
2.17.8	"ZIP-TIPS" mit Proben beladen	46
2.17.9	MALDI-TOF	46
2.17.10	Peptidfragmente von der Säule eluieren	46
2.17.11	Auswertung der MALDI-TOF-Spektren	47
2.17.12	Datenbanksuche	47
2.18	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	47
2.18.1	Immunologischer Nachweis von auf Membranen immobilisierten Proteinen	48
2.19	Proteinfärbungen	49
2.19.1	Coomassie-Färbung nach Weber et al.	49
2.19.2	Coomassie-Färbung nach Neuhoff et al.	49
2.20	Bestimmung von Enzymaktivitäten	50
2.20.1	Proteolytische Aktivität gegenüber synthetischen Peptiden	50
2.20.2	Substrat-SDS-PAGE zum Nachweis von Peptidasen	50
2.21	Proteinreinigung durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie	51
2.22	Dialyse von Proteinlösungen	52
2.23	Erstellen einer Wachstumskurve	52
2.24	Bestimmung der EC ₅₀	52
2.25	Bestimmung der cytopathischen Aktivität von Amöben	52
2.26	Bestimmung der Erythrophagozytose von <i>E. histolytica</i>	53
2.27	Bestimmung der hämolytischen Aktivität von <i>E. histolytica</i>	54
2.28	Bildung von Leberabszessen in Wüstenrennmäusen	54
2.29	Transmissionselektronenmikroskopie	54
2.30	Klonierung der Cysteinpeptidase EhCP5	55
2.30.1	Oligonukleotide	56
2.30.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	56
2.30.3	Klonierung der PCR-Produkte	57
2.30.4	DNA-Sequenzanalyse	57
2.30.5	Vorbereitung des Vektors pNeoBox	57
2.30.6	Ligation der Vektoren	58
2.30.7	Ligation von DNA-Fragmenten	59
2.30.8	Dephosphorylierung von Vektor DNA	59
2.30.9	Phenol-Chloroform-Extraktion	60
2.30.10	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem "Gene Clean Kit"	60
2.30.11	Transfektion der Amöben	60

3	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	61
3.1	Rekombinante Expression der Cysteinpeptidase EhCP5 zur Gewinnung von Antiseren	61
3.2	Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	62
3.2.1	Northern-Blot Analysen und Enzymtests NeoEhCP5 transfizierter <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	62
3.2.2	Substrat-SDS-PAGE	64
3.2.3	Western-Blot Analysen	65
3.2.4	Untersuchungen zur Pathogenität pNeoEhCP5-TOPO transfizierter Trophozoiten	66
3.2.4.1	Zellrasenzerstörung durch pNeoEhCP5-TOPO transfizierte <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i> (cytopathischer Effekt)	66
3.2.4.2	Erythrophagozytose und hämolytische Aktivität	68
3.2.4.3	Bildung von Amöbenleberabszessen im Tiermodell	68
3.3	Resistenz von <i>E. histolytica</i> gegenüber E-64	69
3.3.1	Wachstum von <i>E. histolytica</i> mit E-64	69
3.3.2	Kreuzresistenz: Bestimmen der EC ₅₀ gegenüber verschiedenen Cysteinpeptidaseinhibitoren	70
3.3.3	Affinität gegenüber verschiedenen Diazomethylketonen	72
3.3.4	Proteolytische Aktivität	73
3.3.5	Western-Blot Analysen von <i>E. histolytica</i> , die in Gegenwart von E-64 kultiviert wurden	74
3.3.6	2D-SDS-PAGE Untersuchungen von Zellextrakten resistenter und nicht resistenter <i>E. histolytica</i>	75
3.3.7	Expression von Cysteinpeptidase-RNA	78
3.3.8	Ultrastruktur E-64 resistenter Zellen	78
3.3.9	Untersuchungen zur Pathogenität der resistenten Zellen.	80
3.3.9.1	Zerstörung von Zellrasen durch resistente bzw. nichtresistente Trophozoiten und deren Zellextrakt (cytopathische Aktivität)	80
3.3.9.2	Induktion von Leberabszessen in <i>Meriones unguiculatus</i>	81
3.3.10	Sezernierung von Cysteinpeptidasen	82

4	DISKUSSION	83
4.1	Versuche zur Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in <i>E. histolytica</i> und <i>E. dispar</i>	83
4.1.1	Für die Genexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 sind stromaufwärts oder stromabwärts liegende "cis-acting" Elemente notwendig	84
4.1.2	Die Cysteinpeptidase EhCP5 ist vermutlich an der Prozessierung weiterer Peptidasen von <i>E. histolytica</i> beteiligt	85
4.1.3	Einfluss der Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 auf die Pathogenität der Amöben	87
4.1.3.1	Versuche zur <i>in vitro</i> Pathogenität NeoEhCP5 transfizierter <i>E. histolytica</i> (Cytopathische Eigenschaften / Erythrophagozytose / Hämolyse)	87
4.1.3.2	Bildung von Amöbenleberabszessen in Wüstenrennmäusen (<i>Meriones unguiculatus</i>)	89
4.2	Resistenz von <i>E. histolytica</i> gegenüber E-64	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	LITERATUR	98
7	DANKSAGUNG	114

ABKÜRZUNGEN

A, A.	Adenin, Ampère
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Antisense
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-Phosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C, C-	Cytosin, Carboxy-
°C	Grad Celsius
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
cDNA	komplementäre DNA
CHO	"chinese hamster ovary"
Ci	Curie
CP	Cysteinpeptidase
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Desoxy-
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP	Dipeptidylpeptidase
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia, Entamoeba</i>
E-64 s	<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS, E-64 sensitiv
E-64 r	<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS, E-64 resistent
s ⁻ , E-64 s (ØE-64)	<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS, E-64 sensitiv, Kultivierung ohne E-64
s ⁺ , E-64 s (+E-64)	<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS, E-64 sensitiv, Kultivierung mit E-64
r ⁻ , E-64 r (ØE-64)	<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS, E-64 resistent, Kultivierung ohne E-64
r ⁺ , E-64 r (+E-64)	<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS, E-64 resistent, Kultivierung mit E-64
E-64	Synonyme: <i>L-trans</i> -epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane, N-[N'-(L-3-transcarboxyrane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine
E-64d	Synonyme: Ioxastatin, EST, (2S,3S)- <i>trans</i> -epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethylester
EC	Enzym-Klassifizierungsnummer

Ed	<i>Entamoeba dispar</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminomethylether)-N,N,N',N'-tetra-essigsäure
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
et al.	"et alteri" (und andere)
F	Farad, "forward"
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G418	G418-Sulfat (Geneticin)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His-tag	mehrere Histidinreste am N- oder C-Terminus eines Proteins
Hrsg.	Herausgeber
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITP	Inosin-5'-triphosphat
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
k	kilo
λ	Bakteriophage Lambda
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Meter, milli
μ	mikro (10^{-6})
M	molar, Mega-
MAb	Monoklonaler Antikörper
ME	Mercaptoethanol
MECN	Acetonitril
min	Minute
mod.	modifiziert
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
n	nano (10^{-9})
N-	Amino-
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
neo	Neomycin-Phosphotransferase
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NTA	Nitrilotriessigsäure

OD	Optische Dichte
p	piko (10^{-12}), para-
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreakton
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PHMB	p-Hydroxymercuribenzoat
pI	isolektrischer Punkt
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PVDF	Polyvinylidifluorid
r	resistent, rekombinant
R	"reverse"
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde, siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sp.</i>	Spezies
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphospaht-EDTA-Puffer
T	Thymin
T7	Bakteriophage der T-Serie
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit, Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vhrs	Volthours
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Z-Arg-Arg-pNA	Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid
Z-Phe-Arg-pNA	Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginin-p-nitroanilid
Z-Phe-Ala-DMK	Benzyloxycarbonyl-L-phenyl-L-alanin-Diazomethylketone
Z-Phe-Phe-DMK	Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanine-Diazomethylketone

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

1 EINLEITUNG

1.1 *E. histolytica* und *E. dispar*: Allgemeine Information

Entamoeba histolytica ist ein parasitisches Protozoon, das die Amoebiasis, eine Infektionskrankheit von der weltweit ca. 50 Millionen Menschen betroffen sind, verursacht. Jährlich sterben ca. 40000 bis 50000 Menschen an der Amoebiasis, deren Vorkommen sich fast ausschließlich auf tropische und subtropische Regionen beschränkt. Die Amoebiasis stellt somit neben der Malaria und der Schistosomiasis die dritthäufigste Parasitose des Menschen dar (Walsh 1986; World Health Organisation 1997).

Der Lebenszyklus von *E. histolytica* ist direkt, es gibt keine Zwischenwirte. Die fäkal-orale Verbreitung erfolgt über vierkernige säureresistente Zysten, die sich im Dünndarm exzystieren und aus denen durch weitere Kern und Zellteilungen acht einkernige Trophozoiten hervorgehen. Trophozoiten von *E. histolytica* besiedeln den oberen Dickdarm und können dort mehrere Monate bis Jahre symptomlos verweilen (Knobloch et al., 1983), wobei sie über ihr Galactose / N-Acetyl-D-Galactosamin spezifisches Adhärenzlektin an die Mukosa adhären (Wynants et al., 1995; Petri, Jr. et al., 2002). Im unteren Dickdarm enzystieren die Trophozoiten, gefolgt von zwei Kernteilungen. Die so entstandenen vierkernigen Zysten werden mit dem Stuhl ausgeschieden und können direkt oder durch kontaminierte Nahrung bzw. Trinkwasser vom nächsten Wirt aufgenommen werden, womit sich der Kreislauf schließt.

Wenn die Amöben Zellen des Wirtsgewebes lysieren und in die Mukosa invadieren kann dies zur intestinalen Amoebiasis (Amöbenruhr) mit schweren blutigen Durchfällen führen. Durch die Gewebsinvasion können die Amöben mit dem Blutkreislauf in andere Organe gelangen, was zur extraintestinalen Amoebiasis führen kann. In den befallenen Organen können die Amöben zur Ausbildung von Abszessen führen. Hauptsächlich wird die Leber befallen, was zum typischen Krankheitsbild, dem Amöbenleberabszess, führt (Hughes et al., 2000; Stanley 2001).

Bislang ist nicht geklärt, welche Signale für die kommensale Besiedlung des Dünndarmes, die Gewebsinvasion oder die Enzystierung der Trophozoiten entscheidend sind. Verschiedene sowohl wirts- als auch parasitenspezifische Faktoren, deren Wechselwirkung allerdings noch nicht aufgeklärt sind, scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Mit der Invasion in das Wirtsgewebe ist es *E. histolytica* nicht mehr möglich Zysten zu bilden und sich weiter zu verbreiten. Der Lebenszyklus des Parasiten ist mit der Invasion in das Wirtsgewebe beendet.

E. histolytica, gehört zur Familie der Entamoebidae. Herausragende Merkmale von *E. histolytica* sind die ausgeprägte Phagozytoseaktivität, die Zerstörung von Zellen sowie die Lysis von Zellverbänden. Das Gesamtzellvolumen besteht zu ca. 40% aus Vesikeln, deren Funktion äquivalent zu Lysosomen und cytotoxischen Vesikeln höherer eukaryotischer Zellen sind (Scholze et al., 1994).

Lange Zeit wurde aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen vermutet, dass Mitochondrium und Golgi-Apparat fehlen (Henley et al., 1976). Allerdings weist vieles

darauf hin, dass entsprechende funktionell ähnliche, aber strukturell distinkte Kompartimente im Zytoplasma existieren. So sind z.B. einige Gene und Proteine identifiziert worden, die hohe Homologien zu bekannten organell-spezifischen Proteinen zeigen. Golgi-ähnliche Strukturen und glattes endoplasmatisches Retikulum wurden kürzlich elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Chavez-Munguia et al., 2000). Des Weiteren gelang der Nachweis eines Mitochondrium-ähnlichen Kompartiments, das als Crypton (Mai et al., 1999) bzw. Mitosom (Tovar et al., 1999) bezeichnet wird.

Die Genstruktur von *E. histolytica* ist monocistronisch (Bruchhaus et al., 1993). Introns wurden im Genom von *E. histolytica* erst kürzlich nachgewiesen (Willhoeft et al., 2001).

E. dispar ist eine Spezies der Gattung Entamoeba, die sich morphologisch nicht von *E. histolytica* unterscheiden lässt. So gelang erst mit Hilfe der Identifizierung von Isoenzymmustern (Sargeant et al., 1978; Sargeant et al., 1987), dem Nachweis von Antigenvariationen (Strachan et al., 1988) und molekularbiologischen Methoden (Tannich et al., 1989; Clark et al., 1991; Tachibana et al., 1991) *E. dispar* als eigene Art neu zu beschreiben (Diamond et al., 1993). Dies ist für die Klinik von großer Bedeutung, da der nichtpathogene Kommensale *E. dispar* keiner Behandlung bedarf. Vor der Reklassifizierung herrschte über die Notwendigkeit der Behandlung Uneinigkeit.

Zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* gehören das Adhärenzlektin (Petri, Jr. et al., 1987; Tannich et al., 1991b; Tannich et al., 1992), Amöbapores (Young et al., 1982; Leippe et al., 1991; Leippe et al., 1994; Leippe 1997) und Cysteinpeptidasen (Bruchhaus et al., 2003).

1.2 Peptidasen: Klassifizierung und Nomenklatur

Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren, werden als Peptidasen bezeichnet und im EC-System nach Vorgaben der NC-IUBMB entsprechend ihres katalytischen Mechanismus oder des umgesetzten Substrates klassifiziert. Diese Art der Klassifizierung kann bei Peptidasen zu Verwirrungen führen, da viele dieser Enzyme mehrere Reaktionen katalysieren bzw. verschiedene Substrate umsetzen und somit Mehrfachnennungen möglich sind. So gibt es Endopeptidasen mit Exopeptidaseaktivität und umgekehrt.

Aus obig genannten Gründen und um dem Verwandtschaftsverhältnis der Peptidasen Rechnung zu tragen wurde das MEROPS-System entwickelt. Im MEROPS-System werden die Peptidasen anhand ihres Verwandtschaftsverhältnisses in Familien und Clans eingeordnet. Ein Clan fasst verschiedene Familien zusammen, die sich alle von einem gemeinsamen "Vorfahren" entwickelt haben und wird mit einem Buchstabenkürzel für den katalytischen Mechanismus versehen (A, C, M, P, S, T) (Rawlings et al., 1993). Peptidasen die einer Familie zugeordnet werden sind - im für die enzymatische Aktivität verantwortlichen Abschnitt des Proteins - strukturverwandt.

Als weitere Hürde erweist sich die verwirrende Nomenklatur der Peptidasen, da es verschiedene Nomenklatorsysteme gibt. Grassmann und Dyckerhoff verwenden den Begriff

Protease für Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren. Weiter wird unterschieden in Proteinasen, für Enzyme die innerhalb von Proteinen spalten und Peptidasen, die N-terminal oder C-terminal Peptide vom Substrat abspalten (Grassmann et al., 1928). Bergmann und Ross hingegen verwenden den Begriff Peptidase im weiteren Sinne für Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren und unterscheiden weiter zwischen Endopeptidasen, die innerhalb des Proteins und Exopeptidasen die Peptide vom Rand her abspalten (Bergmann et al., 1936). Die Verwendung des Begriffes Peptidase im weiteren Sinne (nach Bergmann und Ross) wird laut NC-IUBMB empfohlen und in dieser Arbeit verwendet (Barrett 1997).

Zusätzliche Schwierigkeiten entstehen dadurch, dass die Aktivität einer Peptidase im Experiment mit synthetischen Oligopeptiden ermittelt wird. Diese Aktivität lässt sich nicht ohne weiteres auf das natürliche Substrat übertragen, da nicht jede putative Schnittstelle *in vivo* für die Peptidase zugänglich ist. In Tab. 1 ist eine Übersicht über die Klassifizierung der Peptidasen mit EC-Nummern dargestellt.

Tab. 1: Klassifizierung von Peptidasen nach dem EC-System

Exopeptidasen

EC-Nummer	Peptidase	Abgespaltener Rest	Terminus des Substrates
3.4.11	Aminopeptidasen	1 AS	N-Terminal
3.4.13	Dipeptidasen	2 AS	N-Terminal
3.4.14	Dipeptidylpeptidasen	3 AS	N-Terminal
3.4.15	Peptidyl-Dipeptidasen	2 AS	C-Terminal
3.4.16	Serincarboxypeptidasen	1 AS	C-Terminal
3.4.17	Metallo-carboxypeptidasen	1 AS	C-Terminal
3.4.18	Cystein-carboxypeptidasen	1 AS	C-Terminal
3.4.19	Omegapeptidasen	1 AS	C-Terminal

Endopeptidasen

EC-Nummer	Peptidase
3.4.21	Serin Endopeptidasen
3.4.22	Cystein Endopeptidasen
3.4.23	Aspartat Endopeptidasen
3.4.24	Metallo Endopeptidasen
3.4.99	Endopeptidasen of unknown type

Die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* und *E. dispar* gehören zur Gruppe 3.4.22 Cystein-Endopeptidasen, "Hydrolasen von Peptidbindungen". Laut MEROPS-Nomenklatur sind die bislang in *E. histolytica* und *E. dispar* identifizierten Cysteinpeptidasen dem Clan CA, Familie C1 "Papain-ähnliche" Peptidasen zuzuordnen, da sie vom Aufbau her Cathepsin L entsprechen. Bei den papainhomologen Enzymen handelt es sich im Allgemeinen um lysosomale bzw. vesikuläre oder sezernierte Proteine (Rawlings et al., 1994).

1.3 Cysteinpeptidasen: Definition, Aufbau und katalytischer Mechanismus

Cysteinpeptidasen besitzen einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum, der zusammen mit Histidin eine katalytische Dyade bildet. Weitere Aminosäuren können eine wichtige Rolle spielen, hierzu gehören Asparagin und Glutamin (Hooper 2002). Das aktive Zentrum der Cysteinpeptidasen wird von zwei Domänen, die R- und die L-Domäne, gebildet. Die beiden Domänen werden durch eine Furche, in der das Substrat bindet, getrennt. Die für die Hydrolyse von Peptidbindungen wichtigen Aminosäuren befinden sich auf jeweils einer der beiden Domänen und werden anhand der Papainnummerierung mit Cys 25 und His 159 bezeichnet. Die Katalyse erfolgt über den so genannten Michaelis-Komplex, in dem der nukleophile Angriff der Thiolgruppe des Cysteins auf das Carbonyl C-Atom des Peptidsubstrates erfolgt. Anschließend bindet im Tetrahydralkomplex das Schwefelatom an das Carbonylkohlenstoffatom. Das Thiolproton wird durch His 159 (Papainnummerierung) und weitere Aminosäuren (Gln 19 und Cys 25, Papainnummerierung) im Tetrahydralkomplex stabilisiert. Im folgenden kovalenten Intermediärzustand, dem Thioacyl-Intermediat ist der Carbonylkohlenstoff an das Enzym gebunden und der N-Terminus des Substrates wird freigesetzt. Durch den Angriff eines Wassermoleküls wird wiederum der C-Terminus des Substrates freigesetzt und das Enzym regeneriert (Storer et al., 1994). Mittels kristallographischer Untersuchungen wurde festgestellt, dass das katalytische Zentrum von Peptidasen im Allgemeinen auf der Oberfläche in einer Vertiefung lokalisiert ist. Die Spezifität des aktiven Zentrums wird von den Eigenschaften benachbarter Aminosäuren determiniert. Die Aminosäuren des Enzyms werden mit S (für "subsite"), die des Substrates mit P (für "peptide") bezeichnet. Diese Aminosäuren werden vom katalytischen Zentrum zum N-Terminus des Enzyms mit S1, S2...Sn und mit S1', S2'...Sn' zum C-Terminus hin beschrieben. Die Seitenketten des Substrates werden von der Schnittstelle weg zum N-Terminus mit P1, P2...P3 und mit P1', P2'...P3' zum C-Terminus beschrieben (Berger et al., 1970). *In vivo* wird die proteolytische Aktivität durch Aktivierung von Zymodemen, Veränderung der Synthese- und Abbaurate und endogene Inhibitoren reguliert (Hooper 2002). Cysteinpeptidasen werden als inaktive Vorläuferproteine (Zymodeme), die aus einem Signalpeptid (Präpeptid) und einem Propeptid bestehen, gebildet (Rawlings et al., 1994). Zur Erlangung enzymatischer Aktivität muss das Propeptid abgespalten werden. Das Propeptid gewährleistet die korrekte Faltung des Enzyms und das Verbleiben im inaktiven Zustand. Für Papain und Cathepsin B konnte gezeigt werden, dass die Propeptide als starke, reversible Inhibitoren der maturen Enzyme fungieren (Fox et al., 1992; Taylor et al., 1995). Die Prodomänen sind des Weiteren für den Transport der Peptidasen in lysosomale Kompartimente verantwortlich (Huete-Perez et al., 1999).

1.4 Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* und *E. dispar*

Das Genom von *E. histolytica* wurde im TIGR und Sanger Genomprojekt sequenziert. Durch Sequenzanalyse wurden bislang 20 für Cysteinpeptidasen kodierende Gene identifiziert, die zwei Familien zugeordnet werden können: EhCPA und EhCPB (Bruchhaus et al., 2003). Die Familien unterscheiden sich im N-terminalen Bereich der katalytischen Domäne und in der Position des katalytischen Cysteins. Weiterhin sind einige Mitglieder der Familie EhCPB putativ GPI verankert bzw. besitzen eine Transmembrandomäne. Cysteinpeptidasen der Familie EhCPA sind kleiner als die der Familie EhCPB, wobei es in jeder Familie jeweils eine Ausnahme gibt. Sämtliche Cysteinpeptidasen besitzen 6 konservierte Cysteinreste in der katalytischen Domäne, die für die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur wichtig sind und die konservierten Aminosäuren der katalytischen Dyade des katalytischen Zentrums, Cys und His. Bis auf die Cysteinpeptidasen EhCP6, EhCP11, EhCP16 und EhCP19 besitzen sämtliche Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* zusätzlich die Aminosäuren Asparagin und Glutamin im aktiven Zentrum (Bruchhaus et al., 2003).

Das so genannte ERFNIN-Motiv befindet sich in der Prodomäne von Cathepsin L ähnlichen Cysteinpeptidasen (Karrer et al., 1993). Dieses Motiv wurde in den Prodomänen von 19 der 20 Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* identifiziert (Bruchhaus et al., 2003). Trotz der strukturellen Übereinstimmung zu Cathepsin L entspricht die Aktivität eher der von Cathepsin B, da die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* das für Cathepsin B typische Substrat Z-Arg-Arg-pNA degradieren (Hellberg et al., 2001). Die Substratspezifität von Cathepsin B und Cathepsin L wird durch die Aminosäure 205 (Papainsequenz), die die S2-Bindungsstelle determiniert, festgelegt. In Cathepsin B ähnlichen Cysteinpeptidasen werden hier gewöhnlich Aminosäuren mit sauren Gruppen (Asp o. Glu), identifiziert (Scholze et al., 1988; Scholze et al., 1994; Jacobs et al., 1998), während in Cathepsin L ähnlichen Cysteinpeptidasen Alanin diese Position einnimmt (Barrett et al., 1998). In Übereinstimmung mit ihrer Substratspezifität ist in keiner der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* Alanin in Position 205 vorzufinden, aber sieben Cysteinpeptidasen besitzen Aspartat in 205 (Bruchhaus et al., 2003).

1.4.1 Expression von Cysteinpeptidasen in *E. histolytica* und *E. dispar*

In *E. histolytica* wurden kürzlich 20 für Cysteinpeptidasen kodierende Gene identifiziert (Bruchhaus et al., 2003). Hiervon werden unter Kulturbedingungen nur die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 hauptsächlich exprimiert und sind für ca. 90% der proteolytischen Aktivität verantwortlich (Bruchhaus et al., 1996). Die Cysteinpeptidasen EhCP3 und EhCP8 werden geringfügiger exprimiert, während die Cysteinpeptidasen EhCP9, EhCP16 und EhCP17 kaum exprimiert werden. Demgegenüber wird in *E. dispar* die Cysteinpeptidase EdCP3 unter Kulturbedingungen hauptsächlich exprimiert, gefolgt von EdCP2. Die Cysteinpeptidasen EdCP8, EdCP9, EdCP16 und EdCP17 werden – wie in *E. histolytica* – nur geringfügig exprimiert. In beiden Organismen werden unter Kulturbedingungen keine weiteren Cysteinpeptidasen exprimiert (Bruchhaus et al., 2003).

1.4.2 Die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 von *E. histolytica*

Aufgrund des Fehlens der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP5 in *E. dispar* (Willhoeft et al., 1999b), der hohen Sequenzübereinstimmung von EhCP1 und EhCP2 (Bruchhaus et al., 1996; Bruchhaus et al., 2003) und der Membranassoziation der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. histolytica* (Jacobs et al., 1998) kann vermutet werden, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 eine herausragende Rolle für die Pathogenität von *E. histolytica* spielen könnte.

Trotz der vermutlich wichtigen Bedeutung der Cysteinpeptidase EhCP5 für die Pathogenität von *E. histolytica* ist über ihre Funktion im Einzelnen wenig bekannt. Durch "Antisense"-Versuche konnte bislang festgestellt werden, dass – wenn die Cysteinpeptidase EhCP5 herunterreguliert wird – die proteolytische Aktivität um 90% verringert ist (Ankri et al., 1999b), obwohl die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 zusammen 90% der Aktivität der Amöben ausmachen (Bruchhaus et al., 1996). Diese Zellen sind nicht mehr in der Lage Amöbenleberabszesse zu verursachen (Ankri et al., 1999b). Virulente *E. histolytica*-Transfektanten, die stabil transfiziert *ehcp5*-"Antisense"-RNA exprimieren, entsprechen in der Wachstumsrate *in vitro*, im cytopathischen Effekt und der hämolytischen Aktivität denen der Kontrolle, allerdings ist die Phagozytoseaktivität signifikant erniedrigt (Ankri et al., 1998).

Wichtige Ergebnisse brachten auch Versuche, in denen die Cysteinpeptidase EhCP2 sowohl in *E. histolytica* als auch in *E. dispar* unter Kontrolle des Lektinpromotors überexprimiert wurde (Hellberg et al., 2001). Die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP2 führte zu einer vermehrten Ablösung von CHO-Zellrasen durch beide Amöbenspezies *in vitro*. Erstaunlicherweise war die Pathogenität *in vivo* nicht beeinflusst. Im Tiermodell mit Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) führte die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP2 zu keiner vermehrten Bildung von Amöbenleberabszessen.

Bis heute war es aus unbekannten Gründen nicht möglich die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP5, im gleichen Vektor wie die Cysteinpeptidase EhCP2, unter Kontrolle des Lektinpromotors zu überexprimieren (Hellberg et al., 2001).

Mit der Sequenzierung des Amöbengenoms war es möglich, einen neuen Vektor zu konstruieren, in dem die Cysteinpeptidase EhCP5 unter der Kontrolle geneigener 5'- und 3'-flankierender Sequenzen stand.

1.4.3 Die Bedeutung der Cysteinpeptidasen für die Pathogenität von *E. histolytica*

Lysosomale Cysteinpeptidasen degradieren Proteine, die von der Zelle aufgenommen oder von anderen Zellkomponenten den Lysosomen zugeführt werden. Die Endprodukte der Hydrolyse sind Dipeptide und Aminosäuren, die durch die lysosomale Membran diffundieren und somit der Proteinbiosynthese zur Verfügung stehen (Kirschke et al., 1995). Obwohl kaum Daten über die physiologische Funktion von Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* existieren, wird eine ähnliche Funktion vermutet.

Der Einfluss der Cysteinpeptidasen auf die Pathogenität von *E. histolytica* ist demgegenüber Bestandteil vieler Untersuchungen. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* im Zusammenhang mit der Pathogenität stehen:

- Es gibt einen direkten Zusammenhang zwischen der Cysteinpeptidaseaktivität der Trophozoiten von *E. histolytica* und der Virulenz der Amöben (Gadasi et al., 1983b; Lushbaugh et al., 1985; Reed et al., 1989; Keene et al., 1990; Navarro-Garcia et al., 1995). Demgegenüber konnten Montfort et al. keine Korrelation der Virulenz und der proteolytischen Aktivität nachweisen (Montfort et al., 1993).
- Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* lösen adhärent wachsende Fibroblasten ab (Keene et al., 1986 und 1990; Ankri et al., 1998).
- Verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix werden von Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* degradiert (Keene et al., 1986; Luaces et al., 1988; Schulte et al., 1989).
- Ein spezifischer Cysteinpeptidaseinhibitor (Stanley, Jr. et al., 1995) bzw. Laminin (Li et al., 1995) inhibieren die Bildung von Leberabszessen in SCID-Mäusen. Weiterhin kann die Bildung von Leberabszessen in Hamstern durch Expression einer "Antisense"-RNA nahezu vollständig inhibiert werden (Ankri et al., 1999b).

Wie bereits unter 1.4.1 und 1.4.2 beschrieben, bestehen zwischen *E. histolytica* und der apathogenen Art *E. dispar* Unterschiede im Vorhandensein und in der Expression von Genen, die für Cysteinpeptidasen kodieren. Neben den Cysteinpeptidasen konnte bislang nur die in *E. histolytica* vorkommende *ariel*-Genfamilie, die für Membranproteine codiert, in *E. dispar* auf genetischer Ebene ausgeschlossen werden (Willhoeft et al., 1999a).

Zusätzlich zu den Cysteinpeptidasen gibt es weitere Pathogenitätsfaktoren wie das Adhärenzlektin (Petri, Jr. et al., 1987; Mann et al., 1991; Tannich et al., 1991b; Tannich et al., 1992), porenbildende Peptide und Phospholipasen (Ravdin 1986; Vargas-Villarreal et al., 1998). Erst die Adhäsion mittels des β -D-Galaktose/N-Acetylgalaktosamin-spezifischen Adhärenzlektins an eine Zielzelle oder Substrat ermöglicht vermutlich die Wirkung der obigen genannten Effektormoleküle Amöbapores und Cysteinpeptidasen. Mittels der "Antisense"-Technologie, die zu einer deutlichen Reduktion der Abszessbildung im Tiermodell führte, wurde die Bedeutung des Lektins und des Amöbapores für die Pathogenität demonstriert (Bracha et al., 1999; Ankri et al., 1999b).

1.5 Cysteinpeptidaseinhibitoren: Klassifikation und Funktion

Cysteinpeptidaseinhibitoren kommen aus den verschiedensten Substanzklassen. Für die Stoffwechselregulation sind natürliche Cysteinpeptidaseinhibitoren zur Inhibierung der Cysteinpeptidasen sehr wichtig. Die natürlichen Cysteinpeptidaseinhibitoren gehören zur Familie der Cystatine und werden in drei Gruppen eingeteilt: Stefine, Cystatine und Kininogene (Otto et al., 1997). Zu den synthetischen Cysteinpeptidaseinhibitoren gehören u.a. die Diazomethylketone, Fluoromethylketone, Chloromethylketone, Acyloxymethylketone und Peptid-Epoxide.

Cysteinpeptidaseinhibitoren können aufgrund ihres Wirkmechanismus, ihres Ursprungs, der Strukturverwandtschaft oder ihrer Spezifität klassifiziert werden. Es gibt Peptidaseinhibitoren, die mit einer Klasse von Peptidasen reagieren, Inhibitoren, die anscheinend spezifisch für eine Klasse von Peptidasen sind und Inhibitoren die eine hohe Selektivität für eine bestimmte Peptidase besitzen. Im folgenden seien zur Übersicht nur die in dieser Arbeit verwendeten Cysteinpeptidaseinhibitoren kurz vorgestellt.

Ausgewählt wurde E-64 als nicht membranpermeabler Cysteinpeptidaseinhibitor der nahezu sämtliche Cysteinpeptidasen hemmt. E-64d ist ein membranpermeables Analogon von E-64 mit ähnlicher Spezifität wie E-64. Z-Phe-Phe-DMK ist ein membranpermeabler irreversibler Cysteinpeptidaseinhibitor mit niedrigerer Affinität zu Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* als Z-Phe-Ala-DMK. Hydroxymercuribenzoat ist ein reversibler Cysteinpeptidaseinhibitor mit einer Spezifität für Thiolgruppen.

1.5.1 Peptid-Epoxide

1978 isolierte Hanada aus einem Extrakt von *Aspergillus japonicus* einen hochaktiven irreversiblen Inhibitor von Papain (Hanada et al., 1978c) und identifizierte ihn als 1-[[N-(L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane, E-64 (Hanada et al., 1978b). E-64 reagiert nicht mit freien Thiolgruppen und auch nicht mit der nichtproteolytischen Thiol-abhängigen Laktat-Dehydrogenase (Hanada et al., 1978a). Die Hemmung der Cysteinpeptidase verläuft über die Alkylierung des katalytischen Cysteins durch die trans-Epoxid-Gruppe, wobei sich nach nukleophilen Angriff von C2 oder C3 unter Öffnung des Oxiran-Ringes die Thioetherbindung bildet. Verschiedene E-64 Derivate wurden entwickelt (Hanada et al., 1978a). So konnte zum einen die Spezifität von E-64, als auch die Membrangängigkeit variiert werden. Die Membranpermeabilität von E-64 wird durch die Hydrophobizität bestimmt. Nur neutrale E-64 Derivate sind membranpermeabel. In ihnen wird Agmatin durch eine Alkylgruppe und die Carboxylgruppe wird durch Ester oder Amid ersetzt (siehe Abb. 1).

E-64d (Synonym: EST) wurde zur oralen Applikation entwickelt. In E-64d ist Ethanol an E-64c verestert, wodurch E-64c membranpermeabel wird. Während des Aufenthaltes im Verdauungstrakt wird die EtOH-Gruppe mittels Esterase hydrolysiert und im Blut zu E-64c

"aktiviert" (Katunuma et al., 1995). Die Ester sind ca. um Faktor 10 – 100 weniger potent als die freien Säuren.

Des Weiteren unterscheiden sich die verschiedenen E-64 Derivate anhand ihrer Seitenketten voneinander. Durch die Seitenkette, die mit dem Enzym reagiert, wird die Affinität zur Cysteinpeptidase festgelegt. E-64 hemmt nahezu alle Cysteinpeptidasen. Die Affinitäten von E-64 und E-64c sind – abhängig von der Cysteinpeptidase – nahezu identisch.

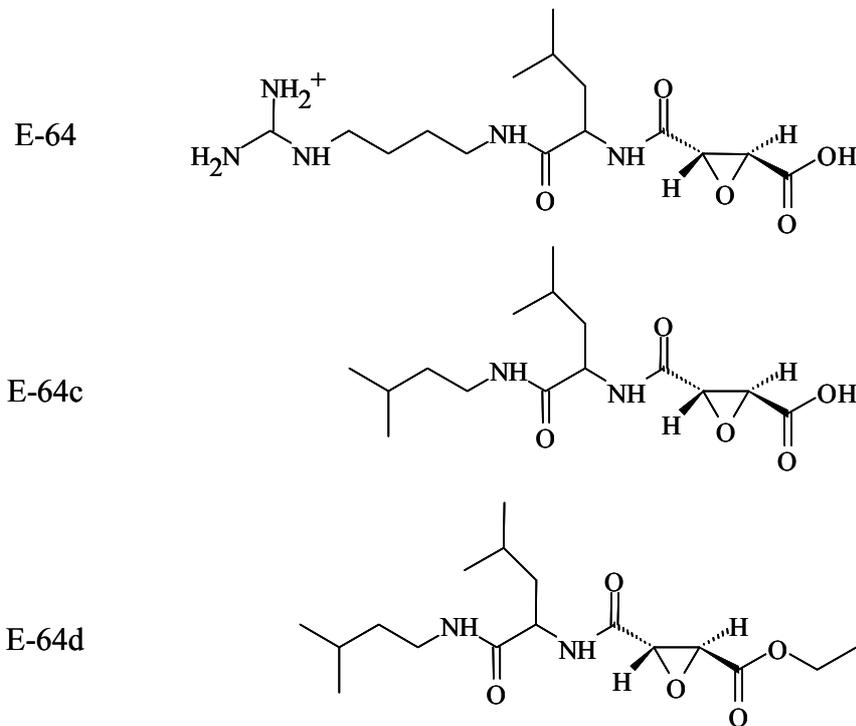


Abb. 1: E-64 und Derivate.

Die Grundstruktur von E-64 lässt sich mit Ax-A1A2-ES-trans-O-R bezeichnen, wobei:
 Ax = Agmatin oder Alkylgruppe, A1A2 = Aminosäuren, wichtig für die Spezifität des E-64 Derivates, ES = Epoxysuccinat, R = Ester oder Amid.

1.5.2 Peptidyl Diazomethylketone

Peptidyl Diazomethylketone, auch Peptidyl Diazomethane genannt, stellen Oligopeptidderivate dar. Die Hydroxygruppe der terminalen Carboxylatgruppe ist durch die Diazomethylgruppe (CH-N=N) ersetzt. Die Hemmung ist irreversibel und erfolgt über die Bildung eines Thiohemiketalintermediates. Das Kohlenstoffatom der Diazomethylgruppe wird anschließend durch das Imidazoliumion des Histidins protoniert. Diese Protonierung stellt den limitierenden Schritt der Reaktion dar. Anschließend folgt mit der Thioetherbildung die Alkylierung des Cysteins des aktiven Zentrums. Die Reaktion findet bevorzugt im schwach sauren pH-Bereich statt, da eine Protonierung für die Bildung eines instabilen Diazoniumions notwendig ist.

Diazomethylketone hemmen spezifische Cysteinpeptidasen und reagieren – bis auf wenige Ausnahmen – nicht mit Serinpeptidasen. Die Selektivität ist hoch und wird durch die Peptideinheit determiniert. Die Diazomethylketone reagieren nicht mit freiem Cystein.

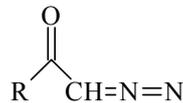


Abb. 2: Grundstruktur der Diazomethylketone.

1.5.3 p-Hydroxymercuribenzoat (pHMB)

pHMB ist ein reversibler Inhibitor von Thiolgruppen (Lucassen et al., 2003), die eine hohe Affinität zum Quecksilber besitzen. *In vitro* kann die Hemmung durch reduzierende Agenzien wie DTT oder ME aufgehoben werden (Bohn et al., 1974; Gupta et al., 1990; Navarro-Garcia et al., 1995). Von Massaro et al. wurde gezeigt, dass die Reaktivierung von Enzymen, die durch pHMB gehemmt wurden von der Zusammensetzung des verwendeten Puffersystems abhängen kann (Massaro et al., 1966). pHMB hat sich bereits als potenter Inhibitor der Lysophospholipase von *P. falciparum* erwiesen und verhinderte das Wachstum des Parasiten (Zidovetzki et al., 1994). Die Behandlung von *E. histolytica* mit pHMB führte zu einer verminderten Entzündungsreaktion in Ratten (Becker et al., 1988).

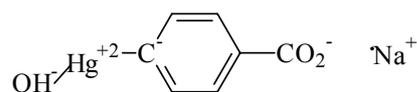


Abb. 3: p-Hydroxymercuribenzoat, PHMB, Natrium-4-hydroxymercuriobenzoat.

1.6 Funktionen von Cysteinpeptidasen in parasitischen Protozoen

Cysteinpeptidasen sind in vielen parasitischen Protozoen die dominierende Familie der Peptidasen. Sie stellen zusätzlich zu einfachen Verdauungsfunktionen spezifische, für den Organismus unentbehrliche, Funktionen zur Verfügung und sind zum Beispiel an der Replikation, Wachstum, Zelldifferenzierung, Excystierung und Signalübertragungskaskaden beteiligt (Lecaille et al., 2002).

Weiterhin sind die Cysteinpeptidasen parasitischer Protozoen an verschiedenen Aspekten der Parasit-Wirts-Beziehung involviert und stellen Virulenzfaktoren dar. Sie degradieren Komponenten des Immun- und des Komplementsystems sowie Proteine der extrazellulären Matrix. Sie sind an der Prozessierung von Zymodemen wie z.B. Prokollagenase und Proenzymen beteiligt und können die Blutgerinnung beschleunigen. Des Weiteren besitzen sie Kininogenase Aktivität und können Bradykinin freisetzen. (McKerrow 1989; North et al., 1990; Souza et al., 1992; Mottram et al., 1997; Rosenthal 1999; Sajid et al., 2002). Cysteinpeptidasen parasitischer Organismen haben aufgrund ihrer vielfältigen extrazellulären Funktionen andere pH-Optima und sind in höheren extrazellulären Konzentrationen als die Cysteinpeptidasen des Wirtsorganismus anzutreffen, die in der Regel in den Lysosomen lokalisiert sind (Sajid et al., 2002).

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung in Protozoen und Helminthen bieten Cysteinpeptidasen parasitischer Protozoen interessante Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Therapeutika. Entscheidend ist allerdings, dass sich die Cysteinpeptidasen der Parasiten von denen des Wirtes genügend unterscheiden. Viele Cysteinpeptidasen vom Typ Cathepsin B, L und S übernehmen wichtige Funktionen im Menschen (Sajid et al., 2002).

1.6.1 Cysteinpeptidasen parasitischer Protozoen als "drug-target"

Zur Zeit gibt es keine Vakzine gegen durch Protozoen verursachte Erkrankungen im Menschen (Dalton et al., 2001). Da gegen bestehende Medikamente immer neue Resistenzen auftreten, könnten – aus obig genannten Gründen (siehe 1.6) – Cysteinpeptidasen parasitischer Protozoen bei der Entwicklung neuer Medikamente behilflich sein (Selzer et al., 1999; Lecaille et al., 2002). In verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Experimenten wurde bereits die Wirksamkeit von Cysteinpeptidaseinhibitoren gegenüber Parasiten belegt.

Cysteinpeptidaseinhibitoren hemmen das Wachstum und die Replikation von *Plasmodium falciparum* (Rosenthal et al., 1991; Rosenthal et al., 1996), *Trypanosoma cruzi* (Ashall et al., 1990; Harth et al., 1993; Franke de Cazzulo et al., 1994; Engel et al., 1998b), *Trypanosoma brucei* (Troeborg et al., 1999) und *Leishmania major* (Selzer et al., 1997).

In verschiedenen *in vivo* Experimenten mit Mäusen führten Cysteinpeptidaseinhibitoren zum mildereren Krankheitsverlauf von *Leishmania* Infektionen (Selzer et al., 1999) zur Abtötung von *Trypanosoma brucei* (Scory et al., 1999) und zur Heilung experimenteller *Trypanosoma cruzi* (Engel et al., 1998a), sowie experimenteller *Plasmodium vinckei* Infektionen (Olson et al., 1999; Singh et al., 2001; Lee et al., 2003).

Die proteolytische Aktivität von *Trypanosoma cruzi* wird hauptsächlich einer Cathepsin-L ähnlichen Cysteinpeptidase zugerechnet. In einer Studie mit zwei Fluoromethylketonen als irreversible Substratanaloga hatten Konzentrationen, die den Lebenszyklus des Parasiten unterbrachen, keine Wirkung auf Makrophagen, Fibroblasten oder epitheliale Zellen *in vitro*. Aus der unterschiedlichen Affinität der Cysteinpeptidasen des Parasiten im Vergleich zu den Cysteinpeptidasen des Wirtes kann geschlossen werden, dass Cysteinpeptidaseinhibitoren die Möglichkeit bieten die Chagas-Krankheit wirksam zu bekämpfen (Harth et al., 1993). Allerdings zeigten Fluoromethylketone in höheren Dosierungen toxische Nebenwirkungen. Aus der Suche nach weniger toxischen Inhibitoren gingen Vinyl-Sulfone hervor, die im Tiermodell mit Mäusen *T. cruzi* abgetötet haben. Aus weiteren Versuchen ist der selektive Cruzaininhibitor K11777 hervorgegangen. Die fehlende Toxizität von Vinyl-Sulfonen liegt darin begründet, dass die im Blut vorhandenen Inhibitorkonzentrationen ausreichen um Cysteinpeptidasen des Parasiten zu inhibieren, intrazelluläre Cysteinpeptidasen des Wirtes jedoch nicht erreicht werden.

Anders als zur Zeit für die Amoebiasis stellt die zunehmende Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegenüber Malariamedikamenten ein großes Problem dar (White 1998). Als Alternative Behandlungsmöglichkeit werden Cysteinpeptidaseinhibitoren in Erwägung gezogen. Die Cysteinpeptidase Falcipain ist eine für *P. falciparum* essentielle Hämoglobinase (Rosenthal et al., 1988; Shenai et al., 2000). Durch Cysteinpeptidaseinhibitoren kann die Hydrolyse von Hämoglobin blockiert werden, woraufhin die Entwicklung des Parasiten zum Stillstand kommt (Rosenthal et al., 1991; Rosenthal et al., 1996). Verschiedene Stämme von *P. falciparum*, die unterschiedliche Medikamentenresistenzen aufwiesen, waren gegenüber Cysteinpeptidaseinhibitoren gleichermaßen sensitiv. Die Sequenz von Falcipain ist zwischen den verschiedenen Malariastämmen hochkonserviert. Vermutlich trat deshalb keine Kreuzresistenz zwischen verschiedenen Cysteinpeptidaseinhibitoren und Malaria-Medikamenten auf und Falcipain stellt somit ein mögliches "drug-target" dar (Singh et al., 2001). Mäuse konnten bereits mit Cysteinpeptidaseinhibitoren von normalerweise tödlich verlaufenden Malariainfektionen geheilt werden (Rosenthal et al., 1993; Olson et al., 1999). Allerdings muss erwähnt werden, dass es Singh et al. gelang Vinyl-Sulfone-Cysteinpeptidaseinhibitor resistente *Plasmodium falciparum* zu generieren. Die resistenten Zellen waren gegenüber verwandten Dipeptidylinhibitoren auch resistent, besaßen allerdings eine minimale Resistenz gegenüber anderen Cysteinpeptidaseinhibitoren. Die Resistenz ging nach ca. 12 wöchiger Kultivierung ohne Cysteinpeptidaseinhibitor verloren. Die Resistenz war spezifisch für den Cysteinpeptidaseinhibitor, der für die Selektion verwendet wurde und beruhte auf dem veränderten Transport des Cysteinpeptidaseinhibitors und der Amplifikation der Gene, die für die Proteine codieren (Singh et al., 2004).

Für *E. histolytica* konnte bislang *in vivo* keine Resistenz gegenüber der momentanen hauptsächlich verwendeten Therapie mit Metronidazol bzw. Paromomycin beobachtet werden. Demgegenüber führte die Kultivierung von *E. histolytica* mit Metronidazol zu Metronidazolresistenten Amöben *in vitro* (Wassmann et al., 1999) und die Überexpression

des p-Glykoproteins durch stabile Transfektion führte zur Resistenz gegenüber Emetine (Ghosh et al., 1996). Erst kürzlich konnte die Resistenz gegenüber Emetine aufgeklärt werden (Banuelos et al., 2002).

Aufgrund der guten Behandlungsmöglichkeit der Amoebiasis und da bislang keine Resistenzen *in vivo* aufgetreten sind, erscheint es zur Zeit nicht vordringlich, eine alternative Therapiemöglichkeit für die Behandlung der Amoebiasis zu entwickeln. Das vermehrte Auftreten von Resistenzen in anderen parasitischen Protozoen und die viel versprechenden Ergebnisse, die bislang in *in vitro* und *in vivo* Experimenten erzielt wurden, legen aber die Überlegung nahe, ob Cysteinpeptidaseinhibitoren eine mögliche Behandlungsalternative für die Amoebiasis darstellen.

1.7 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Versuche zur Funktionsanalyse der Cysteinpeptidase EhCP5 durchgeführt werden. Hierzu sollte die Cysteinpeptidase EhCP5 in einem geeigneten Expressionssystem in *E. histolytica* überexprimiert und der Einfluss auf die proteolytische Aktivität sowie die *in vitro* und *in vivo* Pathogenität der Trophozoiten gemessen werden.

In einem zweiten Abschnitt sollte die Reaktion von *E. histolytica* auf Cysteinpeptidaseinhibitoren untersucht werden. Da sich sehr leicht Resistenzen gegenüber E-64 ausbildeten, sollte geklärt werden, ob die Resistenz einen Einfluss auf die pathogenen Eigenschaften der Zellen hat und auf welchem Mechanismus die Resistenz möglicherweise beruht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Ausnahmen sind gesondert vermerkt

2.1.1 Chemikalien

[α - ³² P]dATP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Hybaid, Ashford, GB
Acrylamid/Bisacrylamid (49:1)	Hybaid, Ashford, GB
Agarose	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
ATP	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto Agar	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
BCA Protein Assay	Pierce Chemicals, Rockford, USA
BCIP	Biomol, Hamburg
Diamond Vitamin Tween 80 Solution (40x)	JRH Biosciences, Lenexa, USA
dNTP Set	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA, APS	Serva Electrophoresis, Heidelberg:
EGTA	Merck, Darmstadt
Epon 812	Fluka, Deutschland
G418-Sulfat	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Gelatine vom Schwein (Haut)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glücksklee Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt
Glycerin	Biomol, Hamburg
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
HEPES	Biomol, Hamburg
IPTG	Biomol, Hamburg
L-Gluthamin	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Ni-NTA-Superflow™	QIAGEN, Hilden
Penicillin	Grünenthal, Aachen
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Reduziertes und oxidiertes Glutathion	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI 1640	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
SDS	Biomol, Hamburg
"SEAKEM" GTG Agarose	FMC BioProducts, Rockland, USA

Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Streptomycin	Sanativa, Werne
"TRIzol"-Reagenz	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Trypticase Pepton	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
Trypton	Becton Dickinson, Cockeysville, USA
X-Gal	Appligene Oncor, Heidelberg
Z-Arg-Arg-pNA	BACHEM Biochemica, Heidelberg
Z-Phe-Arg-pNA	BACHEM Biochemica, Heidelberg

2.1.2 Geräte und Materialien

10 ml-Leersäulen	MoBiTec, Göttingen
3 MM Whatmanpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Cryotubes	Nalge Nunc Int., Rochester USA
Dialyseschläuche "ZelluTrans/Roth" 12,0	Carl Roth, Karlsruhe
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Eurogentec, Seraing, Belgien
EM 910	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gelkammer für 2D-Gelelektrophorese	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Gelkammer für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
Gene Pulser™ Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München
Horizon 58 Gelkammer für Agarosegele	GIBCO BRL, Karlsruhe
Hybridisierungsröhrchen	Biometra, Göttingen
Immobiline DryStrip, 18 cm, pH 3 – 10 und pH 4 – 7	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPGphor™ Isoelectric Focusing System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kulturschalen (50, 250 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Microplate Reader MRX II	Dynex, Denckendorf
MicroSpin™ S-300 HR Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mikrotiterplatten "96-well-plates"	Nunc, Roskilde, Dänemark
Millipore ZipTip C18	Millipore, Bedford, USA
Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 83)	Schleicher und Schüll, Dassel
NucleoBond-PC 2000 Megaprep-Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nylonmembran "Biodyne"	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
PCR Sprint, Temperature Cycling System	Hybaid, Ulm
QIAGEN-tip 2500-Säulen	QIAGEN, Hilden
Röntgenfilm: BIOMAX™ MS	Eastman Kodak, Rochester, USA
Röntgenfilm: X-OMAT™ AR	Eastman Kodak, Rochester, USA
Sonifier 250	Branson, USA
Sonorex Super	Bandelin electronic, Berlin

SpeedVac, Concentrator 5301	Eppendorf Hamburg
Sterilfilter Sterivac™	Millipore, Bedford, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf Hamburg
UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Voyager-DE™ STR Biospectrometry Workstation	Applied Biosystems, Foster City, USA
Zellkultur-Testplatten "24-well-plates"	Nunc, Roskilde, Dänemark

2.1.3 Enzyme und Enzyminhibitoren

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Promega, Madison, USA
E-64	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
E-64d	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
p-Hydroxymercuribenzoat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pwo-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Terminale Transferase, RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin ("sequencing grade")	Roche Diagnostics, Mannheim
Z-Phe-Ala-DMK	Bachem, Weil am Rhein
Z-Phe-Phe-DMK	Bachem, Weil am Rhein

2.1.4 Immunreagenzien und Seren

(AP)-konjugierte Anti-Kaninchen-IgG (Esel)	Dianova, Hamburg
Alkalische Phosphatase	Dianova, Hamburg
AP-konjugierte Anti-Maus-IgG (Ziege)	Dianova, Hamburg
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Newport Beach, USA
Monoklonale Anti-"Histidine Tag"-IgG (Maus)	Dianova, Hamburg
Rinderserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Spezifische Kaninchenantikörper gegen Peptidregionen maximaler Divergenz der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 von *E. histolytica* (Anti-PepEhCP1, Anti-PepEhCP2) wurden von PD Dr. Matthias Leippe bereitgestellt.

2.1.5 Marker

Als DNA-Längenstandards wurden die "DNA-Molecular Weight Marker V und VI" von Roche Diagnostics (Mannheim) und "Gene Ruler™ 1kB Ladder" (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) verwendet. Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der "prestained SDS-PAGE Standard, Low Range", für die 2-Dimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese der "prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range" von Bio-Rad (München) eingesetzt.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die aufgeführten Puffer und Lösungen werden im weiteren Text nicht näher erläutert. Die jeweiligen Arbeitskonzentrationen wurden durch Verdünnen der Stammlösungen mit Aqua bidest hergestellt.

MOPS-Puffer (10x)

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	20 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

SSPE (20x)

NaCl	3 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
EDTA	20 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

NaPBS (10x)

Na ₂ HPO ₄	67 mM
NaH ₂ PO ₄	33 mM
NaCl	1,4 M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,2 eingestellt.

TAE-Puffer (10x)

Tris	0,4 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	20 mM

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 7,9 eingestellt.

PBS (10x)

Na ₂ HPO ₄	57 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM
NaCl	750 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,2 - 7,4 eingestellt.

TBE-Puffer (10x)

Tris	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	25 mM

TBS (10x)

Tris-HCl, pH 7,2	100 mM
NaCl	1,5 M

SSC (20x)

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt.

TE-Puffer (10x)

Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
EDTA, pH 8,0	5 mM

2.2 Organismen und Plasmide

2.2.1 Organismen

In Tab. 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt.

Tab. 2: *Escherichia coli*-Stämme

Stämme	relevanter Geno- oder Phänotyp	Referenz/Herkunft
BL21(DE3) pAPlacI ^Q	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>) [pAPlacI ^Q]	Dr. O. Fayet, Toulouse
DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan 1983)
One Shot Top 10 TM	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lac X74 deoR rec A1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>gal U gal K rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. histolytica* und *E. dispar*-Isolate sind Patientenisolate, die schon seit mehreren Jahren im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin kultiviert werden (BNI: Patientenisolate des Bernhard-Nocht-Institutes). Der Stamm *E. histolytica* HM-1:IMSS "30459" wurde von der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 30459) aus den USA bezogen. Das Genom dieses Isolates wurde im TIGR- und Sanger Genomprojekt sequenziert. Die Differenzierung zwischen *E. histolytica* und *E. dispar* erfolgte u.a. durch die *in vitro* Amplifikation spezifischer Genfragmente (Tannich et al., 1991a).

E. dispar SAW 760 wurde monoxenisch mit *Crithidia fasciculata* kultiviert. *E. dispar* SAW 760 und *Crithidia fasciculata* wurden freundlicherweise von Dr. Graham Clark (London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, GB) zur Verfügung gestellt.

"Chinese hamster ovary"-Zellen (CHO-Zellen, Wildtyp) wurden von der "American Type Culture Collection" bezogen (ATCC Nr.: CRL-9096).

2.2.2 Plasmide

In der Tab. 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Plasmide aufgeführt. Genomische und cDNA-Klone der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* wurden freundlicherweise von PD Dr. Iris Bruchhaus (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Tab. 3: Klonierungsvektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Plasmid- größe ^a	Relevante Merkmale	Referenz / Herkunft
PBS(+)	3204	Amp ^r , colE1 ori, F1 ori, <i>lacZ</i> , T3- und T7-Promotor,	Stratagene, La Jolla, USA
PCR [®] 2.1	3890	Amp ^r , Km ^r , colE1 ori, F1 ori, <i>plac</i> , <i>lacZ</i> α , T7-Promotor	Invitrogen, Carlsbad, USA
pJC45	2399	Amp ^r , colE1 ori, T7-Polymerase unter λ p _L , <i>lac</i> Operator, 10His, Faktor Xa, Terminator	(Schluter et al., 2000)
pJC45-EhCP5	3307	s. pJC45, <i>ehcp5</i> aus <i>E. histolytica</i> (Proform)	(Hellberg et al., 2002)
pNeoBox	5 kB	s. pBS(+), Neo ^r ,	(Hamann et al., 1995)
pNeoCass	6011	s. pBS(+), Neo ^r , 5'/3'-Aktinbereiche, Lektinpromotor	(Wassmann et al., 1999)
pNeoEhCP2	6956	s. pNeoCass, <i>ehcp2</i> aus <i>E. histolytica</i>	(Hellberg et al., 2001)
pNeoEhCP5-TOPO	10,7 kBp	s. pNeoBox, <i>ehcp5</i> aus <i>E. histolytica</i>	Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. E. Tannich zur Verfügung gestellt

Bis auf die käuflich erworbenen Klonierungsvektoren lagen alle Plasmide in *E. coli* DH5 α bzw. TOP10 Zellen als Wirtstamm vor. ^aDie Größe der Plasmide ist in Bp angegeben.

2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen

2.3.1 Medien

LB-Medium (Sambrook et al., 1989)

Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)

Agarplatten wurden durch zufügen von 1,5% (w/v) Agar hergestellt.

RPMI-Medium

Vor der Benutzung wurde RPMI 1640 (GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe) durch die Zugabe von 2 mM L-Guthamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % (v/v) inaktiviertes, fötales Kälberserum (FCS, 2 x 30 min, 56 °C) vervollständig und sterilfiltriert. Inkomplettem RPMI-Medium wurde kein FCS zugegeben.

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

Trypticase	20,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
Glukose	10,0 g
NaCl	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
L-Cystein	1,0 g
Ascorbinsäure	0,2 g
Fe-Ammoniumcitrat	22,8 mg

Die Bestandteile des Mediums wurden in 870 ml Aqua bidest gelöst und der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 6,8 eingestellt. Anschließend wurde das Medium für 15 Minuten im Dampfdrucktopf autoklaviert. Vor Benutzung des Mediums wurden 150 ml inaktiviertes Rinderserum (2 x 30 min, 56°C), 30 ml Vitaminlösung ("Diamond Vitamin Tween 80 Solution" (40x)), 0,2 g Streptomycin und 2×10^5 U Penicillin zugegeben.

Das vollständige Medium wurde mit einer Sterilfiltrationseinheit ("Sterivac") sterilfiltriert und maximal 14 Tage nach der Herstellung verwendet.

Medienzusätze

Medienzusätze sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Medienzusätze

Medienzusatz	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml ^a	100 µg/ml
G418	100 mg/ml ^{a,c}	10-100 µg/ml
Glukose	20 % (w/v) ^b	0,5-2 % (v/v)
L-Gluthamin	200 mM ^e	2 mM
IPTG	1 M ^d	0,05-1 mM (rekombinante Expression) 3,75 mM (Agarplatte)
Kanamycin	50 mg/ml ^d	50 µg/ml
Penicillin-Streptomycin	10000 U/ml Penicillin, ^c 10000 µg/ml Streptomycin ^c	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Penicillin	2 x 10 ⁵ U/ml ^c	200 U/ml
Streptomycin	0,2 g/ml ^c	200 µg/ml
X-Gal	20 % (w/v) ^f	0,075 % (v/v) (Agarplatte)

^a Die Lösungen wurden sterilfiltriert, die Lagerung erfolgte bei -20 °C bzw. 4 °C.

^b Die Lösung wurde autoklaviert, die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

^{c,d,e,f} Die Komponenten wurden in Aqua ad iniectabilia^c, Aqua bidest^d, 0,1 M HEPES (pH 7,6)^e, bzw. N,N-Dimethylformamid^f gelöst.

2.3.2 Kultivierung und Ernte von Amöben

Trophozoiten der *E. histolytica*-Isolate HM-1:IMSS "BNI" und HM-1:IMSS "30459" wurden unter sterilen Bedingungen axenisch, Trophozoiten von *E. dispar* SAW 760 wurden monoxenisch in co-kultur mit *Crithidia fasciculata* in mit 15 % (v/v) Rinderserum und Antibiotika komplettiertem TYI-S-33-Medium (s. 2.3.1) unter mikroaerophilen Bedingungen (< 5% O₂) bei 35°C in 50 ml bzw. 250 ml Kulturschalen kultiviert.

Crithidia fasciculata wurde bei RT in TYI-S-33 Medium in 250 ml Kulturschalen kultiviert, die ca. zu 2/3 mit Nährmedium gefüllt waren. Ca. 3% (v/v) *Crithidia fasciculata* der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden *E. dispar* zugegeben.

Für die Versuchsdurchführungen wurden Trophozoiten von *E. histolytica* und *E. dispar* stets in der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Um die Amöben zu ernten, wurden die Zellkulturschalen für 5 – 10 min auf Eis gestellt, wodurch sich die Zellen vom Untergrund ablösen und dekantiert werden konnten. Die Amöben wurden zentrifugiert (400 x g, 5 min, 4°C) und zweimal mit kaltem TYI-S-33 Medium bzw. PBS gewaschen. Wenn nötig, wurde die Zellzahl mit der NEUBAUER-Zählkammer bestimmt.

2.3.3 Kultivierung weiterer Organismen

CHO-Zellen wurden in mit 20 ml RPMI-Medium (s. 2.3.1) gefüllten 250 ml Zellkulturschalen bei 37°C unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre unter sterilen Bedingungen kultiviert.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen mittels limitierter Trypsinbehandlung abgelöst. Die CHO-Zellen wurden anschließend für 5 min bei 4°C und 400 x g zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Wenn nötig, wurde die Zellzahl mit der NEUBAUER-Zählkammer bestimmt.

E. coli wurde in LB-Medium aerob bei 37 °C in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben auf einem Rundschüttler (150—200 Upm) kultiviert. Für die Langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in LB-Medium kultiviert, mit 1 Vol. 10% sterilem Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Plasmid-Mini-Präparation)

Für die Präparation von Plasmid DNA im kleinen Maßstab wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim et al., 1979).

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Plasmid-Mega-Präparation)

Für die Transfektion von *E. histolytica* und *E. dispar* wurden größere Mengen hochsaurer Plasmid-DNA benötigt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Nucleobond AX Kit (Macherey Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde durch Restriktionsverdau (s. 2.6.1) und Gelelektrophorese (s. 2.7.1) überprüft.

2.4.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Entamoeba sp.*

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit TRIzol® (GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. TRIzol® ist ein Phenol und chaotrope Salze enthaltendes Reagenz, mit dem die RNA direkt aus Zellen und Geweben isoliert werden kann. Die gefällte RNA wurde bei -70°C eingefroren.

2.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.5.1 Fällung von Nukleinsäuren

Um DNA- und RNA-Lösungen zu entsalzen bzw. zu konzentrieren wurde mit 0,7 – 0,8 Vol. Isopropanol oder mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Vol. 96% (v/v) Ethanol gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (15000 x g, 15 min, RT) und zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in Aqua bidest oder TE-Puffer (pH 8,0), die getrocknete RNA in DEPC-Wasser aufgenommen.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle

Um die Konzentration wässriger DNA- und RNA-Lösungen zu bestimmen, wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Für eine optische Dichte (OD) von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, für RNA und einzelsträngige DNA hingegen eine Konzentration von 40 µg/ml angenommen. Über das Verhältnis der OD_{260nm} zu OD_{280nm} wurde die Reinheit der DNA- und RNA-Lösungen bestimmt (Sambrook et al., 1989).

2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In analytischen Restriktionsverdauen (20 µl Ansatz) wurden 1 – 2 µg DNA mit 3 – 5 U Enzym/µg DNA 1 – 2 Stunden inkubiert. Präparative Restriktionsverdau (50 – 100 µl) hingegen wurden mit 20 – 40 µg DNA und 2 – 3 U Enzym/µg DNA für mindestens drei Stunden inkubiert. Temperatur und Puffersystem wurden wie vom Hersteller empfohlen verwendet.

2.6.2 Radioaktive Markierung von DNA

DNA-Sonden wurden mit dem "Prime-a-Gene[®] Labeling System" (Promega, Madison, USA), das auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg et al., 1983) beruht, radioaktiv markiert. Zunächst wurden 25 ng eines linearen DNA-Fragments in 30 µl Aqua bidest für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 1 x labeling Puffer, 400 µg/ml BSA, 20 µM dCTP, dGTP, dTTP 50 µCi [α -³²P]dATP und 5 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die freien Nukleotide über eine Gelfiltrationssäule (MicroSpin[™] S-300 HR Column) entfernt. Die freien Nukleotide verblieben auf der Säule, während sich die markierte DNA im Durchfluss befand. Die fertige DNA-Sonde wurde vor dem Gebrauch für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.7 Trennung von DNA und DNA-Fragmenten

2.7.1 Agarosegelelektrophorese

Um negativ geladene DNA-Moleküle im elektrischen Feld sowohl analytisch als auch präparativ zu trennen wurden Agarosegelelektrophoresen in Gelkammern der Firma Hybaid (Ashford, GB) durchgeführt. Für die aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden - abhängig von ihrer Größe - Agarosekonzentrationen von 0,7% – 3% (w/v) in TBE Puffer verwendet, denen zur späteren Detektion der DNA-Banden im UV-Licht Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) beigemischt wurde. Die DNA wurde zunächst mit einem entsprechenden Volumen an DNA-Probenpuffer versetzt, die Trennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 5 Volt/cm in TBE-Puffer. Die Fragmentlänge wurde anhand der unter 2.1.5 aufgeführten Größenmarkern bestimmt, auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert (Mini-Transilluminator; BIO-RAD, München).

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylene Cyanol FF	0,25 % (w/v)
Saccharose	40 % (w/v)

2.7.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit "Elution Tubes"

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in entsprechende Vektoren und zur Gewinnung von DNA-Sonden wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert.

Hierzu wurden "Elution Tubes" ("Spin Columns", 2 ml, Ambion, Austin, USA) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte unter Standardbedingungen (s. 2.7.1). Die entsprechende DNA-Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in "Elution Tubes" überführt und für mindestens drei Stunden bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde das "Tube" zentrifugiert (15000 x g, 20 min, RT) und die DNA unter Zugabe von 1/10 Volumen NaAcetat (3M, pH 4,6) und 2,5 Volumen EtOH 100% gefällt.

2.8 Transformation von *Escherichia coli*

2.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21DE3 für die Transformation

Die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α erfolgte in 200 ml-Kulturen in LB-Medium, die mit 1% einer Vorkultur inokuliert wurden. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,4–0,5 wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt, sedimentiert (3000 x g, 10 min, 4°C), in 34 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendiert, wiederum 10 min auf Eis gekühlt, sedimentiert (3000 x g, 10 min, 4°C) und in 8 ml FSB-Puffer aufgenommen. Unter kontinuierlichem Schwenken wurde 280 μ l DMSO hinzugegeben, die Zellen für 15 min auf Eis gekühlt, erneut 280 μ l DMSO unter Schwenken hinzugefügt, sofort aliquotiert und in Trockeneis / Ethanol eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Kompetente *E. coli* BL21(DE3)pAPlacI^Q wurden für die rekombinante Expression von Cysteinpeptidasen verwendet. Die Zellen wurden – wie obig beschrieben – in LB-Medium dem 50 μ g/ml Kanamycin zugegeben wurde kultiviert, sedimentiert (3000 x g, 10 min, 4°C), in 20 ml kaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert, erneut sedimentiert (3000 x g, 10 min, 4°C), in 2 ml 50 mM CaCl₂ aufgenommen, unter Schwenken mit 50% Glycerin und 7% DMSO versetzt, sofort aliquotiert und in Trockeneis / Ethanol eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

FSB-Puffer ("Frozen Storage Buffer")

Kaliumacetat	10 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	10 mM
KCl	100 mM
Hexamincobalt(III)chlorid	3 mM
Glycerin	10% (v/v)
pH-Wert 6,4 mit 0,1 M HCl	

2.8.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* wurden mittels Hitzeschock transformiert (Cohen et al., 1972). Hierzu wurden 5 μ l Ligationsansatz (siehe 2.30.7) zu 200 μ l der eingefrorenen kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden einem Hitzeschock ausgesetzt (90 s, 42°C), kurz auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB Medium (RT) versetzt. Die Zellen wurden geschüttelt (60 min, 37°C), auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Wenn das Klonierungssystem eine Blau-Weiß-Selektion ermöglichte, wurden X-Gal (45 μ l, 2% (w/v)) und IPTG (45 μ l, 0,1M) vor dem Ausplattieren zum Reaktionsansatz gegeben.

2.9 Transfektion von *Entamoeba sp.*

Die Transfektion von *Entamoeba sp.* durch Elektroporation beruht auf der kurzfristigen Permeabilisierung der Zellmembran und der damit verbundenen erleichterten Aufnahme von DNA (Nickel et al., 1994).

2.9.1 Präparation der Amöben für die Elektroporation

Amöben der späten Logphase wurden unter sterilen Bedingungen für die Elektroporation vorbereitet. Das Protokoll bezieht sich auf die Verwendung von 1×10^7 Zellen.

1. Ablösen der Zellen durch Inkubation auf Eis
2. Waschen der Zellen mit 50 ml sterilem NaPBS, (400 x g, 3 min, 4°C)
3. Waschen der Zellen mit 10 ml sterilem NaPBS (400 x g, 3 min, 4°C)
4. Waschen der Zellen mit 5 ml inkompletten "Cyto-Mix" (400 x g, 3 min, 4°C)
5. Zellsediment in 3,6 ml komplettem "Cyto-Mix" resuspendieren

2.9.2 Transfektion der Amöben

Für die Elektroporation wurden je 800 µl der Amöbensuspension und 100 µl Plasmid-DNA (1µg/µl) (s. 2.4.2) in eine Elektroporationsküvette (Durchmesser: 0,4 cm, Eurogentec) gegeben, kurz geschwenkt und bei 1200 V und 25 µF zweimal hintereinander elektroporiert (Gene Pulser™; BIO-RAD, München). Die resultierende Zeitkonstante betrug 0,3 – 0,4 ms. Die Zellen wurden in 50 ml Zellkulturschalen mit warmen TY-I-S33 Medium (s. 2.3.1) überführt.

2.9.3 Selektion rekombinanter Amöben

Nach der Transfektion wurden die Amöben 48 h ohne Selektionsdruck kultiviert. Anschließend wurde mit 10 µg/ml G418, nach 2 – 3 Wochen mit 50 µg/ml G418 selektioniert.

"Cyto-Mix" (inkomplett)

KCl	120 mM
CaCl ₂	0,15 mM
Kaliumphosphatpuffer,pH 7,6	10 mM
HEPES, pH 7,6	25 mM
EGTA, pH 7,6	2 mM
MgCl ₂	5 mM

Direkt vor Gebrauch wurden 2,5 mg/ml ATP und 3 mg/ml reduziertes Glutathion zugesetzt.

HEPES-Puffer (10x)

NaCl	1,45 M
KCl	50 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
Glukose	100 mM
HEPES	100 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Vor Gebrauch wurde der Puffer auf 1 x HEPES-Puffer verdünnt, 4 mM CaCl₂ zugesetzt und der pH-Wert kontrolliert.

2.10 Northern-Blot

Im Northern-Blot wird RNA nach der elektrophoretischen Trennung im Agarosegel auf eine Membran transferiert.

Da RNA zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigt, wurde die durch Hitze (5 min, 60°C) denaturierte RNA in einem formaldehydhaltigen Agarosegel in 1 x MOPS-Puffer getrennt, wodurch die Ausbildung von Sekundärstrukturen weitestgehend verhindert wird. Hierzu wurde zunächst ein 0,8%iges Agarosegel in 1 x MOPS angesetzt, in der Mikrowelle aufgekocht (SEAKEM® GTG Agarose) und nach dem Abkühlen auf ca. 45°C Formaldehyd (6,7% (v/v)) zugegeben. MOPS-Puffer wurde als Laufpuffer verwendet.

Zu 28 µl RNA-Probenpuffer wurden 10 – 20 µg RNA in einem Volumen von maximal 28 µl gegeben und erwärmt (5 min, 60°C). Anschließend wurde 4 µl "RNA-Dye" und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) hinzugegeben. Die Proben sind in das Gel eingelaufen (30 min, 70 V) und wurden anschließend über Nacht bei 1 Volt/cm getrennt. Die Agarosegele wurden im UV-Licht dokumentiert. Für den Blotaufbau wurden zunächst mehrere Lagen Zellstoffpapier, anschließend zwei Lagen 3MM Whatmannfilterpapier, eine mit 20 x SSC befeuchtete Nylonmembran (Biodyne, GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe) das Agarosegel und schließlich zwei Lagen mit 20 x SSC befeuchtete 3MM Whatmannfilterpapier aufeinander gelegt. Auf den Stapel wurden mit 20 x getränkte Schwämme gelegt und 3 – 18 Stunden bei RT "geblottet".

Mittels Bestrahlung mit UV-Licht wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden (1200 kJ, UV Stratalinker™ 1800, Stratagene, La Jolla, USA) und im UV-Licht dokumentiert. Die Membran wurde trocken bei RT gelagert oder direkt für die Hybridisierung eingesetzt.

RNA-Probenpuffer

MOPS-Puffer (1x)	72 µl
Formaldehyd (37 % [v/v])	128 µl
Formamid	360 µl

"RNA-Dye"

Glycerin	50% (v/v)
EDTA, pH 8,0	1 mM
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylene Cyanol FF	0,25% (w/v)

2.11 Hybridisierung von Nukleinsäuren mit radioaktiv markierter DNA

Die Nylonmembran wurde in Hybridisierungsröhren gegeben und im "Church-Mix" in einem Hybridisierungssofen (Duo-Therm-Hybridisierungssofen; Biometra, Göttingen) inkubiert (mindestens 30 min, 55°C).

Die radioaktiv markierte DNA-Sonde (s. 2.6.2) wurde denaturiert (3 min, 95°C) und zur Nylonmembran in die Hybridisierungsröhre gegeben (über Nacht, 55°C). Die Membran wurde mit Church-Wash gewaschen (30 min, 55°C), in Polyethylenfolie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm (X-OMAT™; Eastman Kodak, Rochester, USA) in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie in Abhängigkeit von der Signalstärke eine Stunde bis mehrere Tage bei -70°C inkubiert.

Feucht gelagerte Northern-Blots konnten mehrfach hybridisiert werden. Hierzu wurde zunächst die erste Sonde mithilfe von 0,1 x SSC / 0,1% SDS bei ca. 90°C entfernt. Die Lösung wurde wenn nötig mehrfach gewechselt und die Entfernung der radioaktiven Strahlung mit einem Geigerzähler überprüft. Wenn mit dem Geigerzähler keine Strahlung mehr messbar war, wurde ein Film mindestens über Nacht bei -70°C inkubiert.

"Church-Mix"

Na ₂ HPO ₄	0,5 M
SDS	7% (w/v)
EDTA	1 mM
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,2 eingestellt.	

"Church-Wash"

Na ₂ HPO ₄	40 mM
SDS	1% (w/v)
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,2 eingestellt.	

2.12 Rekombinante Expression der EhCP5 in Escherichia coli

Die Cysteinpeptidase EhCP5 aus *E. histolytica* wurden im Expressionsvektor pJC45 (siehe Tab. 3) rekombinant exprimiert. Die rekombinante Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pAPlacI^Q Zellen (s. Tab. 2 und 2.8.1). Der Vektor wurde freundlicherweise von PD. Dr. Iris Bruchhaus zur Verfügung gestellt. Die genaue Beschreibung des Vektors und seine Herstellung wurden von Hellberg et al. beschrieben (Hellberg et al., 2002).

Die Expressionsbedingungen sind im Abschnitt 3.1 beschrieben. Der Vektor pJC45 codiert für N-terminale Histidinreste am rekombinant exprimierten Protein. Mittels dieser Histidinreste konnte die rekombinant exprimierte EhCP5 nach dem Zellaufschluß (siehe 2.13.1) mit der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.21) gereinigt werden.

2.13 Herstellung zellfreier Extrakte

2.13.1 Zellaufschluss von *E. coli* durch Ultraschall

Zur Gewinnung von Rohextrakten löslicher und unlöslicher Proteine von *E. coli* wurden die frisch geernteten oder eingefrorenen Zellsedimente vollständig in Zellaufschlusspuffer (2 ml/g Zellen) resuspendiert und rotiert (30 min, RT). Unter Eiskühlung erfolgte der Zellaufschluss in 15 s Intervallen bei mittlerer Einstellung in einer Ultraschallapparatur (Ultraschall-Desintegrator "SONIFIER W-250"; Heineman, Schwäbisch-Gmünd) bis die Lösung eine dünnflüssige Konsistenz aufwies. Das Lysat wurde zentrifugiert (20000 x g, 1 h, 4°C) und der Überstand für die Reinigung der Proteine auf eine Nickel-Säule gegeben.

Zellaufschlusspuffer

Natriumphosphatpuffer,
pH 8,0 50 mM
NaCl 300 mM

2.13.2 Präparation zellfreier Extrakte von *Entamoeba sp.*

Trophozoiten von *E. histolytica* und *E. dispar* wurden in der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Hierzu wurden zunächst das Nährmedium nahezu vollständig dekantiert, die Zellkulturschalen auf Eis inkubiert bis sich die Zellen von Boden der Zellkulturschale ablösten (5 – 10 min), anschließend die Zellen dekantiert und sedimentiert (400 x g, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit NaPBS gewaschen (400 x g, 5 min, 4°C) und durch viermaliges einfrieren / auftauen in Trockeneis / Ethanol lysiert und die Zellbruchstücke sedimentiert (15000 x g, 15 min, 4 °C). Wenn notwendig wurde vor der Lyse E-64 (10 – 50 µM) hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.14 Gewinnung von Antikörpern

2.14.1 Immunisierung von Hühnern und Mäusen

Den Tieren wurde 100 µg rekombinant exprimierte EhCP5 in 150 µl NaPBS mit 150 µl Freund's Adjuvans (komplett) subcutan injiziert. Im Abstand von zwei Wochen erfolgten weitere Injektionen, mit je 100 µg rekombinant exprimierter EhCP5 / 150 µl NaPBS in inkomplettem Freund's Adjuvans.

2.14.2 Gewinnung von Antikörpern aus Hühnereiern

Das Eigelb wurde vom Eiweiß getrennt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Eigelb in 90 ml destilliertes Wasser gegeben und mit 1 M Salzsäure ein pH-Wert zwischen 5,2 und 5,5 eingestellt. Unter langsamen Rotieren wurde inkubiert (6 h, 4°C) und anschließend zentrifugiert (10000 x g, 25 min, 4°C).

Der Überstande wurde bei RT durch Zugabe von 20 g Na₂SO₄ pro 100 ml gefällt und für weitere 20 min rotiert. Die gefällten Proteine wurden sedimentiert (1800 x g, 30 min, RT) und in einem Volumen von 5 ml NaPBS / Ei aufgenommen. Die Proteine wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.14.3 Gewinnung von Antiseren aus Blut

Zur Blutabnahme wurden Mäuse mit CO₂ getötet, die Bauchdecke geöffnet und mit einer Kanüle das Blut aus dem Herzen entnommen. Das Blut wurde zum koagulieren stehen gelassen (30 min, RT), zentrifugiert (10 min, 2000 x g, RT), das Serum aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.15 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bicinchoninsäure (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Proteine reduzieren Cu^{II+}-Ionen in alkalischer Lösung zu Cu⁺-Ionen (Biuret Reaktion), die mit Bicinchoninsäure hochspezifisch ein violettes Reaktionsprodukt mit starker Absorption bei einer Wellenlänge von 560nm bilden. Die Reagenzlösung setzt sich aus den Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 zusammen (BCA Protein Assay). 10 µl Probenvolumen wurden mit 200 µl Reagenz inkubiert (30 min, 37°C) und die Extinktion bei einer OD_{560 nm} am ELISA Reader gemessen. Die Proteinkonzentration wurde im Bereich von 0 – 2,0 mg/ml mittels einer BSA-Eichgerade (Pierce Nr. 23210) ermittelt.

2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden im diskontinuierlichen System nach Laemmli in Gelvorrichtungen mit den Abmessungen 13 x 8 cm (Phase, Lübeck) als SDS-Protein-Komplexe unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer molekularen Masse elektrophoretisch getrennt (Laemmli 1970). Je nach molekularer Masse der zu trennenden Proteine wurden 10 oder 12%ige Trenngelle verwendet, deren Zusammensetzung in Tab. 5 angegeben ist.

Tab. 5: Zusammensetzung der Gellösungen für die SDS-PAGE

Acrylamidkonzentration (%)	Trenngel		Sammelgel
	10	12	4
4 x Gelpuffer (ml)	1,88	1,88	1,25
30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (ml)	2,5	3,0	0,65
Aqua bidest (ml)	3,1	2,6	3,05
APS (25 % [w/v]) (µl)	25,0	25,0	25,0
TEMED (µl)	5,0	5,0	5,0

Probe und reduzierender SDS-Probenpuffer wurden, falls nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte bei 20 – 25 mA/Gel und ≤120 V mit SDS-Elektrophoresepuffer. Die verwendeten Größenmarker sind unter 2.1.5 aufgeführt.

Trenngelpuffer (4x)

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Sammelgelpuffer (4x)

Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)

SDS-Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6,8	125 mM
Glycerin	20% (v/v)
SDS	2% (w/v)
DTT	20 mM
Bromphenolblau	0,001% (w/v)

SDS-Elektrophoresepuffer (10x)

Tris	0,25 M
Glycin	0,5 M
SDS	1% (w/v)

2.17 Zweidimensionale Gelelektrophorese

In der Zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteingemische in der ersten Dimension in einem immobilisierten pH-Gradienten anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI), in der zweiten Dimension anhand der molekularen Größe getrennt.

Zur weiteren Charakterisierung differentieller Spots kann nach der Trennung eine MALDI-TOF-Analyse durchgeführt werden, um eine Aussage über differentiell exprimierte Proteine zu treffen.

2.17.1 Vorbereitung der Zellextrakte für die Isoelektrische Fokussierung

Zunächst wurden Zellen wie obig beschrieben geerntet mit PBS gewaschen und das Zellsediment mit E-64 versetzt (siehe 2.3.2.). Das Zellsediment wurde zentrifugiert (140000 x g, 1 h, 4°C), die Proteinkonzentration gemessen (s. 2.15) und 0,5 – 1,5 mg Protein des Überstandes mit Probenpuffer vermischt. Das Gesamtvolumen betrug stets 350 µl, wobei das Probenvolumen maximal 30% betragen durfte.

Die Proben wurden rotiert (30 min, 4°C), das Gesamtvolumen in das obere Drittel eines Keramik-Gelhalters pipettiert, ein Gelstreifen (Immobiline Dry-Strip, Amersham Biosciences) des gewünschten pH-Bereiches luftblasenfrei aufgelegt und für 15 min bei RT rehydriert. Anschließend wurde mit 500 µl "cover fluid" (Amersham Biosciences) überschichtet, der Keramik-Gelhalter mit dem Deckel verschlossen und auf die "IPGphor Isoelectric Focusing Unit" (Amersham Biosciences) verbracht.

2.17.2 Isoelektrische Fokussierung

In der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) getrennt. Proteine wandern dabei im elektrischen Feld aufgrund ihrer spezifischen Ladung im immobilisierten pH-Gradienten, bis zu dem pH-Bereich, an dem ihre Netto-Ladung neutral ist (dem isoelektrischen Punkt, pI). Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit dem folgenden Protokoll:

Programm für die Isoelektrische Fokussierung

Spannung	Zeit
Rehydration	2 h
30 V	10 h
500 V	1 h
1000 V	1 h
2000 V	1 h
4000 V	1 h
8000 V	10 h
100 V	5 h

Für die isoelektrische Fokussierung wurden zwischen 90000 bis 95000 Vhrs erreicht. Die maximale Stromstärke betrug 50 μ A je Gelstreifen. Die fokussierten Gelstreifen konnten bei -70°C eingefroren oder direkt für die zweite Dimension weiterverwendet werden.

2.17.3 Vorbereitung der Gelstreifen für die zweite Dimension

Zunächst wurden die Gelstreifen in Äquilibriumspuffer mit Dithiotreitol (DTT, 10 mg/ml) rotiert (15 min, RT) wodurch die Proteine reduziert und der Gelstreifen mit SDS gesättigt wurde. Anschließend wurden die Gelstreifen in Äquilibriumspuffer mit Iodacetamid (IAA, 25 mg/ml) rotiert (15 min, RT), wodurch die reduzierten Sulfhydrylgruppen irreversibel alkyliert wurden.

2.17.4 Tris-Tricin Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine erfolgte in der zweiten Dimension in diskontinuierlichen Tris-Tricin-Gelen (12%) der Dimension 0,175 x 18 x 18 cm (Elektrophoresekammer: P10DS, Hersteller: OWLScientific, USA), wobei auf ein Sammelgel verzichtet werden konnte. Die Glasplatten wurden mit 96% (v/v) Ethanol gereinigt. Das Trenngel wurde nach dem Giessen mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Geloberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation des Trennges wurde Isopropanol mit Aqua bidest ab gespült, die Oberfläche mit Whatmannfilterpapier getrocknet und der Gelstreifen der ersten Dimension mit der Plastikseite zur Glasplatte gewendet aufgelegt. Agarose-Bett-Lösung wurde aufgekocht, abgekühlt bis ca. 60°C und der Gelstreifen zur Fixierung übergossen. Die obere Kammer wurde mit Anodenpuffer, die untere Kammer mit Kathodenpuffer befüllt. Der Gellauf erfolgte über Nacht (10 mA/Gel), bis die Lauffront den unteren Rand des Geles erreicht hat.

Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Anodenpuffer

Tris-Pure	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1% (w/v)

Agarose-Bett-Lösung

Agarose	0,5% (w/v)
Bromphenolblau: Einige Krümel	
In SDS-Elektrophoresepuffer	

Äquilibriumspuffer

Tris-HCl, pH 8,8	50 mM
Urea	6 M
Glycerol, 87%	30%
SDS	2%

Bromphenolblau: Einige Krümel

Vor Gebrauch zusetzen:

DTT	10% (w/v)
IAA	25% (w/v)

Kathodenpuffer

Tris-Pure 0,2 M
pH-Wert 8,9 mit HCl

Rehydrationspuffer (1,25 x)

CHAPS 2% (w/v)
Urea 8 M

Bromphenolblau: einige Krümel

Vor Gebrauch zusetzen:

IPG-Puffer 0,5% (v/v)
DTT, 1M 12 µl

Trenngel 13%

2k AA/Bis AA 49:1 43,3% (v/v)
Tris-HCl, pH 8,8 25,0% (v/v)
Glycerol 87% 6,0% (v/v)
Aqua bidest 25,8% (v/v)
APS (40% [w/v]) 0,1% (v/v)
Temed 0,1% (v/v)

2.17.5 Vorbereitung differentieller Spots für die Massenspektrometrie

In Coomassiegelen detektierte differentielle Spots wurden auf einer mit Ethanol gereinigten Glasplatte auf einem Leuchttisch mit sterilem Skalpell ausgestochen und bis zum tryptischen Verdau bei -20 °C eingefroren.

2.17.6 Tryptischer Verdau differentieller Spots

Die Gelstücke wurden 3 x 5 min mit je 1 ml Aqua bidest gewaschen, das Gelstück auf einer mit Ethanol gereinigten Glasplatte überführt und in 1 x 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Gelstücke wurden mit 500 µl Aqua bidest in ein Eppendorf Gefäß überführt. Nachdem sich die Gelstückchen abgesetzt haben, wurde das Wasser abgenommen und 100 µl Acetonitril (100%)/Ammoniumcarbonat (0,025 M) hinzugefügt. Nach Absetzen der Gelstücke wurde die Lösung abgenommen, 100 µl Acetonitril (100%) zu den Gelstückchen gegeben und 2 min stehen gelassen. Die Gelstücke wurden durch das Acetonitril geschrumpft.

Die geschrumpften Gelstücke wurden zum rehydratisieren in 10 µl der Trypsin-Verdünnung gegeben und kurz quellen gelassen. Nach der Zugabe von Ammoniumcarbonat (5 mM, 10 µl) wurden die Eppendorf-Gefäße mit Parafilm verschlossen und die Proteine bei 37°C über Nacht – jedoch nicht länger als 15 Stunden – tryptisch verdaut. Anschließend wurden die Ansätze kurz anzentrifugiert und der Verdau durch Zugabe von 0,3% TFA / 100% Acetonitril gestoppt, im Wasserbad beschallt (10 min, höchste Stufe), geschüttelt (10 min, RT) und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Nach der Zugabe von 20 µl MeCN wurde der Überstand erneut abgenommen und zum ersten Überstand gegeben. Das Gesamtvolumen wurde in der "SpeedVac" bis zu einem Restvolumen von 2 – 3 µl eingeeengt (15 - 60 min, 45°C). Die Peptide kleben an der Wand des Eppendorf-Gefäßes als Niederschlag und wurden in 8 µl 0,1% TFA / 5% MeCN aufgenommen und im Ultraschallbad beschallt (10 min, höchste Stufe, "Sonorex Super").

2.17.7 Äquilibrieren der "ZIP-TIPS"

Zur Äquilibrierung der "ZIP-TIPS" (C-18, Millipore) wurden zunächst 3 x 10 µl MeCN, danach 3 x 10 µl 0,1% TFA in ddH₂O sehr langsam aufgezogen und wieder ausgedrückt. Die äquilibrierten Säulen wurden bis zur weiteren Verwendung in 1,5 ml Eppendorfgläser, in denen 40 µl TFA vorgelegt wurde, zwischengelagert. Während der verschiedenen Äquilibrierungsschritte durften die Säulen niemals Trockenlaufen.

2.17.8 "ZIP-TIPS" mit Proben beladen

Bei der Beladung mit den Peptiden durften die Säulen wiederum niemals trockenlaufen. Zur Beladung wurde die Probe 10 x langsam aufgesogen und abgestoßen und 3 x mit 0,1% TFA gewaschen um Salze zu entfernen. Die fertig beladenen ZIP-TIPS wurden in 1,5 ml Eppendorfgläser in 0,1% TFA gelagert.

2.17.9 MALDI-TOF

Die MALDI-TOF Analyse wurde freundlicherweise von Meike Bente am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Abteilung für Peptidchemie, Dr. E. Krause, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin Buch, durchgeführt.

2.17.10 Peptidfragmente von der Säule eluieren

2,5 µl der Matrix wurden in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die wässrige Lösung wurde aus den mit der Probe beladenen "ZipTips" herausgedrückt und 2,5 µl Matrix 5 x vorsichtig aufgesogen und wieder herausgedrückt. Die Proben wurden mit dem letzten Ausdrücken auf das goldbeschichtete "MALDI-Grid" überführt. Beim Trocknen der Proben kristallisierte die Matrix mit den eingebundenen Peptiden aus. Jedes "MALDI-Grid" bot Platz für 100 Proben, je Grid wurden zweimal eine Kalibrierungslösung (1 µl Standard und 1 µl Matrix) aus einer definierten Peptidmischung, aufgetragen. Die Proben sind im trockenen Zustand eine Woche haltbar. Gemessen wurde mit der "Voyager-DETM STR Biospectrometry Workstation" (Software Ver 5.01).

Die folgenden Parameter wurden eingestellt:

"Laser Energy"	2,9 µJ	Elutionslösung / Matrix	
"Shots/Spectrum"	150	ACHC	5 mg/ml
"Mass Range"	600 – 400 Da	Acetonitril	60% (v/v)
"Low Mass Gate"	350	0,3% TFA	40% (v/v)

2.17.11 Auswertung der MALDI-TOF-Spektren

Die Auswertung der MALDI-TOF-Spektren erfolgte mit dem Programm DataExplorer V. 3.5.00.

2.17.12 Datenbanksuche

Die Datenbanksuche erfolgte im Internet mit den Suchprogrammen Mascot (<http://www.matrixscience.com>) und MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>). Grundlage der Suche waren die Datenbank "NCBIInr." des jeweils aktuellen Datums. Weiterhin wurde die Software "ProteinProspector", in der "MS-Fit" enthalten ist genutzt.

Die Suche erfolgte unter folgenden Parametern (angegeben für MS-Fit):

Database	NCBIInr.	Peptide masses are	monoisotopic
MW of Protein	1000 – 80000	Mass Tolerance	0,05
Protein pI	3 – 10	Digest	Trypsin
Max reported hits	variable	Max.# ... cleavages	1
Sample ID	Probenbezeichnung	Cys modified by	unmodified
Min.#... Match	mindestens 6	Possible Modifications	Oxidation of M &
Instrument	MALDI-TOF		Acrylamide Modified Cys

Nicht erwähnte Punkte wurden, wie in der Software vorab eingestellt, übernommen.

2.18 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

In SDS-Polyacrylamidgelen getrennte Proteine wurden mittels Western-Blot im "Semi-Dry-Verfahren" auf Nitrozellulosemembranen transferiert und immobilisiert (Blotkammer OWL; Hybaid, Ashford, GB). Sämtliche für das Blotting benötigte 3MM Whatman-Filterpapiere und die Membran wurden mit Transferpuffer (1 x CAPS) äquilibriert und der Blot folgendermaßen aufgebaut: Auf die Kathodenseite der Blotapparatur wurden 3 Whatmanfilterpapiere, das Gel, die Membran und erneut 3 Whatmanfilterpapiere luftblasenfrei aufeinandergelegt. Die Proteine wurden nach Auflegen der Anodenplatte transferiert (1,3 h, 1 mA/cm²).

CAPS-Puffer (10 x)

CAPS 0,1 M
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 11.0
eingestellt

CAPS-Puffer (1 x)

CAPS-Puffer (10x) 10% (v/v)
Methanol 10% (v/v)

2.18.1 Immunologischer Nachweis von auf Membranen immobilisierten Proteinen

Auf Membranen transferierte Proteine (siehe 2.18) wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran dem folgenden Färbeprotokoll unterzogen, wobei sämtliche Schritte bei RT unter leichtem Schwenken durchgeführt wurden.

1. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde mindestens 30 min in 5 % Milchpulver in TBS-T (1 x TBS/ 0,05 % Tween 20) geschwenkt
2. Nitrozellulosemembran mit spezifischem ersten Antikörper (1:100—1:500 verdünnt in 5 % Milchpulver in TBS-T) inkubieren (1 h (RT) bis 12 h (4°C))
3. 3 x 10 min waschen der Membran in TBS-T
4. 60 min mit sekundärem Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat oder Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat, 1:2000 bzw. 1:3000 verdünnt in 5 % Milchpulver in TBS-T) inkubieren
5. 3 x 10 min waschen der Membran in TBS-T
6. Membran in AP-Puffer äquilibrieren
7. Der enzymatische Nachweis erfolgte im Dunkeln durch Inkubation in AP-Entwicklerlösung, bis Banden sichtbar wurden
8. Stoppen der Reaktion durch Schwenken der Membran in Aqua bidest

Die Membranen wurden getrocknet, dokumentiert, eingeschweißt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Die gegen Bereiche maximaler Divergenz der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 gerichteten Antikörper Anti-PepEhCP1, Anti-PepEhCP2 wurden jeweils 1:100, der aus Hühnereiweiß isolierte Antikörper wurde 1:500 verdünnt eingesetzt.

AP-Puffer

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM

AP-Entwicklerlösung

NBT(5 % [w/v] in 70 % DMF)	66 µl
BCIP (5 % [w/v] in DMF)	33 µl
AP-Puffer	ad 10 ml

Die Entwicklerlösung wurde stets frisch angesetzt.

2.19 Proteinfärbungen

2.19.1 Coomassie-Färbung nach Weber et al.

Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgele wurden mit der unspezifischen Färbemethode nach Weber und Osborn (1969, mod.) gefärbt (Weber et al., 1969). Die Gele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend unter mehrmaligen Wechsel der Lösung in Coomassie-Entfärbung entfarbt. Die Gele wurden mit Aqua bidest gespült, dokumentiert, in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

Coomassie-Färbelösung für Gele

Coomassie	
Brilliant Blue R-250	0,05% (w/v)
Methanol	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Coomassie-Entfärbelösung für Gele

Methanol	30% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

2.19.2 Coomassie-Färbung nach Neuhoff et al.

Für die Coomassiefärbung von 2D-Gele wurde die Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie Brilliant-Blue G-250 verwendet (Neuhoff et al., 1988). Die Sensitivität der Färbung nach Neuhoff ist höher, als die des obig angegebenen Standardprotokolls (siehe 2.19.1). Die 2D-Gele wurden über Nacht auf dem Schüttler gefärbt. Anschließend wurden die Gele mit 25%igem Methanol entfarbt und in 25%iger AMS Lösung aufbewahrt.

Coomassie-G250 Stammlösung

CBB-G250	5% (w/v)
----------	----------

Färbelösung

Stammlösung	80% (v/v)
Methanol	20% (v/v)

Stammlösung

H ₃ PO ₄ , 85%	2% (w/v)
Ammoniumsulfat	10% (w/v)
CBB-G250 St.-Lsg.	3% (v/v)

2.20 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.20.1 Proteolytische Aktivität gegenüber synthetischen Peptiden

Die proteolytische Aktivität von Zellextrakten wurde mit den synthetischen Peptiden Z-Arg-Arg-pNA (Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid), und Z-Phe-Arg-pNA in einem Gesamtvolumen von 1 ml bestimmt. Hierzu wurden $x \mu\text{l}$ (max. $100 \mu\text{l}$) einer Probe mit $990-x \mu\text{l}$ CP-Puffer, dem 1 mM DTT zugesetzt wurde, versetzt. Durch die Zugabe von $10 \mu\text{l}$ der Substratlösung wurde die Reaktion gestartet und y min bei RT inkubiert. Die Absorption der Probe, verursacht durch die Abspaltung des p-Nitroanilins, wurde bei 405 nm im Photometer gemessen. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben in dieser Arbeit auf die proteolytische Aktivität gegenüber Z-Arg-Arg-pNA.

$$\text{Berechnung: } U \text{ ml}^{-1} = \Delta E V_{\text{Meßlsg.}} t^{-1}(\text{min}) \varepsilon^{-1} V_{\text{Probe}}^{-1}$$

wobei $\varepsilon_{405\text{nm}}$ für Z-Arg-Arg-pNA = $8,8 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ und $1 U = 1 \mu\text{mol Substratumsatz min}^{-1}$.

CP-Puffer

KH_2PO_4 100 mM

EDTA 2 mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,0 eingestellt.

Substratlösung

Synthetisches Peptid 10 mM

in 90 % DMSO

Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

2.20.2 Substrat-SDS-PAGE zum Nachweis von Peptidasen

Um die enzymatische Aktivität von Peptidasen im Zellextrakt von *E. histolytica* nachzuweisen wurde 0,1% Gelatine vom Schwein (Haut) in SDS-Polyacrylamidgelen (s. 2.16) copolymerisiert. Die Zellextrakte wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer zusammengegeben und 10 min bei 37°C erwärmt. Die Proteingemische wurden elektrophoretisch getrennt (4°C , $\leq 120 \text{ V}$ und $\leq 20 \text{ mA/Gel}$), in 2,5% Triton X-100 geschwenkt (1h, RT), in Aktivierungspuffer inkubiert (3h, 37°C) und mit Coomassie gefärbt (s. 2.19.1)

Aktivierungspuffer

Natriumacetat, pH 5,2 100 mM

Triton X-100 1% (v/v)

DTT 20 mM

2.21 Proteinreinigung durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie beruht auf der Fähigkeit bestimmter Aminosäuren, insbesondere Histidin, als Elektronendonator an Proteinoberflächen zu fungieren und dadurch an Metallionen, vor allem Nickel und Kupfer, zu binden (Hochuli et al., 1988). Die Metallionen wiederum sind über Nitrilotriessigsäure an Agarose als Trägermaterial gebunden. Die an die Säule gebundenen Proteine können bei der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie durch einen pH-Gradienten oder Imidazol eluiert werden. Die Chromatographie kann grundsätzlich unter nativen oder unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Sedimentierte Bakterien einer Expressionskultur (siehe 2.12) wurden in Zellaufschlusspuffer pH 8,0 resuspendiert (ca. 5 mg/ml Sediment) und auf Eis beschallt (3 x 20 s, Stufe 3 – 4, Sonifier 250, Branson USA) und zentrifugiert (15000 x g, 15 min, 18°C). Der Überstand wurde mit niedriger Flussrate auf eine Ni^{2+} -NTA-Superflow-Säule (Quiagen) aufgetragen. Die Matrix wurde nacheinander mit Puffer A (10 x Säulenvolumen), Puffer B, Puffer C, Puffer C mit 20 mM Imidazol und Puffer C mit 100 mM Imidazol gewaschen. Die Waschschrte mit Puffer B und den verschiedenen Puffern C wurden bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ von $< 0,01$ durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mit Puffer C mit 500 mM Imidazol von der Säule eluiert, fraktioniert und mit der SDS-PAGE (s. 2.16) analysiert. Nach der Elution wurde das Säulenmaterial mit Aqua bidest gespült und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Notwendigkeit das Säulenmaterial zu regenerieren war an einem Farbumschlag von grün-bläulich nach bräunlich-grau zu erkennen. Das Nickel wurde durch 5 Vol. 100 mM EDTA, pH 8,0 eluiert, die Säule mit Aqua bidest gewaschen und mit 2 Vol. 100 mM NiCl_2 oder NiSO_4 regeneriert.

Puffer A

Guanidinhydrochlorid	6 M
NaH_2PO_4	100 mM
Tris	10 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Puffer B

Harnstoff	8 M
NaH_2PO_4	100 mM
Tris	10 mM

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Puffer C

Harnstoff	8 M
NaH_2PO_4	100 mM
Tris	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,3 eingestellt.

2.22 Dialyse von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden zum Pufferwechsel gegen das 100-fache Puffervolumen bei 4°C in Dialyseschläuchen (Spectra/Por[®] Membrane, MWCO:6-8000 / Spectrum Laboratories, USA) dialysiert.

2.23 Erstellen einer Wachstumskurve

2×10^3 Amöben wurden zu Versuchsbeginn in die Vertiefungen einer "24-well-plate" (NUNC) gegeben und bei 37°C unter anaeroben Bedingungen (Anaerocult A, Merck) in 2 ml TY-Medium kultiviert. Die Zellzahl wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit der NEUBAUER-Zählkammer bestimmt.

2.24 Bestimmung der EC₅₀

1×10^3 Amöben wurden zu Versuchsbeginn in die Vertiefungen einer "96-well-plate" (NUNC) gegeben und bei 37°C unter anaeroben Bedingungen (Anaerocult A, Merck) in 197 µl TY-Medium und 3 µl Volumen des jeweiligen Inhibitors kultiviert. Den Kontrollansätzen wurden 3 µl Lösungsmittel des jeweiligen Inhibitors zugefügt. Die Messung erfolgte stets in Dreifachansätzen. Nach 72 Stunden wurde das Medium dekantiert und dreimal mit 37°C warmen NaPBS gespült. Um zu verhindern, dass sich die Amöben vom Untergrund ablösen, wurde auf einer 37°C warmen Heizplatte gearbeitet. Anschließend wurden 10 µl ddH₂O in die Vertiefungen gegeben und die "96-well-plate" für mindestens 3 Stunden bei -20 °C eingefroren. Für die Messung wurde 200 µl BCA-Reagenz in die Vertiefung gegeben und die Zellkulturschale wie unter 2.15 beschrieben am "ELISA-Reader" gemessen.

2.25 Bestimmung der cytopathischen Aktivität von Amöben

Das Ausmaß der Zerstörung eines CHO-Zellrasens durch Amöben bzw. deren Zellextrakte dient der Ermittlung der cytopathischen Aktivität und wurde nach einer modifizierten Methode von Bracha und Mirelman (Bracha et al., 1984) durchgeführt. 1×10^5 CHO-Zellen wurden in Zellkultur-Testplatten (24 "well-plate", NUNC) ausgesät und für 48 h kultiviert (s. 2.3.3).

Der CHO-Zellrasen wurde mit 1 ml 37°C warmen RPMI-H-Medium gewaschen, 500 µl warmes RPMI-H zugesetzt und die CHO-Zellen während der Präparation der Amöben weiter bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Trophozoiten von *E. histolytica* wurde wie unter 2.3.2 beschrieben kultiviert und geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit je 50 ml frischem inkomplettem TYI-S-33-Medium gewaschen, sedimentiert und in ca. 5 ml inkomplettem TYI-S-33-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt und eine Zellzahl von 1×10^5 Trophozoiten in 300 µl inkomplettem TY-Medium eingestellt.

Für Versuche mit Trophozoiten wurde nach dem folgenden Protokoll verfahren:

1. 300 µl der eingestellten Zellsuspension zu den CHO-Zellrasen in 500 µl RPMI-H geben.
2. Inkubation der Zellen bei 37°C, 5%CO₂-Atmosphäre. Der Verlauf der Reaktion wurde mikroskopisch verfolgt.
3. Ablösen der Amöben durch 20 minütige Inkubation auf Eis
4. Vorsichtiges waschen der CHO-Zellrasen mit kaltem RPMI-H
5. Fixieren der verbliebenen CHO-Zellen mit 1 ml 4% (v/v) Formaldehyd in NaPBS (Lösung stets frisch ansetzen (10 min))
6. Waschen mit 1 ml NaPBS
7. Färben der CHO-Zellen mit 0,5 ml 0,1% (w/v) Methylblau in Gebrauchslösung.
8. Spülen mit 1:10 verdünnter Gebrauchslösung
9. Lysieren der Zellen mit 1 ml 0,1 M HCl für 30 min bei 37 °C
10. Messung des freigesetzten Methylblaus durch Absorption bei 660 nm

Für Versuche mit Zellextrakten wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA-Test (s. 2.15) bestimmt und definierte Proteinkonzentrationen in konstanten Volumina NaPBS zu den CHO-Zellrasen in 500 µl RPMI-H gegeben. Die Inkubation erfolgte – wie obig beschrieben – bei 37°C, 5%CO₂-Atmosphäre und der Verlauf der Reaktion wurde mikroskopisch verfolgt. Bis auf Punkt 3 wurden nach dem obigem Protokoll weiter verfahren.

Die Methylblaufärbung ist proportional zum Anteil der adhärennten CHO-Zellen. CHO-Zellen, die ohne Trophozoiten bzw. Zellextrakte inkubiert wurden, dienten der Kontrolle.

Stammlösung

Borsäure	0,2 M
NaOH	0,1 M

Gebrauchslösung, pH 8,8

Stammlösung	73,6 % (v/v)
HCl (0,1 M)	26,4 % (v/v)

2.26 Bestimmung der Erythrophagozytose von *E. histolytica*

Die Phagozytoseaktivität von *E. histolytica* wurde quantitativ mit Erythrozyten bestimmt (Trissl et al., 1978; Mora-Galindo et al., 1997). Erythrozyten wurden dreimal (3000 x g, 5 min, RT), Trophozoiten nur zweimal (400 x g, 5 min, 4°C) mit inkompletten TYI-S-33-Medium gewaschen. Die Zellen wurden resuspendiert und gezählt. Amöben und Erythrozyten wurden im Verhältnis 1:100 zusammengegeben und für 10, 20 und 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch die Zugabe von Aqua bidest lysierten die nicht phagozytierten Erythrozyten. Die Amöben wurden zweimal mit NaPBS gewaschen und in 1 ml 90% (v/v) Ameisensäure resuspendiert, wodurch das intrazelluläre Hämoglobin freigesetzt wurde. Die Absorption der Proben wurde gegen einen entsprechenden Reagenzienleerwert bei 397 nm ermittelt. Als Kontrollen dienten Amöben, die ohne Erythrozyten inkubiert wurden.

2.27 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von *E. histolytica*

Die hämolytische Aktivität wurde wie von Ankri beschrieben durchgeführt (Ankri et al., 1998). Sowohl Erythrozyten als auch Trophozoiten wurden wie unter 2.26 aufgeführt vorbehandelt, allerdings wurde NaPBS anstelle von TYI-S-33-Medium verwendet. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2000 zusammengegeben und im Wasserbad inkubiert (1 h, 37°C), sedimentiert (5 min, 400 x g, RT) und die OD_{570nm} des Überstandes am Photometer gemessen. Ansätze, die nur Erythrozyten bzw. Trophozoiten enthielten, dienten der Kontrolle.

2.28 Bildung von Leberabszessen in Wüstenrennmäusen

Die Fähigkeit von Trophozoiten, Leberabszesse zu verursachen, wurde anhand eines Tiermodells ermittelt. Die Injektion der Amöben in die Leber von weiblichen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) erfolgte wie von Lotter et al. (1997) beschrieben und wurde freundlicherweise von Dr. Hannelore Lotter (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) durchgeführt. In der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntete Trophozoiten wurden zweimal mit TYI-S-33-Medium gewaschen, im genannten Medium resuspendiert und gezählt. 10³—10⁶ Zellen wurden in einem Volumen von 100 µl in den rechten Leberlappen der Tiere injiziert. Restliche Zellen wurden zweimal mit NaPBS gewaschen und für spätere Untersuchungen bei -70 °C gelagert. Nach 3—7 Tagen wurden die Tiere getötet und die Anzahl und das Gewicht der Abszesse bestimmt.

2.29 Transmissionselektronenmikroskopie

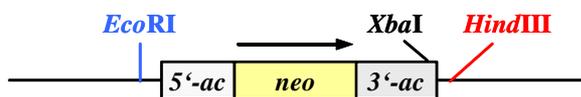
Trophozoiten von *E. histolytica* wurden im Hochdruckverfahren cryofixiert und cryosolubilisiert (Hohenberg et al., 1994). Die Cryofixierung und Cryosolubilisierung wurden freundlicherweise von Stephan Pfeiffer an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Bereich Mikroskopie, durchgeführt. 1-Hexadekan wurde den gefrorenen Kapillarröhrchen unter flüssigem Stickstoff entzogen. Die Proben wurde anschließend in vorgekühlte Röhrchen mit Aceton und 0,5% Uranylsäure überführt. Die Dehydrierung wurde in einer konventionellen Gefriereinheit (-90°C, 8h) gefolgt von zwei Substitutionsschritten (-70°C, 8 h und -50°C, 8h) (AFS, Leica Bensheim, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden in Aceton (30 min, -50°C), 70% Aceton / 30% Epon (v/v) (2 h, 4°C) und 30% Aceton / 70% Epon (v/v) (2 h, 4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Proben in reinem Epon inkubiert (2 h, 4°C). Die Polymerisation erfolgte bei 60°C für 24h. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und im Elektronenmikroskop untersucht (Zeiss EM 910 TEM). Die Einbettung und Anfertigung der Schnitte wurde freundlicherweise von Christel Schmetz, Abteilung für Parasitologie des BNI, Bereich Elektronenmikroskopie, durchgeführt.

2.30 Klonierung der Cysteinpeptidase EhCP5

Im Folgenden ist die Herstellung des Vektors "pNeoEhCP5-TOPO" dargestellt. Der Vektor wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Tannich hergestellt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Aus diesem Grunde erhält die Herstellung des Vektors einen separaten Abschnitt in dieser Arbeit.

Ergänzend zur *ehcp5*-codierenden Sequenz wurden 1,5 kBp der 3'-flankierenden Sequenz und 2,5 kBp der 5'-flankierenden Sequenz, aus genomischer DNA von *E. histolytica* HM-1:IMSS "30459" mittels PCR amplifiziert, da 5'- und 3'-flankierende Sequenzen für die Expression von Amöbengenen eine wichtige Rolle spielen (Nickel et al., 1994; Purdy et al., 1994; Buss et al., 1995; Purdy et al., 1996). Die hierfür verwendeten Oligonukleotide 864 und 885 (siehe 2.30.1) enthielten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Hind*III. Die verwendeten Vektoren sind in der Abb. 4 dargestellt.

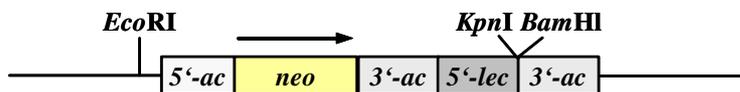
pNeoBox (ca. 5kb):



pNeo-EhCP5-TOPO (ca. 10,7 kb):



pNeoCass (ca. 6 kb):



pNeoEhCP2 (ca. 7kb):

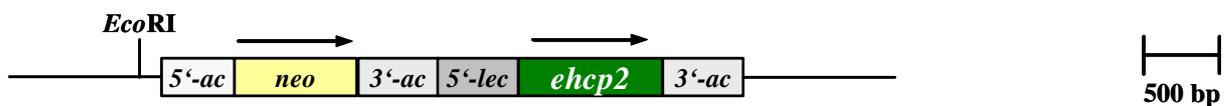


Abb. 4: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren für *E. histolytica* und *E. dispar*.

Die obig schematisch dargestellten Expressionsvektoren leiten sich von dem Vektor PBS(+) (siehe Tab. 3) ab. Die dargestellten Gene codieren für die Neomycin-Phosphotransferase (*neo*), 5'- und 3'-flankierende Bereiche eines Aktin- bzw. Lektins von *E. histolytica* (*5'-lec*, *3'-ac*) und für die Strukturgene der Cysteinpeptidase EhCP5 von *E. histolytica* (*ehcp5*) flankiert von *5'-ehcp5* (*5'-ehcp5*) und *3'-ehcp5* (*3'-ehcp5*) flankierenden Sequenzen. Die Kontrollzellen wurden mit dem Vektor "pNeoBox & *Hind*III Linker" bzw. "pNeoCass" transfiziert. Der Vektor pNeoEhCP2 diente weiteren Kontrollen und wurde freundlicherweise von PD. Dr. Iris Bruchhaus zur Verfügung gestellt.

2.30.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde auf 10 µM eingestellt (siehe 2.30.2).

Überexpression in *E. histolytica* HM-1:IMSS „30459“ und *E. dispar* SAW:760 PCR

864: *gehcp5* Xba1/AS 28 GGT CTA GAT TAA CTC TCA TTG AAA TAG G

885: *gehcp5* HindIII / S26 GAA GCT TTA GTC AGT CAT AGT CTT AG

Sequenzierprimer:

101: CP5 – AS 23/2 GTT GAT GAA CAT TCT TTA CTA TT

102: CP5 – S 23 / 2 TTG TTG GTT GCT GGA TCA AAG AA

900: CP5 – PST S23 GGC TGC TGC AGA AGG ACC AGT TG

901:CP5 – PST AS23 GGC TGC AGC AGC ACG CAT AAG TG

Linker

909: 5'-AATTAAGCTT-3'

2.30.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der von Saiki et al. 1985 erstmalig angewandten PCR-Methode werden DNA-Fragmente spezifisch *in vitro* amplifiziert (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988).

Für die *in vitro* Amplifikation der *ehcp5* wurde die "Taq Expand Long Polymerase" (Roche, Mannheim) verwendet. Diese Polymerase besitzt eine Fehlerkorrekturfunktion und eignet sich besonders für die *in vitro* Amplifikation langer Fragmente. Weiterhin ermöglicht sie eine TA-Klonierung (siehe 2.30.7). Im 100 µl-Reaktionsansatz wurden 10 ng Template-DNA, 1 x "Expand Long PCR-Puffer 2" (Roche, Mannheim), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, je 1 µM Oligonukleotid, je 200 µM dNTPs und 3,5 U "Taq Expand Long Polymerase" zusammengegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit 100 µl Mineralöl überschichtet.

Nach der Denaturierung der DNA (2 min, 94°C) in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480; Perkin Elmer, Norwalk, USA) folgte die Amplifikation der DNA über 35 der folgenden Zyklen:

1. Denaturierung der DNA: 10 sec, 94°C
2. Hybridisierung der Oligonukleotide: 30 sec, 42°C
3. Synthese des Komplementärstranges: 6 min, 62°C

Abschließend wurde für 10 min bei 62°C inkubiert, um einzelne Adeninnukleotide, die für das "TOPO TA cloning" benötigt werden, anzufügen.

Die Hybridisierungstemperatur x entspricht der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide und wird nach der Formel: $T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/L$ berechnet.

(% GC-Gehalt = prozentualer GC-Gehalt, L = Länge der Oligonukleotide) (Chester et al., 1993).

2.30.3 Klonierung der PCR-Produkte

Die Größe der Amplifikate wurde im Agarosegel (0,7%) überprüft. Anschließend wurden die 5 kBp großen Amplifikate in den "TOPO"-Vektor ligiert ("TOPO TA cloning kit", Invitrogen, Karlsruhe) (siehe 2.30.7) und die erhaltenen Vektoren in "One Shot Top 10™ Zellen" (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Die Zellen wurden über Nacht auf Selektionsagarplatten kultiviert und die Größe der Inserts einzelner Klone nach Isolierung der Plasmid DNA (siehe 2.4.1) mittels *EcoRI* Verdau und anschließender Agarosegelelektrophorese (0,7%) kontrolliert. Klone mit Inserts richtiger Größe (1,3 kBp und 3,7 kBp [*ehcp5*]; 3,9 kBp ["TOPO" Vektor]) wurden unter Verwendung der Oligonukleotide 101, 102, 900 und 901 sequenziert (siehe 2.30.4). Ein Klon mit *ehcp5* im offenen Leserahmen wurde für die spätere Verwendung eingefroren.

2.30.4 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte mittels einer Variante der klassischen Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1980). Der Kettenabbruch basierte auf dem Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide. Die Reaktionen wurde mit dem "ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer, Foster City, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden die spezifischen Oligonukleotide 101, 102, 900 und 901 verwendet. Die Sequenzierungsreaktion verlief über 25 Zyklen, die jeweils aus folgenden Schritten bestanden: 10 s 96°C, 5 s 50°C, 4 min 60°C.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl Aqua bidest versetzt und einer Ethanolfällung mit 3 M Natriumacetat, pH 4,6 unterzogen (s. 2.5.1). Die DNA wurde in einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe eines ABI PRISM™ 377-DNA-Sequencers (Perkin Elmer, Foster City, USA) durch Susan Ofori (Servicestation des BNI) ausgewertet.

2.30.5 Vorbereitung des Vektors pNeoBox

Da das zu klonierende DNA Fragment mit ca. 5 kBp sehr groß ist, sollte nur die ca. 1,8 kBp Sequenz 5'-*aktin-neo*-3'-*aktin* des Vektors pNeoBox verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde der Vektor mit *EcoRI* linearisiert und nach einer Kontrolle im Agarosegel (0,7%) mit dem "HighPure Purification Kit" (Roche, Mannheim) gereinigt.

Mittels "Linker-DNA" wurde eine *HindIII* Schnittstelle vor die 5'-*aktin* Sequenz ligiert (siehe 2.30.7). Hierzu wurde das "Oligonukleotid 909" verwendet, das mit sich selbst hybridisieren kann. 20 µl "Oligonukleotid 909" (0,05 µg/µl) wurden mit 10 µl 5x Ligationspuffer für 15 min bei 70°C im Heizblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Der Heizblock wurde ausgeschaltet und bei RT langsam heruntergekühlt. Dabei entstanden eine interne *HindIII*

Schnittstelle und am 5'- und 3'-Ende Komplementärsequenzen für *Eco*RI restriktionsverdaute DNA (siehe Abb. 5).

Oligonukleotid 909: AATTAAGCTT



Abb. 5: Oligonukleotid 909.

Das Oligonukleotid 909 kann mit sich selbst hybridisieren. Dadurch werden interne *Hind*III Schnittstellen (rot dargestellt) und am Ende der doppelsträngigen DNA Komplementärsequenzen zur *Eco*RI Schnittstelle (blau dargestellt) gebildet.

Die so entstandene "Linker-DNA" wurde an die *Eco*RI linearisierte "*neobox*"- Sequenz ligiert (siehe 2.30.6) und chemisch kompetente DH5 α Zellen mit diesem Konstrukt transformiert (siehe 2.8).

Die Zellen wurden über Nacht auf Selektionsagarplatten kultiviert und die Plasmid-DNA wurde isoliert (siehe 2.4.1). Nach einem Restriktionsverdau mit *Hind*III wurde das 1,8 kBp große "5'-*actin-neo*-3'-*actin* & *Hind*III-Fragment" aus einem Agarosegel (0,7%) eluiert (siehe 2.30.10) und konnte für die weitere Klonierung verwendet werden.

2.30.6 Ligation der Vektoren

Im folgenden wird die Sequenz "*ehcp5*-TOPO" als Vektor und die Sequenz "5'-*actin-neo*-3'-*actin* & *Hind*III-Fragment" als Insert bezeichnet, da die Sequenz "5'-*actin-neo*-3'-*actin* & *Hind*III-Fragment" in die Sequenz "*ehcp5*-TOPO" ligiert wurde.

Für die Präparation des Vektors wurden 34 μ l der Plasmid DNA (*ehcp5* im "TOPO" Vektor, siehe 2.30.3) mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert (siehe 2.6.1). Die Größe des Vektors wurde im Agarosegel (0,7%) überprüft (8,9 kBp). Die Enden des Vektors wurden dephosphoryliert (siehe 2.30.8), anschließend folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion und eine EtOH-Fällung (siehe 2.30.9 und 2.5.1). Der Niederschlag wurde in 25 μ l Wasser aufgenommen.

Für die Präparation des Inserts wurden 34 μ l "*neobox* & *Hind*III Linker" (siehe 2.30.5) mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert. Zur Kontrolle wurde das Insert auf ein Agarosegel (0,7%) aufgetragen.

Die DNA-Fragmente wurden über Nacht ligiert (siehe 2.30.7), in chemisch kompetente DH5 α -Zellen transformiert (siehe 2.8.2) und die Zellen über Nacht auf Selektionsagarplatten kultiviert. Die Größe der Inserts einzelner Klone wurde nach Isolierung der Plasmid DNA (siehe 2.4.1) mittels *Hind*III Verdau und anschließender Agarosegelelektrophorese (0,7%) kontrolliert.

Positive Klone, die Inserts richtiger Größe (1,8 kBp und 8,9 kBp) enthielten wurden mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut, um die Orientierung der Inserts zu überprüfen. Bei gleicher Orientierung waren die Größen 5,7 kB und 5 kB bei entgegengesetzter Orientierung waren die Größen 3,9 kBp und 6,8 kBp. Die Kontrolle im Agarosegel (0,7%) ergab, dass sechs Klone

mit gleicher Orientierung der Sequenzen (3'-*actin-neo-5'-actin-ehcp5*) und acht Klone mit entgegengesetzter Orientierung (5'-*actin-neo-3'-actin-ehcp5*) vorlagen. Klone mit Konstrukten gleicher- und entgegengesetzter Orientierung wurden als Stammkulturen eingefroren.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels Plasmid-Mega-Präparation aus 500 ml Kulturen (siehe 2.4.2).

2.30.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor-DNA wurde mit den zu klonierenden DNA-Fragmenten im 10 µl-Ansatz im molaren Verhältnis von 1:3 ligiert. 100 ng Vektor-DNA wurden mit der entsprechenden Menge DNA-Fragment, 1 x Ligationspuffer (Promega, Madison, USA), 1 µl ATP (10 mM, pH 7,0) und 3 U T4-DNA-Ligase (Promega, Madison, USA) über Nacht bei 14 °C ligiert (Bolivar et al., 1992). Der Ligationsansatz wurde bis zur Transformation, mindestens jedoch für eine Stunde bei -20°C gelagert.

Ligationsansatz

pNeoEhCP5-TOPO (1:3 verdünnt)	1 µl
AcNeoAc	4 µl
ATP (10 mM)	1 µl
Ligationspuffer	1 µl
Ligase	1 µl
Aqua bidest	2 µl

PCR-Produkte mit Adenosinüberhängen konnten direkt in den Vektor pCR[®]2.1 - nach Angaben des Herstellers - ligiert werden (TA Cloning[®] Kit; Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.30.8 Dephosphorylierung von Vektor DNA

Vektor DNA, die mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurde, kann religieren. Um dies zu verhindern, wurden die Phosphatreste am 5'-Ende von Klonierungsvektoren mittels alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm ("calf intestine alkaline phosphatase", "CIP") entfernt.

Hierzu wurde der restriktionsverdauten Vektor-DNA 10 µl CIP-Puffer und 2 µl CIP (NEB, Frankfurt a.M.) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss wurde die alkalische Phosphatase mittels Phenol-Chloroform Extraktion aus dem Ansatz entfernt (siehe 2.30.9) und die DNA gefällt (siehe 2.5.1).

2.30.9 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese mit einem Volumen Chloroform versetzt und intensiv gemischt. Chloroform ist eine Lösung aus einem Volumen Tris-gesättigtem Phenol und einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Um die Phasen zu trennen, wurde 5 min mit 15.000 x g zentrifugiert und anschließend die obere (wässrige) Phase mit einem Ausgangsvolumen an Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und 5 min mit 15.000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA aus dem Überstand wie unter 2.5.1 beschrieben.

2.30.10 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem "Gene Clean Kit"

DNA-Fragmente wurden mit dem "GeneClean Spin Kit" (Qiagen, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen eluiert.

2.30.11 Transfektion der Amöben

Die Amöben wurden mit den obig abgebildeten Vektoren "entgegengesetzter Orientierung" transfiziert und mit 50 µg/ml G418 selektioniert (siehe 2.9). Der Vektor "pNeoBox & HindIII Linker" wurde stets als Kontrollvektor verwendet (siehe Abb. 4).

Transfizierte *E. histolytica* wurden axenisch, transfizierte *E. dispar* wurden mit Crithidien xenisch kultiviert (siehe 2.3.2).

3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1 Rekombinante Expression der Cysteinpeptidase EhCP5 zur Gewinnung von Antisera

Zur Gewinnung spezifischer Antisera gegen die Cysteinpeptidase EhCP5 wurde ein T7-RNA-Polymerase abhängiges bakterielles Expressionssystem verwendet. Hierzu wurde das Plasmid pJC-EhCP5 (siehe Tab. 3), wie bereits von Hellberg beschrieben, eingesetzt (Hellberg et al., 2002).

Die Cysteinpeptidase EhCP5 wurde zunächst in *E. coli* rekombinant exprimiert (siehe 2.12), über Ni-NTA-Säulen (siehe 2.21) gereinigt (siehe Abb. 6) und mit den gereinigten Fraktionen anschließend Mäuse und Hühner immunisiert (siehe 2.14).

Hierbei zeigten die in Mäusen generierten Antikörper eine geringe Spezifität (nicht abgebildet). Die im Huhn generierten Antikörper waren hingegen hoch spezifisch, wiesen keine Kreuzreaktivität gegenüber rekombinant exprimierter EhCP1 auf (nicht abgebildet) und konnten in weiteren Versuchen eingesetzt werden (siehe Abb. 9 und Abb. 16). Rekombinant exprimierte EhCP1 wurde freundlicherweise von PD Dr. Iris Bruchhaus zur Verfügung gestellt.

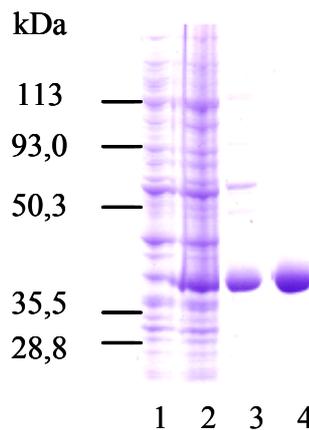


Abb. 6: Reinigung rekombinant exprimierter EhCP5 und anschließende Überprüfung auf eine möglich Kreuzreaktion im Western Blot.

1: Vor Induktion mit IPTG; 2: Mit Puffer C eluierte Fraktion; 3: mit Puffer C mit 20 mM Imidazol eluierte Fraktion; 4: Mit Puffer C mit 500 mM Imidazol eluierte Fraktionen. Mit den Proteinen der Fraktion 4 wurde ein Huhn immunisiert. Die im Huhn generierten Antikörper wurden im Western Blot mit rekombinant exprimierter EhCP1 getestet und wiesen keine Kreuzreaktion auf (nicht abgebildet).

3.2 Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. histolytica* und *E. dispar*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cysteinpeptidase EhCP5 durch stabile Transfektion in *E. histolytica* und *E. dispar* überexprimiert, um Informationen über ihre Bedeutung für die Pathogenität der Amöben *in vivo* und *in vitro* zu erhalten. Der für die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 verwendete Expressionsvektor beruht auf dem Vektor pA5'A3'NEO (Hamann et al., 1995), der ein Derivat von pBluescribe ist (pBS(+)) siehe Tab. 3). Der Vektor enthält einen offenen Leserahmen für die Neomycin-Phosphotransferase, flankiert von 480 Bp des 5'-untranslatierten Bereiches und 530 Bp des 3'-untranslatierten Bereiches eines Aktingers von *E. histolytica*. Im Folgenden wird dieser Vektor als pNeoBox bezeichnet (siehe Abb. 4).

Das für die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 verwendete Plasmid pNeoEhCP5-TOPO wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Tannich hergestellt. Die Herstellung dieses Vektors ist im Abschnitt Material und Methoden erläutert (siehe 2.30).

3.2.1 Northern-Blot Analysen und Enzymtests NeoEhCP5 transfizierter *E. histolytica* und *E. dispar*

Die transfizierten Zellen wurden zunächst durch Northern-Blot-Analyse (siehe 2.10) und die Bestimmung der Enzymaktivitäten (siehe 2.20.1) untersucht.

Im Northern-Blot konnte die Überexpression der *ehcp5* sowohl für *E. histolytica* als auch für *E. dispar* erstmalig nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Die Überexpression der EhCP5 hatte keinen Einfluss auf das Transkriptionsniveau der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 (siehe Abb. 7). Das Signal für die Cysteinpeptidase EhCP1 in *E. dispar* lässt sich vermutlich auf eine Kreuzreaktion mit EhCP2 zurückführen, da diese beiden Cysteinpeptidasen zu 87% Sequenzhomolog sind (Bruchhaus et al., 1996). Mit dem Northern-Blot wurde gezeigt, dass der Promotor von *E. histolytica* in *E. dispar* aktiv ist, obwohl die Cysteinpeptidase EhCP5 im Laufe der Evolution in *E. dispar* verloren gegangen ist (Willhoeft et al., 1999b) (siehe Abb. 7).

Die Überexpression wurde für *E. histolytica* im Enzymtest mit Z-Arg-Arg-pNA als spezifisches Substrat nachgewiesen. Während die mit dem Kontrollplasmid pNeoBox transfizierten *E. histolytica* eine Aktivität von 39 mU/mg ($\pm 24,9$; n = 24) Protein aufwiesen, war die Aktivität der Amöben durch Transfektion mit dem Vektor pNeoEhCP5-TOPO signifikant ($p < 0,01$) auf 289 mU/mg ($\pm 104,9$; n = 24) Protein erhöht.

Insbesondere die Überexpression der *ehcp5* im nicht pathogenen Kommensalen *E. dispar* stellt ein äußerst attraktives System dar, um Informationen über die Funktion dieser wichtigen Cysteinpeptidase *in vivo* und *in vitro* zu erhalten. In *E. dispar* war im Enzymtest mit Z-Arg-Arg-pNA als Substrat allerdings keine proteolytische Aktivität nachweisbar, da die Gesamtaktivität des Isolates *E. dispar* SAW:760 in den Kontrollzellen zu niedrig war. Für pNeoEhCP5-TOPO transfizierte *E. dispar* war die Aktivität nicht erhöht.

Während der Kulturführung wurde beobachtet, dass pNeoEhCP5-TOPO transfizierte *E. histolytica* langsamer wuchsen, als die Kontrollzellen. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in dreifachen Ansätzen durchgeführt.

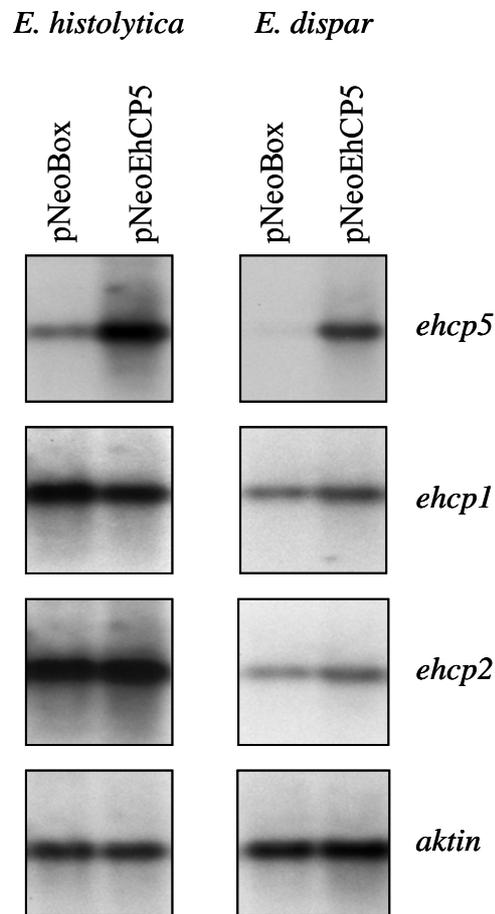


Abb. 7: Northern-Blot-Analysen pNeoEhCP5 transfizierter Trophozoiten von *E. histolytica* und *E. dispar*.

Die mit dem Expressionsvektor pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Trophozoiten des *E. histolytica*-Isolates HM-1:IMSS "30459" und des *E. dispar*-Isolates SAW:760 wurden mit 50 µg/ml G418 selektioniert und die RNA wie in 2.4.3 beschrieben isoliert. Je Spur wurden 10 µg RNA aufgetragen. Amöben, die mit dem Expressionsvektor ohne Strukturgen transfiziert wurden dienten der Kontrolle. Die Hybridisierung erfolgte mit den für EhCP1, EhCP2 und EhCP5 kodierenden Genen. Die Hybridisierung mit einem 650 Bp großen DNA-Fragment eines Aktinens von *E. histolytica* diente der Kontrolle der Probenapplikation.

3.2.2 Substrat-SDS-PAGE

Um genauere Informationen über die proteolytische Aktivität pNeoEhCP5-TOPO transfizierter *E. histolytica* zu erhalten, wurden Substrat-SDS-PAGE Untersuchungen durchgeführt. Die Substrat-SDS-PAGE erlaubt die Beurteilung, ob die erhöhte proteolytische Aktivität pNeoEhCP5-TOPO transfizierter Trophozoiten (siehe 3.2.1) nur auf die veränderte Aktivität der Cysteinpeptidase EhCP5 oder auf weitere Cysteinpeptidasen zurückzuführen ist. Die im Rahmen dieser Arbeit mit Extrakten aus pNeoBox transfizierten Trophozoiten von *E. histolytica* angefertigten Aktivitätsgele wiesen Aktivitäten in den Größenbereichen 25, 28, 35 und 51 kDa auf (siehe Abb. 8).

Von Hellberg et al. wurde bereits gezeigt, dass Zellextrakte aus pNeoEhCP2 transfizierten Trophozoiten ausschließlich im Bereich von ca. 35 kDa vermehrt Gelatine verdauen als die Kontrollextrakte (Hellberg et al., 2001). Um die Intensitäten der verschiedenen Banden besser beurteilen zu können und eine genauere Vergleichsmöglichkeit zu haben wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich Zellextrakte aus pNeoEhCP2 transfizierten Trophozoiten (siehe 2.2.2) von *E. histolytica* untersucht. In Abb. 8 ist zu erkennen, dass sich die Erhöhung der proteolytischen Aktivität pNeoEhCP2 transfizierter Trophozoiten ausschließlich auf den Größenbereich von ca. 35 kDa beschränkt.

Demgegenüber ist für Zellextrakte aus pNeoEhCP5-TOPO transfizierten *E. histolytica* in den Größenbereichen 25, 28, 35 und 51 kDa eine – im Vergleich zur Kontrolle – gleichmäßige Zunahme der Aktivität zu beobachten (siehe Abb. 8). Für die Extrakte aus *E. dispar* bestätigt das Zymogramm die Enzymtests: Die Aktivität steigt nicht an (nicht dargestellt).

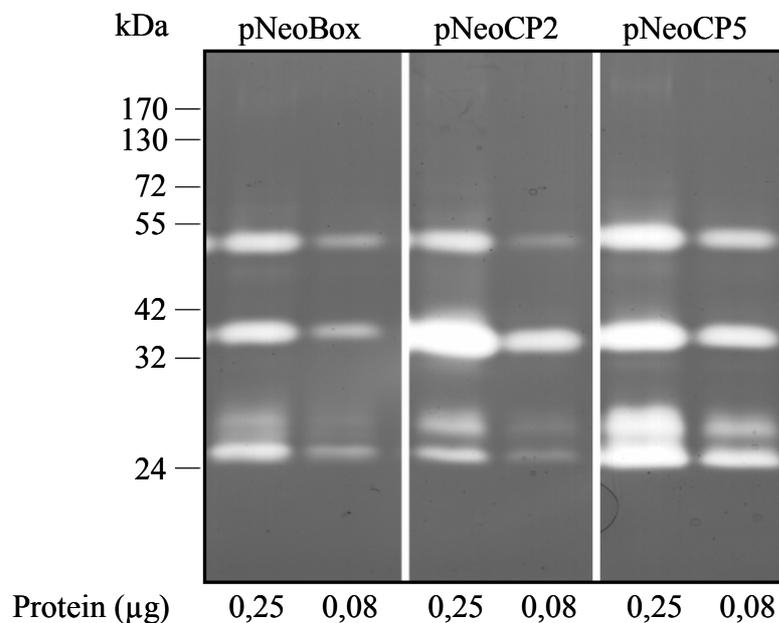


Abb. 8: Überexpression von EhCP5 in *E. dispar* und *E. histolytica*: Substrat-SDS-PAGE. Dargestellt sind Coomassie gefärbte 12%ige SDS-Polyacrylamidgele in denen 0,1% Gelatine (w/v) copolymerisiert wurde. Je Spur wurden 0,25 und 0,08 µg Protein transfizierter Trophozoiten von *E. histolytica* aufgetragen. Die Trophozoiten wurden mit den Vektoren pNeoBox, pNeoEhCP2 und pNeoEhCP5-TOPO stabil transfiziert und mit 50 µg Neomycin/ml selektioniert.

3.2.3 Western-Blot Analysen

Im Northern-Blot wurde für pNeoEhCP5-TOPO transfizierte Zellen nachgewiesen, dass die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 durch episomale Transfektion von *E. histolytica* keinen Einfluss auf die Expression der beiden Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 hat (siehe Abb. 7). Demgegenüber wurde für obige Zellen in der Substrat-SDS-Gelelektrophorese eine Zunahme mehrerer Aktivitäten beobachtet (siehe Abb. 9), deren molekulare Größen in etwa denen von EhCP1 und EhCP2 entsprechen (Hellberg et al., 2000). Da Cysteinpeptidasen nach der Translation vielfach modifiziert werden, wobei auch intermolekulare Wechselwirkungen eine Rolle spielen (Eakin et al., 1992; Taylor et al., 1992; Sanderson et al., 2000), liegt der Schluss nahe, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 an der posttranslationalen Modifikation der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 beteiligt sein könnte.

Um hierüber eine Aussage treffen zu können, wurde – wie unter 2.18 beschrieben – ein Western-Blot mit hochspezifischen Peptidantikörpern angefertigt. Die Antikörper gegen die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 waren bereits im Labor vorhanden (Anti-PepEhCP1 und Anti-PepEhCP2). Diese Antikörper sind gegen spezifische Peptidbereiche der jeweiligen Proteine gerichtet, die sich über Bereiche maximaler Divergenz der beiden Cysteinpeptidasen erstrecken und wiesen keine Kreuzreaktion auf (Hellberg et al., 2000). Das Antiserum gegen EhCP5 wurde im Huhn generiert und wie unter 2.14.2 aufgeführt aus Hühnereiweiß isoliert und zeigte in Kontrollversuchen keine Kreuzreaktion gegenüber der rekombinant exprimierten Cysteinpeptidasen EhCP1 (siehe 3.1).

Im Western-Blot wurde für Zellextrakte aus pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Trophozoiten stärkere Signale mit Antiseren gegen die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 erhalten, als für die Kontrollen (siehe Abb. 9). Somit war die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 auf Proteinebene erstmalig nachgewiesen. Weiterhin hat sich die auf der Substrat-SDS-Gelelektrophorese beruhende Vermutung, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 an der Aktivierung weiterer Cysteinpeptidasen beteiligt sein könnte, bestätigt. Im Western-Blot mit Extrakten transfizierter *E. dispar* wurde kein Signal erhalten (nicht abgebildet).

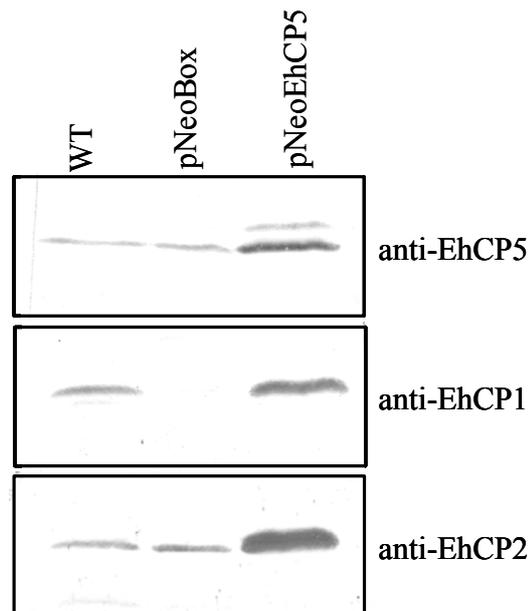


Abb. 9: Western-Blot Analyse pNeoEhCP5-TOPO transfizierter *E. histolytica*.

Die mit dem Expressionsvektor pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Trophozoiten des *E. histolytica*-Isolates HM-1:IMSS wurden mit 50 µg/ml G418 selektioniert und die Extrakte wie in 2.13.2 beschrieben hergestellt. 20 µg des jeweiligen Trophozoitenextraktes wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und wie unter 2.18 und 2.18.1 beschrieben fortgeführt. Nicht transfizierte Amöben und Amöben, die mit dem Expressionsvektor ohne Strukturen transfiziert wurden, dienten der Kontrolle.

3.2.4 Untersuchungen zur Pathogenität pNeoEhCP5-TOPO transfizierter Trophozoiten

Von besonderem Interesse war, ob mit der Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 eine Veränderung der pathogenen Eigenschaften einhergeht. Hierzu wurden die Trophozoiten verschiedenen Untersuchungen unterzogen.

Als *in vitro* Maß für die Pathogenität von Trophozoiten dient die Fähigkeit CHO-Zellrasen zu zerstören. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch die Erythrophagozytose und die hämolytische Aktivität Pathogenitätskriterien darstellen.

Um den Einfluss der Cysteinpeptidase EhCP5 auf die Pathogenität *in vivo* zu untersuchen, wurden pNeoEhCP5-TOPO transfizierte Trophozoiten in die Leber von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) injiziert. Für die Auswertung wird die Abszessgröße bezogen auf das Lebergewicht herangezogen. Als Bezugsgröße dient die Anzahl direkt in die Leber injizierter pNeoBox transfizierter Kontrollzellen.

3.2.4.1 Zellrasenzerstörung durch pNeoEhCP5-TOPO transfizierte *E. histolytica* und *E. dispar* (cytopathischer Effekt)

Trophozoiten bzw. deren Extrakte können adhären wachsende Zellrasen und deren Zellen voneinander ablösen. Verantwortlich dafür sind Enzyme, die Bindegewebsproteine abbauen - ähnlich der Behandlung der Zellen mit Trypsin. Die Fähigkeit einen CHO-Zellrasen zu zerstören stellt ein Maß für die pathogenen Eigenschaften der Amöben *in vitro* dar. Die

Versuche wurden sowohl mit Zellextrakten, als auch mit intakten Trophozoiten durchgeführt (siehe 2.25.). Nach Inkubation der jeweiligen Versuchsansätze bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre wurden die verbliebenen CHO-Zellen quantifiziert. In den Versuchen zerstörten pNeoEhCP5-TOPO transfizierte Amöben signifikant mehr CHO-Zellrasen als die NeoBox transfizierten Kontrollamöben. CHO-Zellrasen, die für eine Stunde mit 100 µg Protein aus Zellextrakten pNeoEhCP5-TOPO transfizierter Amöben inkubiert wurden, waren vollständig zerstört. Demgegenüber waren CHO-Zellrasen, die mit Extrakten aus NeoBox transfizierten Kontrollamöben behandelt wurden vollkommen intakt. Erst der Einsatz von 200 µg Zellextrakt aus NeoBox transfizierten Kontrollamöben führte zu einer ca. 50%igen Zerstörung der CHO-Zellrasen (siehe Abb. 10). Aus diesem Grunde errechnet sich ein mindestens vierfacher cytopathischer Effekt pNeoEhCP5-TOPO transfizierter Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

In CHO-Tests mit lebenden Trophozoiten zerstörten die pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Zellen den CHO-Zellrasen nach einstündiger Inkubation zu ca. 50%, während Neobox transfizierte Kontrollamöben den CHO-Zellrasen nur zu ca. 25% zerstörten. Nach zweistündiger Inkubation waren die Zellrasen zu 75% und 50% zerstört (siehe Abb. 10). Der cytopathische Effekt war demnach für lebende Trophozoiten durch Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 ca. um den Faktor 1,5 bis 2 gesteigert.

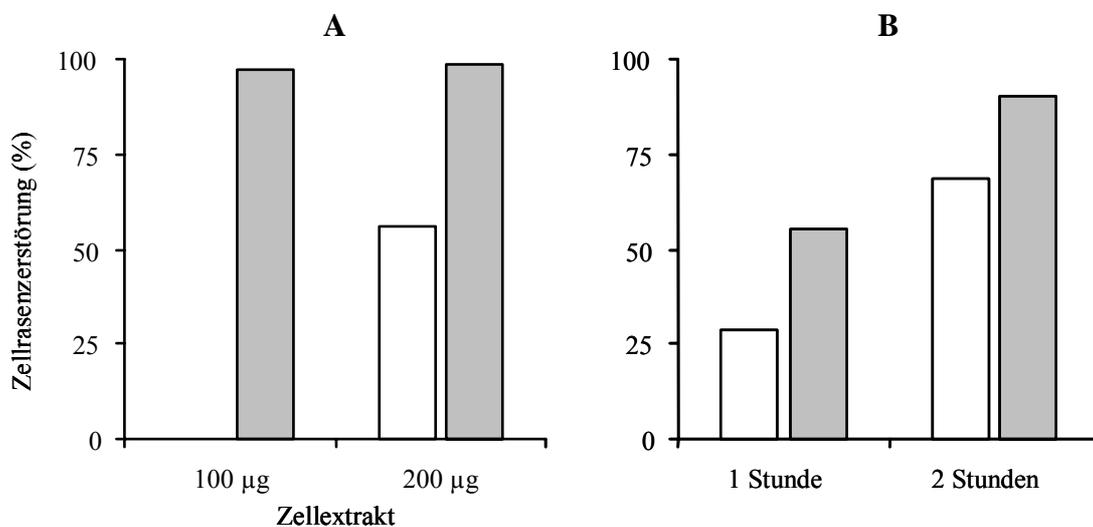


Abb. 10: Überexpression von EhCP5: Zerstörung eines CHO-Zellrasens durch NeoEhCP5-transfizierte *E. histolytica*.

Dargestellt ist die Zerstörung eines CHO-Zellrasens durch pNeoEhCP5-TOPO transfizierte *E. histolytica* im Vergleich zur Kontrolle. Die Bezugsgröße ist der intakte CHO-Zellrasen. Transfizierte Trophozoiten von *E. histolytica* wurden mit 50 µg/ml G418 selektioniert.

In Abb. A wurden 100 µg und 200 µg Protein frischer Extrakte aus Trophozoiten von *E. histolytica* auf den CHO-Zellrasen gegeben und für eine Stunde bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

In Abb. B wurden 2 x 10³ lebende Trophozoiten auf den Zellrasen gegeben und für 1 Stunde und 2 Stunden bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Der Fehler beträgt maximal 10%.

□ pNeoBox, ■ pNeoEhCP5.

3.2.4.2 Erythrophagozytose und hämolytische Aktivität

Die Erythrophagozytose und die hämolytische Aktivität stellen weitere Kriterien für die Pathogenität von *E. histolytica* dar. Um herauszufinden wie sich die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. histolytica* HMI:IMSS auf die Erythrophagozytose und die hämolytische Aktivität auswirken, wurden pNeoEhCP5-TOPO transfizierte *E. histolytica* wie unter 2.26 und 2.27 beschrieben untersucht. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen war die Erythrophagozytose in den pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Zellen um 35% erniedrigt. Die Hämolyse war nicht beeinflusst.

3.2.4.3 Bildung von Amöbenleberabszessen im Tiermodell

Um den Einfluss der Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 auf die Pathogenität der Amöben *in vivo* zu messen, wurde die Bildung von Amöbenleberabszessen im Tiermodell untersucht. Der Versuch wurde freundlicherweise von Dr. Hannelore Lotter durchgeführt.

1×10^6 pNeoBox und pNeoEhCP5-TOPO transfizierte Trophozoiten wurden wie unter 2.28 beschrieben direkt in die Leber von je 7 Wüstenrennmäusen injiziert. Sieben Tage nach Applikation der Trophozoiten wurden die Lebern der Tiere entnommen und die Größe der Abszesse in Bezug zur Lebergröße gesetzt. In jeder Wüstenrennmaus hat die Applikation der Amöben zur Bildung von Amöbenleberabszessen geführt. Die Abszessgröße in mit pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Amöben behandelten Wüstenrennmäusen war jedoch signifikant größer, als die der Kontrollgruppe.

Im Tiermodell konnte somit erstmalig nachgewiesen werden, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 signifikant an der Bildung von Amöbenleberabszessen beteiligt ist und somit einen wichtigen Pathogenitätsfaktor der Amöben darstellt.

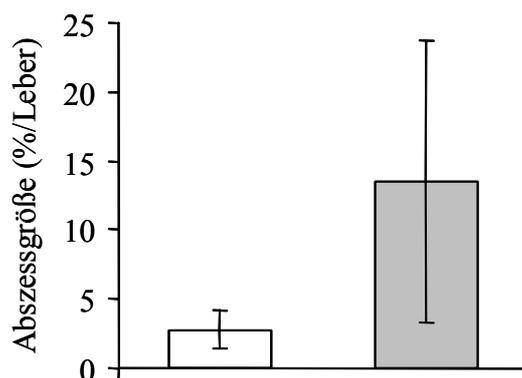


Abb. 11: Bildung von Amöbenleberabszessen durch NeoEhCP5 transfizierte *E. histolytica* "30459".

1×10^6 Trophozoiten wurden in den rechten Leberlappen von Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) injiziert. Die Lebern wurden nach einer Woche entnommen und die Abszessgewichte relativ zum Gesamtlebergewicht gemessen. Dargestellt ist die relative Abszessgröße. pNeoEhCP5-TOPO transfizierte Trophozoiten führten zu signifikant größeren Abszessen als pNeoBox transfizierte Trophozoiten.

□ pNeoBox, ■ pNeoEhCP5.

3.3 Resistenz von *E. histolytica* gegenüber E-64

3.3.1 Wachstum von *E. histolytica* mit E-64

In der Abb. 12 ist das Wachstum resistenter und nicht resistenter *E. histolytica* mit E-64 (50 μ M) dargestellt. Die Wachstumskurve wurde wie unter 2.23 beschrieben angefertigt.

Nicht resistente Amöben starben in Gegenwart von E-64 (50 μ M) bereits nach vier Tagen nahezu vollständig ab. In der Zellkultur waren Zelltrümmer und wenige intakte Zellen zu erkennen. Nach zehn Tagen wuchsen vereinzelt Zellen auf, die weiter in Gegenwart von E-64 kultiviert werden konnten. Bereits nach einmaliger Passage in TY-Medium mit E-64 konnten auf diese Weise resistente Zellen generiert werden.

In Abwesenheit des Inhibitors wuchsen die resistenten Trophozoiten etwas schneller auf als nicht resistente Trophozoiten. Die Wachstumsrate der E-64 resistenten Zellen war in Gegenwart von E-64 (50 μ M) fast genau so groß, wie ohne E-64. Der Eintritt in die log-Phase verzögerte sich aber um drei Tage. Die Resistenz blieb über einen Zeitraum von vier Monaten bei einer Kultivierung in TY-Medium ohne E-64 bestehen.

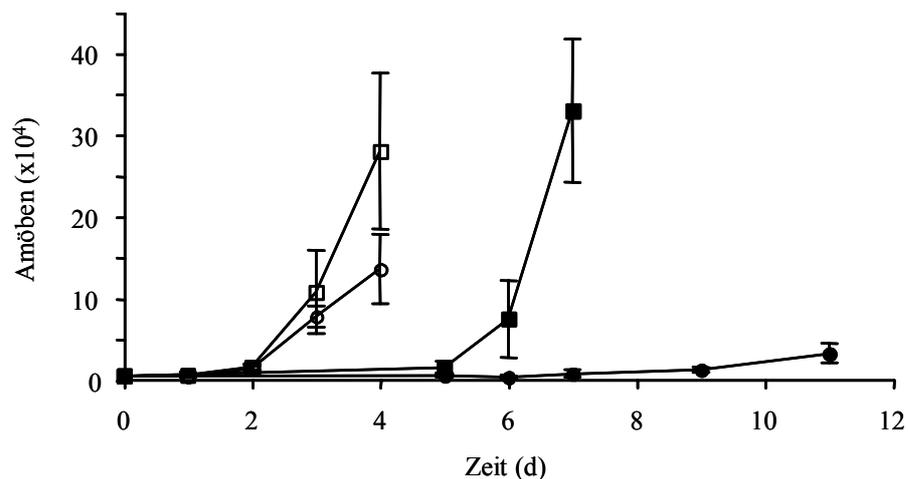


Abb. 12: Wachstum resistenter und nichtresistenter Zellen in Gegenwart von E-64.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurden 2×10^3 Zellen je Vertiefung in eine 24 "well-plate" (NUNC) gegeben (siehe 2.23). Die Durchführung erfolgte stets in Dreifachansätzen. Die Zellzahl wurde an den obig dargestellten Zeitpunkten mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Kultivierung erfolgte mit 50 μ M E-64 (+E-64) oder ohne E-64 (ØE-64).

○ E-64s (ØE-64), ● E-64s (+E-64), □ E-64r (ØE-64), ■ E-64r (+E-64).

3.3.2 Kreuzresistenz: Bestimmen der EC_{50} gegenüber verschiedenen Cysteinpeptidaseinhibitoren

Um festzustellen, ob die Resistenz der Amöben gegenüber E-64 mit einer Kreuzresistenz gegenüber weiteren Cysteinpeptidaseinhibitoren einhergeht, wurde die EC_{50} von *E. histolytica* wie unter 2.24 beschrieben für E-64, E-64d, Z-Phe-Phe-DMK, Z-Phe-Ala-DMK und Hydroxymercuribenzoat in Mikrotiterplatten getestet.

Die EC_{50} lag für resistente Amöben bei ca. 300 μM E-64 (siehe Abb. 13E). Die Zellen waren bis zu einer Konzentration von 500 μM E-64 teilungsfähig. Nichtresistente Zellen hingegen stagnierten bereits bei Konzentrationen von 50 μM E-64 und in der Zellkultur waren viele Zelltrümmer und wenige intakte Zellen zu erkennen. (siehe Abb. 13E). Wenige Zellen überlebten diese Phase, und begannen zu wachsen (siehe 3.3.1).

In Gegenwart von E-64d starben beide Zellpopulationen bereits nach drei Tagen in Gegenwart von nur 10 μM ab (siehe Abb. 13C). Die Zellen lysierten und unter dem Mikroskop waren nur noch Zelltrümmer zu erkennen. In Gegenwart von Z-Phe-Phe-DMK waren die Zellen bis zu einer Konzentration von 100 μM vital (siehe Abb. 13A) und es waren keine Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen. Mit Z-Phe-Ala-DMK hingegen zeigten die Zellen eine Absterbekinetik, die der von E-64d ähnelte und 15 μM des Cysteinpeptidaseinhibitors waren letal (siehe Abb. 13B). Im Mikroskop waren wiederum nur noch Zelltrümmer zu erkennen. Mit HMB starben die Zellen bei Konzentrationen von 10 μM ab (siehe Abb. 13D). Somit konnte für keinen der ausgewählten Cysteinpeptidaseinhibitoren eine Kreuzresistenz nachgewiesen werden.

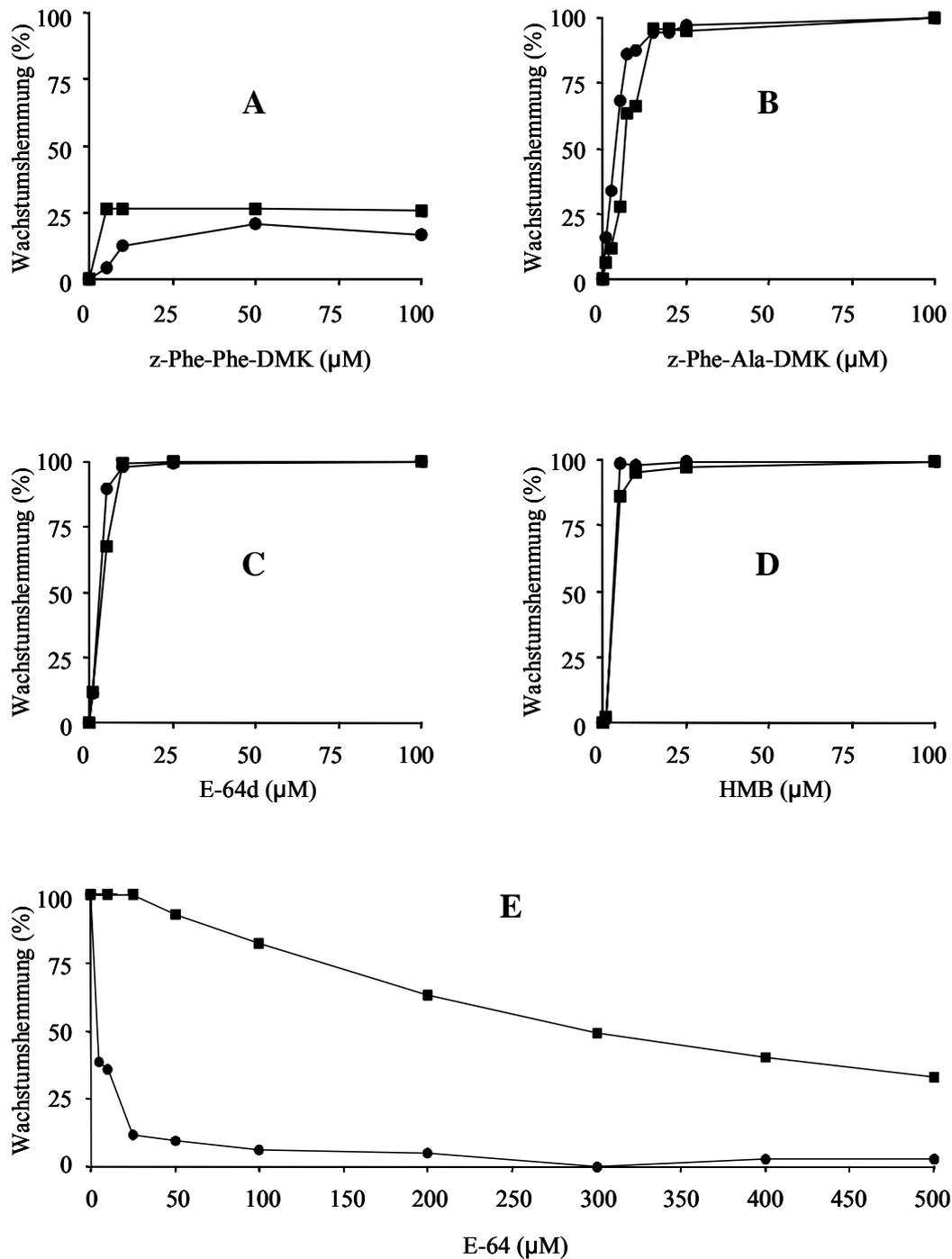


Abb. 13: EC₅₀ gegenüber verschiedene Cysteinpeptidaseinhibitoren.

1 x 10³ Amöben wurden wie unter 2.24 beschrieben für 72 Stunden in "96-well-plates" (NUNC) gegeben und mit den entsprechenden Inhibitoren versetzt. Das Wachstum wurde nach 72 Stunden wie unter 2.15 beschrieben mittels BCA-Test am ELISA-Reader gemessen. Die Experimente wurden zweimal in Dreifachansätzen durchgeführt. Der Fehler beträgt maximal 10%. ● E-64 s, ■ E-64 r.

3.3.3 Affinität gegenüber verschiedenen Diazomethylketonen

Unter 3.3.2 wurden erhebliche Unterschiede der Amöben in der EC_{50} gegenüber den Diazomethylketonen Z-Phe-Phe-DMK und Z-Phe-Ala-DMK festgestellt (siehe Abb. 13A und Abb. 13B). Die Affinität der Diazomethylketone zu ihrem Substrat – den Cysteinpeptidasen – wird von der Dipeptidylgruppe determiniert. Die Spezifität der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* entspricht der von Cathepsin B obwohl die Struktur der von Cathepsin L entspricht (Bruchhaus et al., 2003).

Um die Affinität der Inhibitoren gegenüber Trophozoitenextrakten abschätzen zu können wurden Trophozoitenextrakte für 30 min mit 10 μ M des jeweiligen Inhibitors inkubiert und in der Substrat-SDS-Gelelektrophorese getrennt (siehe Abb. 14). Im Zymogramm ist deutlich zu erkennen, dass Z-Phe-Ala-DMK die gesamte proteolytische Aktivität von *E. histolytica* hemmt, während mit Z-Phe-Phe-DMK behandelte Zellextrakte noch eine – im Vergleich zur Kontrolle geringe – Restaktivität besitzen. Literaturwerte für die Inhibierung von Cathepsin B und Cathepsin L durch Diazomethylketone sind der Tab. 6 zu entnehmen.

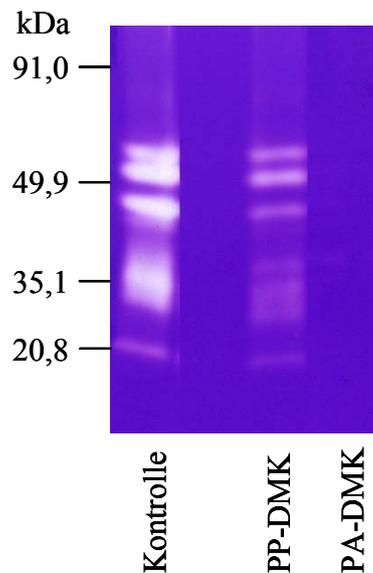


Abb. 14: Affinität verschiedener Diazomethylketone gegenüber Extrakten von *E. histolytica*.

Dargestellt sind Coomassie gefärbte 10%ige SDS-Polyacrylamidgele in denen 0,1% Gelatine (w/v) copolymerisiert wurde. Je Spur wurden 2 μ g Protein aufgetragen. Die Extrakte wurden für 30 Minuten mit dem jeweiligen Cysteinpeptidaseinhibitor bei 37°C inkubiert.

Tab. 6: Affinitäten von Cathepsin B und Cathepsin L gegenüber verschiedene Diazomethylketone.

Angegeben ist die Halbwertszeit für die Inhibierung in Gegenwart von 10 μ M des jeweiligen Inhibitors (Kirschke et al., 1981; Kirschke et al., 1988; Crawford et al., 1988)

Cysteinpeptidaseinhibitor	Cathepsin B	Cathepsin L
Z-Phe-Phe-DMK	374	0,4
Z-Phe-Ala-DMK	57	1,0

3.3.5 Western-Blot Analysen von *E. histolytica*, die in Gegenwart von E-64 kultiviert wurden

Von Engel et al. wurde gezeigt, dass *T. cruzi* in Gegenwart von Cysteinpeptidaseinhibitoren Cysteinpeptidasen nicht mehr prozessieren kann (Engel et al., 2000). Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Prozessierung der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* durch Anwesenheit von E-64 im Kulturmedium verhindert wird, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden Zellextrakte resistenter und nicht resistenter *E. histolytica*, die in Gegenwart oder Abwesenheit von E-64 kultiviert wurden im 12%igen SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen getrennt (siehe 2.16) und auf Nylonmembranen übertragen (siehe 2.18). Es wurden die gleichen Antikörper, wie bereits unter 3.2.3 beschrieben, verwendet. Die molekularen Massen der drei reduzierten und denaturierten Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 betragen ca. 29 kDa (siehe Abb. 16). Resistente Zellen wuchsen eine Woche lang in Gegenwart des Inhibitors und nicht resistente Zellen wurden für 24 Stunden in Gegenwart des Inhibitors kultiviert.

Die Kultivierung der Amöben mit 50 μ M E-64 führte in beiden Zellpopulationen zu einer größeren molekularen Masse der jeweiligen Cysteinpeptidase von ca. 34 kDa (siehe Abb. 16). Vermutlich handelt es sich hierbei um die Proform der jeweiligen Cysteinpeptidase.

Die Proformen der Cysteinpeptidasen werden durch die verwendeten Antikörper schlechter als die mature Form erkannt (Bruchhaus, persönliche Mitteilung). Die Signale für die putativen Proformen in Amöbenextrakten aus Trophoziten, die mit E-64 kultiviert wurden sind aus diesem Grunde nur sehr schwach. Da unter diesen veränderten Kulturbedingungen keine 29 kDa Banden zu erkennen sind (siehe Abb. 16) kann vermutet werden, dass die Zellen in Gegenwart von E-64 keine Cysteinpeptidasen mehr prozessieren können.

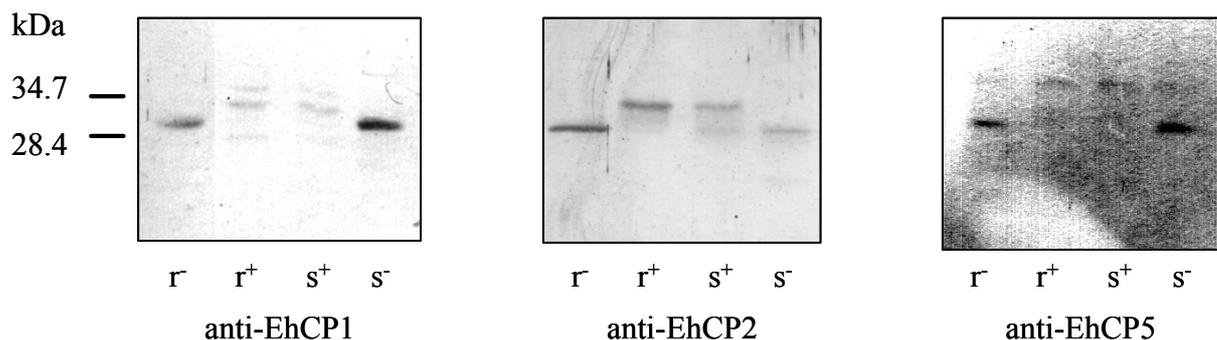


Abb. 16: Western-Blot-Analyse mit Zellextrakten von Amöben, die in Gegenwart von E-64 wuchsen.

Die Zellextrakte wurden mittels 12%iger SDS-PAGE getrennt und nach dem Transfer auf Nitrocellulosemembranen mit spezifischen Antikörpern gegen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 entwickelt. Je Spur wurden 20 μ g Extrakt aufgetragen. Die Blots wurden wie unter 2.18 beschrieben erstellt.

r⁻: E-64 r, Kulturführung ohne Inhibitor; r⁺: E-64 r, für 7 Tage mit 50 μ M E-64 kultiviert;

s⁺: 64 s für 24 Stunden mit 50 μ M E-64 kultiviert; s⁻: E-64 s, Kulturführung ohne Inhibitor.

3.3.6 2D-SDS-PAGE Untersuchungen von Zellextrakten resistenter und nicht resistenter *E. histolytica*

Die 2D-SDS-PAGE Analyse ermöglicht Unterschiede im Proteom von Zellpopulationen sichtbar zu machen. Mittels anschließender MALDI-TOF Analyse können differentiell exprimierte Proteine identifiziert werden. Mit diesen Methoden sollte versucht werden Hinweise auf die Ursachen für die Resistenz von *E. histolytica* zu erhalten. In Western-Blot Analysen wurden bereits Hinweise darauf erhalten, dass Cysteinpeptidasen von Amöben, die in Gegenwart von E-64 wuchsen, vermutlich nicht mehr prozessiert werden (siehe 3.3.5).

In der 2D-SDS-PAGE Analyse wurden Zellextrakte resistenter *E. histolytica* die ohne E-64 und eine Woche mit E-64 wuchsen denen nichtresistenter *E. histolytica*, die ohne E-64 und über Nacht mit E-64 inkubiert wurden gegenübergestellt.

Dazu wurden die Zellextrakte zunächst im pH-Bereich von 4 – 7 isoelektrisch fokussiert (siehe 2.17.2) und anschließend im 13%igen Tris-Tricin-Gel nach der Größe getrennt (siehe 2.17.4). Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt (siehe 2.19.2) und die Proteine differentieller Spots wurden wie unter 2.17.5 beschrieben ausgestochen, tryptisch verdaut (siehe 2.17.6) und einer MALDI-TOF-Analyse zugeführt (siehe 2.17.9). Die Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse wurden schließlich mit der Internet Datenbank NCBCI abgeglichen.

Es traten differentielle Spots in Gelen auf, die mit Zellextrakten von E-64 kultivierten Trophozoiten angefertigt wurden. Sieben Spots wurden einer MALDI-TOF Analyse zugeführt. Im Folgenden wird auf die Spots 1 – 5 näher eingegangen.

Nur die Spots Nr. 1 und 2 traten bei Kultivierung der Zellen in Abwesenheit von E-64 auf (siehe Abb. 17). Für Spot Nr. 1 wurden Peptidfragmente der katalytischen Domäne der Cysteinpeptidase EhCP1 identifiziert (siehe Abb. 18). Für Spot Nr. 2 wurden Peptidfragmente der katalytischen Domäne der Cysteinpeptidase EhCP2 gefunden (siehe Abb. 18).

Zusätzlich zu Spot Nr. 1 und Spot Nr. 2 traten die Spots Nr. 3, 4 und 5 ausschließlich bei Kultivierung der Zellen mit E-64 auf. Für Spot Nr. 4 stimmten Peptidfragmente der Proform der Cysteinpeptidase EhCP1 überein und für Spot Nr. 5 Peptidfragmente der Proform der Cysteinpeptidase EhCP2 (siehe Abb. 18). Demgegenüber konnten für Spot Nr. 3 nur Peptidfragmente der katalytischen Domäne der Cysteinpeptidase EhCP1 identifiziert werden (siehe Abb. 18).

Zu beachten ist, dass die molekularen Massen der Spots 3, 4 und 5 nur geringfügig größer sind als die der Spots 1 und 2. Weiterhin fällt auf, dass die Intensitäten der Spots Nr. 1 und 2 – bei Kultivierung der Amöben mit E-64 – für die beiden Zellpopulationen unterschiedlich groß sind. In Gelen, die mit Extrakten aus sensitiven Zellen angefertigt wurden, sind diese Spots sehr viel deutlicher zu erkennen sind als in Gelen, die mit Extrakten aus resistenten Zellen angefertigt wurden.

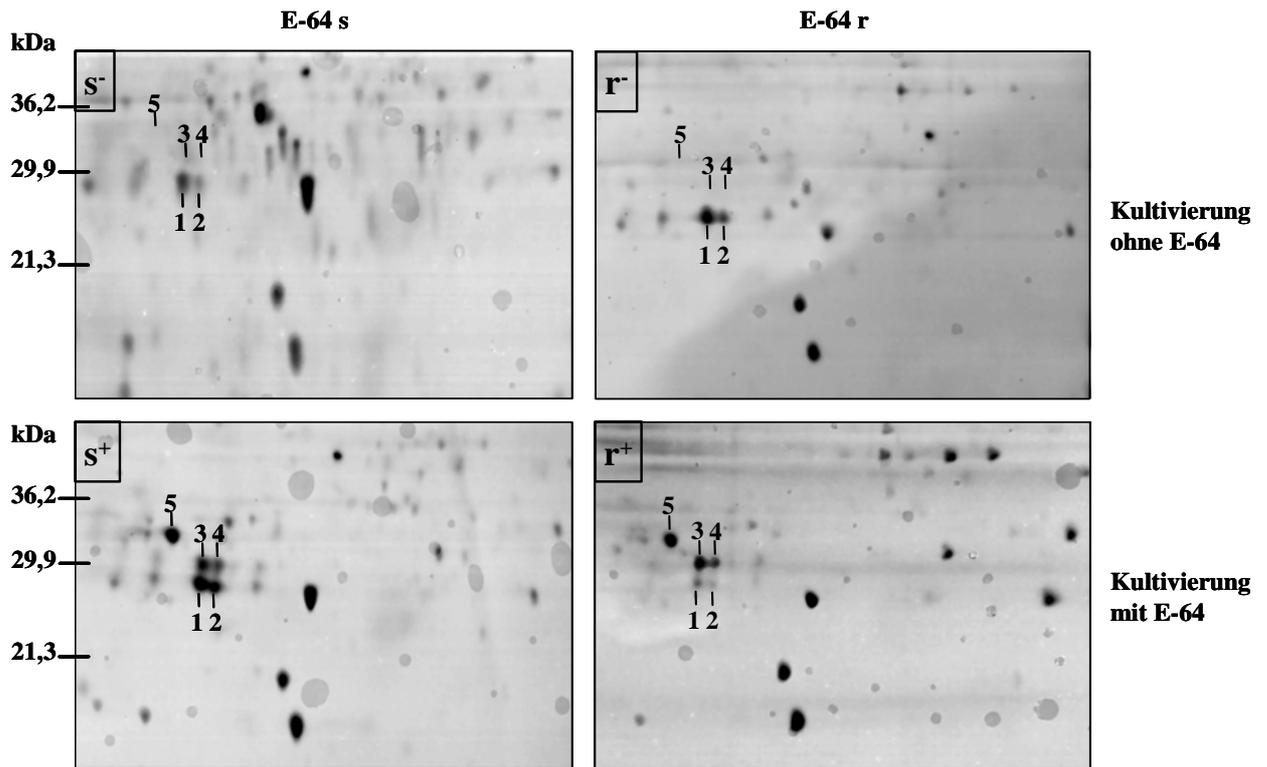


Abb. 17: 2D-SDS-PAGE-Analyse resistenter Amöben, die in Gegenwart von 50 μM E-64 wuchsen.

Dargestellt sind Ausschnitte aus 13%ige Tris-Tricin-Gelen. Die Zellextrakte wurden durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen und anschließender Ultrazentrifugation hergestellt. Je Gel wurden 500 μg Protein aufgetragen und im pH-Bereich 4-7 isoelektrisch fokussiert. Obig ist der pH-Bereich 5 – 6 abgebildet. Anschließend erfolgte die Trennung nach der Größe bei 11 mA und 4°C. Die Gele wurden Coomassie gefärbt (siehe 2.19.2). die beschrifteten differentiellen Spots wurden einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen.

s^- : E-64 s Kultivierung ohne E-64, s^+ : E-64 s Kultivierung mit 50 μM E-64,

r^- : E-64 r Kultivierung ohne E-64, r^+ : E-64 r Kultivierung mit 50 μM E-64.

Spot 1: Kultivierung ohne E-64, Übereinstimmung der Peptidfragmente mit EhCP1

MFTFILMFYIGYG

IDFNTWVANNKHF~~TAVESLRRRAIFNMNARIVAENNRKETF~~KLSDGPF~~AA~~M~~TNEE~~YNSLLKLRSG
EEKGEVRYLNIQ

APK AVDWR KKGKVTPIRDQNGCGSCYTFGSIAALEGR LLIEKGGDSETLDLSEEHMVQCTR
EDGNNCGGLGNSVYNYIMENGIK ESDYPYTGSDSTCRSDVK AFAKISYNRVARNNEVELK
AAISQGLVDVSDASSVQFOLYK SGAYTDTQCKNNYFALNHEVCAVGYGVVDGK ECWIVRNSW
GTGWGEK GYINM~~VIEGNTCGVATDPLYPTGVEYL~~

Spot 2: Kultivierung ohne E-64, Übereinstimmung der Peptidfragmente mit EhCP2

MFAFICLLAIASA

IDFNTWASKNNKHF~~TAEIKLRRRAIFNMNAKFVDSFNKIGSF~~KLSDGPF~~AA~~M~~TNEE~~YR~~TLLKSKRTTEE~~
NGQVKYLNIIQ

APESVDWRKEGKVTPIRDQAQCGSCYTFGSLAALEGR LLIEK GGDANTLDLSEEHMVQCTRDNG
NNGCNGGLGNSVYDYIIEHGVAKESDYPYTGSDSTCK TNVKSAK ITGYTKVPR NNEAELKA
ALSQGLVDVSDASSAK FQLYKSGAYTDTKCKNNYFALNHEVCAVGYGVVDGK ECWIVR NSWG
TGWDKGYINM~~VIEGNTCGVATDPLYPTGVQYL~~

Spot 3: Kultivierung mit E-64, Übereinstimmung der Peptidfragmente mit EhCP1

MFTFILMFYIGYG

IDFNTWVANNKHF~~TAVESLRRRAIFNMNARIVAENNRKETF~~KLSDGPF~~AA~~M~~TNEE~~YNSLLKLRSG
EEKGEVRYLNIQ

APK AVDWR K KKGKVTPIRDQNGCGSCYTFGSIAALEGR LLIEK GGDSETLDLSEEHMVQCTR
EDGNNCGGLGNSVYNYIMENGIK ESDYPYTGSDSTCR SDVK AFAK IKSYNR VARNNEV
ELK AAISQGLVDVSDASSVQFOLYK SGAYTDTQCKNNYFALNHEVCAVGYGVVDGK ECWIVR
NSWGTGWGEK GYINM~~VIEGNTCGVATDPLYPTGVEYL~~

Spot 4: Kultivierung mit E-64, Übereinstimmung der Peptidfragmente mit EhCP1

MFTFILMFYIGYG

IDFNTWVANNKHF~~TAVESLRRRAIFNMNAR~~ IVAENNR KETF~~KLSDGPF~~AA~~M~~T~~N~~EE~~YNSLLKLRSG~~
RSGEEKGEVRYLNIQ

APKAVDWRKKKGVTPIRDQNGCGSCYTFGSIAALEGRLLIEKGGDSETLDLSEEHMVQCTREDGNNCG
NGGLGNSVYNYIMENGIK ESDYPYTGSDSTCR SDVKAF~~AKISYNRVARNNEVELK~~ AAISQGLVDVSDASSVQFOLYK
SGAYTDTQCK NNYFALNHEVCAVGYGVVDGK ECWIVR NSWGTGWGEK
GYINM~~VIEGNTCGVATDPLYPTGVEYL~~

Spot 5: Kultivierung mit E-64, Übereinstimmung der Peptidfragmente mit EhCP2

MFAFICLLAIASA

IDFNTWASKNNKHF~~TAEIKLRRRAIFNMNAKFVDSFNKIGSF~~KLSDGPF~~AA~~M~~TNEE~~YR~~TLLKSKRTTEE~~
NGQVK YLNIQ

APESVDWRK EGKVTPIRDQAQCGSCYTFGSLAALEGRLLIEK GGDANTLDLSEEHMVQCTR DN
GNNCGGLGNSVYDYIIEHGVAK ESDYPYTGSDSTCKTNVK SFAK ITGYTKVPR NNEAELK
AALSQGLVDVSDASSAKFQLYKSGAYTDTKCKNNYFALNHEVCAVGYGVVDGKECWIVRNSWGTW
GDKGYINM~~VIEGNTCGVATDPLYPTGVQYL~~

Abb. 18: Übereinstimmende Peptide nach tryptischem Verdau differentieller Protein-spots.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der jeweiligen identifizierten Cysteinpeptidase im Einbuchstabencode. Blau: Peptidsequenz der Präform. Grün: Peptidsequenz der Proform. Rot: Peptidsequenz der maturen Form. Schwarz: Identifizierte Peptidsequenzen, die wie unter 2.17.12 beschrieben identifiziert wurden.

3.3.7 Expression von Cysteinpeptidase-RNA

Um herauszufinden, ob die Resistenz gegenüber E-64 mit einer veränderten Expression von Cysteinpeptidase-Genen einhergeht, wurden Northern-Blot Analysen durchgeführt. Im Northern-Blot wurde die RNA resistenter *E. histolytica*, die ohne E-64 und eine Woche mit E-64 wuchsen mit der RNA nichtresistenter *E. histolytica*, die ohne E-64 und über Nacht mit E-64 inkubiert wurden verglichen. Die RNA wurde wie unter 2.4.3 beschrieben isoliert, im Agarosegel getrennt und wie unter 2.10 beschrieben auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurde die Membran sequentiell mit radioaktiv markierten Proben hybridisiert (siehe 2.11).

Auf RNA-Ebene konnten keine Unterschiede zwischen resistenten und nicht resistenten Trophozoiten gefunden werden. Wenn die Zellen in Gegenwart von E-64 wuchsen, war die Genexpression beider Zellpopulationen deutlich erhöht (siehe Abb. 19).

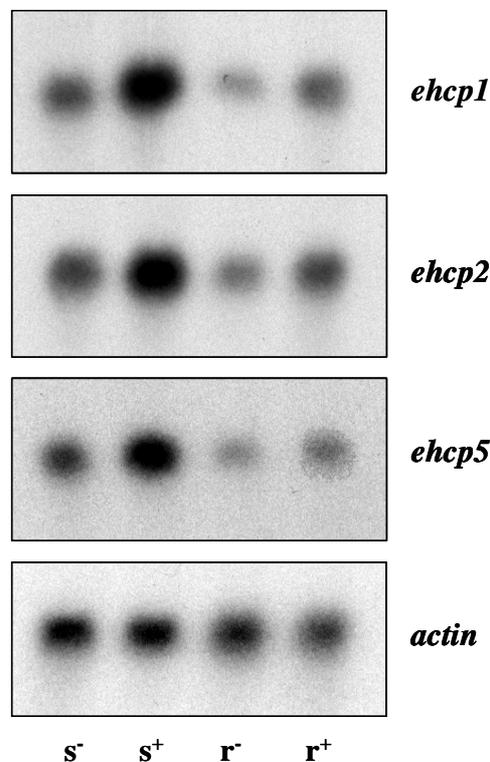


Abb. 19 Northern-Blot-Analyse resistenter Amöben, die in Gegenwart von 50 µM E-64 kultiviert wurden.

Je Spur wurden 20 µg RNA aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte mit den für EhCP1, EhCP2 und EhCP5 kodierenden Genen. Die Hybridisierung mit einem 650 Bp großen DNA-Fragment eines Aktins von *E. histolytica* diente der Kontrolle der Probenapplikation.

s⁻: E-64 s, Kulturführung ohne Inhibitor; s⁺: E-64 s, für 24 Stunden mit 100 µM E-64 kultiviert;

r⁻: E-64 r Kulturführung ohne Inhibitor; r⁺: E-64 r, für 7 Tage mit 100 µM E-64 kultiviert;

3.3.8 Ultrastruktur E-64 resistenter Zellen

Mit Hilfe transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen sollte geklärt werden, ob die Resistenz der Amöben gegenüber E-64 mit ultrastrukturellen Veränderungen einhergeht. Hierzu wurden die Kontrollzellen über Nacht mit 50 µM E-64 kultiviert. Die Kultivierung der resistenten Zellen hingegen erfolgte für eine Woche in Gegenwart von E-64.

Um die Ultrastruktur der Amöben darzustellen, wurden Ultradünnschnitte cryofixierter und cryosolubilisierter Trophozoiten wie unter 2.29 beschrieben angefertigt. In Ultradünnschnitten ist deutlich zu erkennen, dass in Zellen, die in Gegenwart von E-64 kultiviert wurden, filamentöse Strukturen abundant auftreten. Diese Strukturen reagierten nicht mit spezifischen Antikörpern gegen Aktin. Die Funktion dieser Strukturen konnte nicht aufgeklärt werden. Außerdem konnte in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen resistenten und nicht resistenten Amöben nachgewiesen werden. Die fibrillären Strukturen kamen in nicht resistenten Kontrollzellen genauso abundant vor, wie in resistenten Zellen.

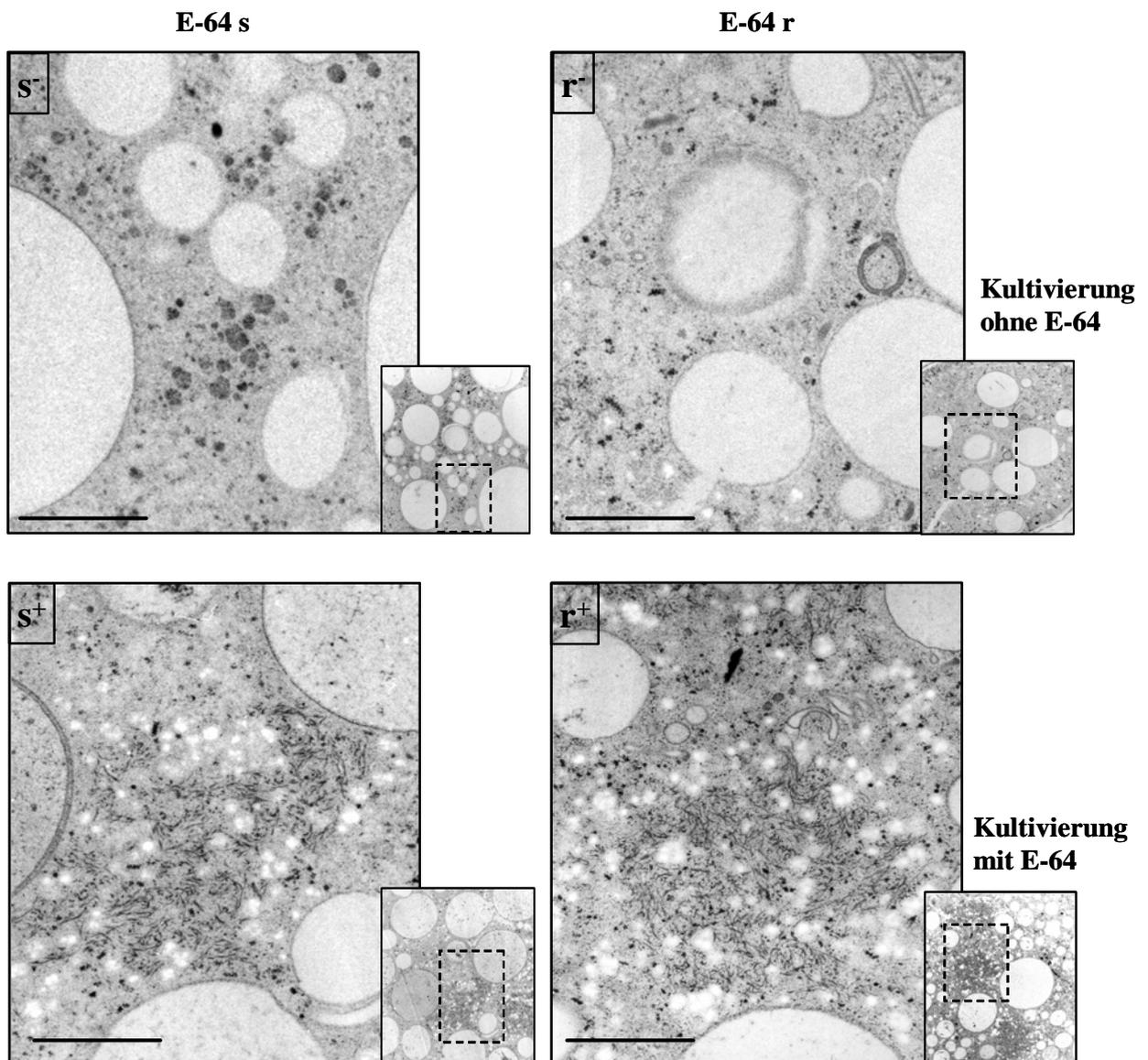


Abb. 20: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *E. histolytica*.

Dargestellt sind typische Bereiche von Ultradünnschnitten cryofixierter und cryosolubilisierter Zellen. Der Größenbalken entspricht 1 μM .

s^- : E-64 s Kultivierung ohne E-64, s^+ : E-64 s Kultivierung mit 50 μM E-64,

r^- : E-64 r Kultivierung ohne E-64, r^+ : E-64 r Kultivierung mit 50 μM E-64.

3.3.9 Untersuchungen zur Pathogenität der resistenten Zellen.

Um herauszufinden, ob die Resistenz der Amöben mit einer Veränderung der pathogenen Eigenschaften einhergeht, wurden die Trophozoiten verschiedenen Untersuchungen unterzogen. Als *in vitro* Maß für die Pathogenität von Trophozoiten dient die Fähigkeit verschiedene Zellrasen zu zerstören, z.B. aus CHO-Zellen oder BHK-Zellen ("Baby-Hamster-Kidney"). Als *in vivo* Maß für die Pathogenität von Trophozoiten dient die Leberabszessbildung in Nagetieren, z.B. Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*). Für die Auswertung wird hierbei die Abszessgröße bezogen auf das Lebergewicht herangezogen. Als Bezugsgröße dient die Anzahl direkt in die Leber injizierter Trophozoiten.

3.3.9.1 Zerstörung von Zellrasen durch resistente bzw. nichtresistente Trophozoiten und deren Zellextrakt (cytopathische Aktivität)

Um die pathogenen Eigenschaften resistenter Zellen *in vitro* zu messen wurden CHO-Tests durchgeführt. Die Durchführung der Tests erfolgte wie unter 2.25 beschrieben. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die nicht resistenten Amöben als auch die resistenten Amöben nahezu in dem gleichen Maße in der Lage sind CHO-Zellrasen zu zerstören (siehe Abb. 21). Die Zerstörung der CHO-Zellrasen korreliert dabei mit der CP-Aktivität der jeweiligen Zellpopulation. Die Inkubation der Zellen mit 50 μM E-64 führt zu einer vollständigen Hemmung der CP-Aktivität (siehe Abb. 15). Zur Durchführung des Tests wurden die nicht resistenten Amöben über Nacht mit dem Inhibitor kultiviert, während die resistenten Zellen für eine Woche mit dem Inhibitor kultiviert wurden. In den Tests zur cytopathischen Aktivität konnten wiederum keine Unterschiede zwischen WT-Zellen und resistenten Zellen nachgewiesen werden.

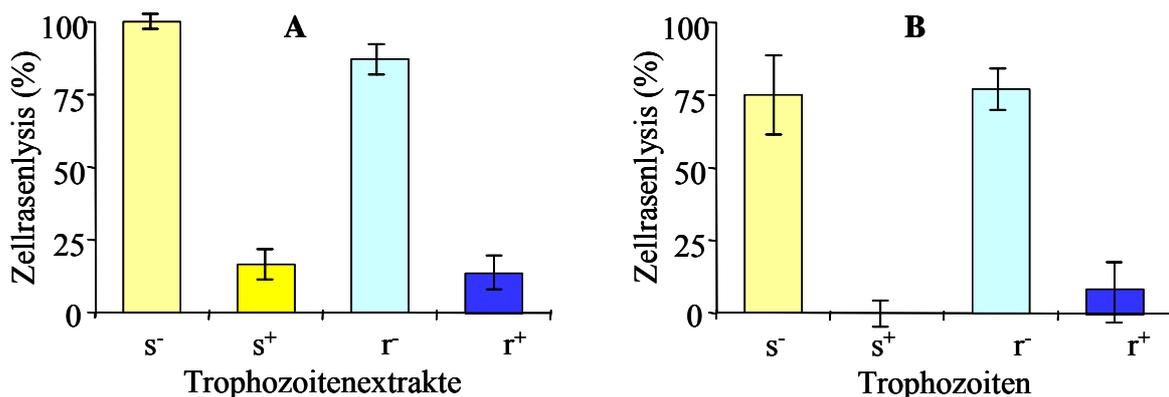


Abb. 21: CHO-Tests mit Zellextrakten und lebenden Amöben zur Untersuchung der zytopathischen Eigenschaften.

A: Die CHO-Zellrasen wurden in 5%-iger CO₂-Atmosphäre mit 100 μg Protein aus Zellextrakten der jeweiligen Zellpopulationen inkubiert.

B: Die CHO-Zellrasen wurden in 5%-iger CO₂-Atmosphäre mit 2×10^3 Trophozoiten der jeweiligen Zellpopulationen inkubiert.

s⁻: *E. histolytica* HM-1:IMSS, Kultivierung ohne E-64; s⁺: *E. histolytica* HM-1:IMSS, Kultivierung mit 50 μM E-64.

r⁻: E-64 resistente Amöben, Kultivierung ohne E-64; r⁺: E-64 resistente Amöben, Kultivierung mit 50 μM E-64.

3.3.9.2 Induktion von Leberabszessen in *Meriones unguiculatus*

Um den Einfluss der Resistenz auf die Pathogenität der Amöben *in vivo* zu messen, wurden resistente Amöben und resistente Amöben, die seit sieben Tagen mit 50 μM E-64 gewachsen sind wie unter 2.28 beschrieben direkt in die Leber von je 8 Wüstenrenmäusen injiziert. Zur Kontrolle dienten nicht resistente Amöben und nicht resistente Amöben, die über Nacht mit 50 μM E-64 kultiviert wurden.

Nicht resistente Amöben verursachten in allen acht Tieren der Testgruppe die Bildung von Abszessen mit einem mittleren relativen Abszessgewicht von 7,53%. Demgegenüber verursachten nicht resistente Amöben, die kurzfristig mit E-64 kultiviert wurden, nur in sechs von acht Tieren der Testgruppe die Bildung von Leberabszessen. Hervorzuheben ist dabei, dass die mittlere relative Abszessgröße von 1,82% signifikant geringer ist.

Im Gegensatz zu nicht resistenten Zellen verursachten resistente Zellen in nur fünf von acht Tieren Abszesse. Die Abszessgröße war mit einem mittleren relativen Abszessgewicht von 2,96% signifikant geringer als die der Kontrollamöben. Wenn die resistenten Zellen in Gegenwart von 50 μM E-64 wuchsen, waren sie nicht mehr virulent. Nur noch eines von acht Tieren hatte einen kleinen Abszess mit einem relativen Abszessgewicht von 1,38%.

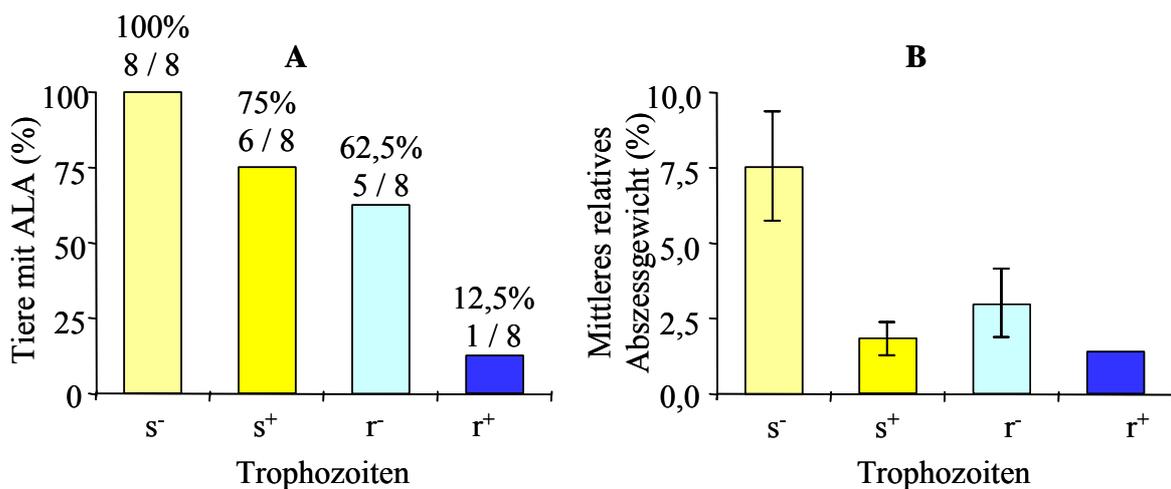


Abb. 22: Induktion von Leberabszessen in Wüstenrenmäusen (*Meriones unguiculatus*).

A: Tiere mit Amöbenleberabszess (%), die durch die jeweilige Zellpopulation ausgelöst wurden (s. unten)

B: Mittleres relatives Abszessgewicht (%), die durch die jeweilige Zellpopulation ausgelöst wurden (s. unten)

s⁻: *E. histolytica* HM-1:IMSS, Kultivierung ohne E-64; s⁺: *E. histolytica* HM-1:IMSS, Kultivierung mit 50 μM E-64

r⁻: E-64 resistente Amöben, Kultivierung ohne E-64; r⁺: E-64 resistente Amöben, Kultivierung mit 50 μM E-64

3.3.10 Sezernierung von Cysteinpeptidasen

Für Cysteinpeptidaseinhibitor resistente *T. cruzi* wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt, dass resistente Zellen in Gegenwart des Inhibitors nicht prozessierte Peptidasen im Bereich der Flagellartasche sezernieren (Engel et al., 2000). Da sich Trypanosomen morphologisch erheblich von *Entamoeba* unterscheiden und da keine für die Elektronenmikroskopie geeigneten Antikörper generiert wurden, konnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine Aussage über verändertes Prozessieren von Cysteinpeptidasen und in der Folge einen veränderten Protein-Transport getroffen werden (siehe 3.3.8). Um festzustellen, ob der Resistenzmechanismus von *E. histolytica* - ähnlich wie für *T. cruzi* - auf der Sezernierung nicht prozessierter Peptidasen beruht, wurden Western-Blot Analysen mit Kulturüberständen adhärent wachsender Zellen angefertigt (siehe 3.2.3).

Hierfür wurden Trophozoiten für 24 Stunden in einer 24 "well-plate" kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium durch NaPBS ersetzt und für weitere drei Stunden kultiviert.

Im Western-Blot mit einem Antiserum gegen EhCP5 zeigte sich für resistente Amöben, die seit einer Woche in Gegenwart von 50 μ M E-64 gewachsen sind, eine Bande mit höherer molekularer Masse im Kulturüberstand. Diese Bande trat nicht im Kulturüberstand nichtresistenter Amöben auf, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Daraus folgt, dass die resistenten Amöben – im Gegensatz zu nicht resistenten Amöben in der Lage sind die unprozessierten Proformen der Cysteinpeptidasen zu sezernieren.

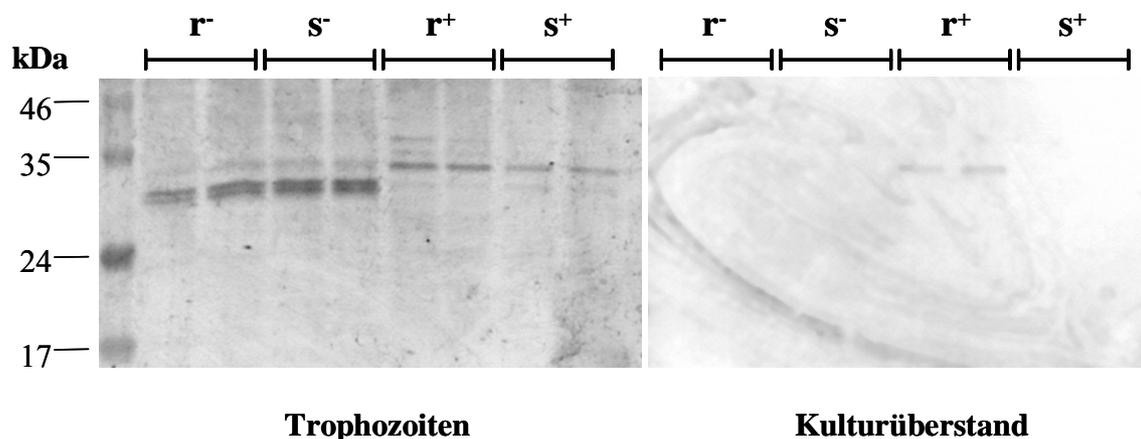


Abb. 23: Western-Blot Analyse von Kulturüberständen und adhärenenten *E. histolytica*.

A: Western-Blot Analyse adhärenent wachsender Trophozoiten der jeweilige Zellpopulation (s. unten)

B: Western-Blot Analyse des Kulturüberstandes adhärenent wachsender Trophozoiten der jeweilige Zellpopulation (s. unten)

s⁻: *E. histolytica* HM-1:IMSS, Kultivierung ohne E-64

s⁺: *E. histolytica* HM-1:IMSS, Kultivierung mit 50 μ M E-64

r⁻: E-64 resistente Amöben, Kultivierung ohne E-64

r⁺: E-64 resistente Amöben, Kultivierung mit 50 μ M E-64

4 DISKUSSION

4.1 Versuche zur Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. histolytica* und *E. dispar*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Informationen über die Funktion von Cysteinpeptidasen in *E. histolytica* erarbeitet werden.

Mit der Sequenzierung des Amöbengenoms wurden kürzlich zwanzig Gene, die für Cysteinpeptidasen kodieren, im Genom von *E. histolytica* identifiziert. Unter Kulturbedingungen werden nur die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 hauptsächlich exprimiert. Demgegenüber wird in *E. dispar* die Cysteinpeptidase EdCP3 hauptsächlich exprimiert, gefolgt von EdCP2 (Bruchhaus et al., 1996; Bruchhaus et al., 2003).

Es gibt mehrere Möglichkeiten um Informationen über die Funktion eines Gens bzw. dessen korrespondierenden Proteins zu erhalten. Mittels Deletions- Insertions- oder "Knock-out" Mutanten des betreffenden Gens kann über phänotypische Auswirkungen, dessen Funktion beurteilt werden. Aufgrund des vermutlich mindestens tetraploiden Chromosomensatzes von *E. histolytica* (Willhoeft et al., 1999c) ist die Erzeugung der obig genannten Mutanten in *E. histolytica* erschwert. Des Weiteren sind für die Erzeugung von "Knock-out" Mutanten Rekombinationsereignisse notwendig. In *E. histolytica* ist bislang nicht gelungen, derartige genetische Ereignisse experimentell zu erzeugen.

Weiterhin können Gene auch partiell mittels der "Antisense" Technologie ausgeschaltet, bzw. kann die Translation mit spezifischer "Antisense-RNA" reduziert werden (Nellen et al., 1996; Baker et al., 1999). Diese Technik kam bislang auch in *E. histolytica* zur Anwendung (Petri et al., 1999). Eine andere Möglichkeit, die Funktion eines Proteins zu untersuchen stellt die Überexpression des korrespondierenden Gens dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 mittels episomaler Transfektion von *E. histolytica* HM-1:IMSS "30459" in dem Vektor "NeoBox" untersucht.

Versuche zur Überexpression verschiedener Gene von *E. histolytica* wurden bereits erfolgreich mit vom Vektor "NeoCass" abgeleiteten Vektoren durchgeführt (Hamann et al., 1995), in denen das jeweilige Strukturgen unter Kontrolle des Lektinpromotors stand (Ghosh et al., 1996; Arhets et al., 1998; Wassmann et al., 1999; Mai et al., 1999; Voigt et al., 1999; Hellberg et al., 2001). Die transfizierte DNA integriert nicht in das Amöbengenom, sondern verbleibt episomal, repliziert sich autonom und die Kopienanzahl ist dem Selektionsdruck proportional (Hamann et al., 1995). Während die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP2 im obigen Vektor unter Kontrolle des Lektinpromotors möglich war, konnten die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP5 sowie Amöbapore im gleichen Vektor unter Kontrolle des Lektinpromotors aus bislang unbekanntem Gründen nicht überexprimiert werden (Hellberg et al., 2001).

4.1.1 Für die Genexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 sind stromaufwärts oder stromabwärts liegende "cis-acting" Elemente notwendig

Mit der Sequenzierung des Amöbengenoms im TIGR und Sanger-Genomprojekt war es möglich, einen Vektor zu konstruieren, in dem die Cysteinpeptidase EhCP5 unter Kontrolle des geneigenen Promotors stand. Für dieses Konstrukt wurden 1,5 kBp der 3'-flankierenden Sequenz und 2,5 kBp der 5'-flankierenden Sequenz der *ehcp5* amplifiziert (siehe 2.30), da 5'- und 3'-flankierende Sequenzen für die Expression von Amöbengenomen eine wichtige Rolle spielen (Nickel et al., 1994; Purdy et al., 1994; Buss et al., 1995; Schaenman et al., 1998; Singh et al., 2002) und die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 unter Kontrolle des Lektinpromotors nicht möglich war (Hellberg et al., 2001).

Die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 konnte im Northern-Blot sowohl in *E. histolytica* als auch in *E. dispar* nachgewiesen werden und hatte keinen Einfluss auf das Expressionsniveau der Cysteinpeptidasen *ehcp1* und *ehcp2* (siehe Abb. 7). Die transfizierte DNA verbleibt episomal und repliziert sich entsprechend dem durch die Neomycinkonzentration ausgeübten Selektionsdruck autonom. Somit liegen viele Kopien des Plasmides in der Zelle vor (Hamann et al., 1995). Da die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 – im Gegensatz zur EhCP2 – ohne geneigene 5'- und 3'-flankierende Sequenzen unter Kontrolle des Lektinpromotors nicht möglich war (Hellberg et al., 2001), sind somit vermutlich genspezifische 5'- und 3'-flankierende regulatorische "cis-acting" Sequenzen der EhCP5 für die Genexpression notwendig. Über die Genregulation der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* ist zur Zeit bekannt, dass die unter Kulturbedingungen exprimierten Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2, EhCP3, EhCP5, EhCP8 und EhCP9 ein erweitertes TATA-Box Motiv TATTAAACT ca. 35 bp stromaufwärts von der Translations Initiation ATG besitzen. Dieses Motiv ist in den nicht exprimierten Cysteinpeptidasen und in denen, die im Northern-Blot erst nach mehrtägiger Exposition ein Signal geben, nicht vorhanden (Bruchhaus et al., 2003). Weiterhin enthalten Promotoren von *E. histolytica* ein für Eukaryoten untypisches "GAAC"-Element, das für die Zusammensetzung des DNA-Protein-Komplexes notwendig ist und die RNA-Polymerase TATA-Box unabhängig an die in-Region leitet (Singh et al., 1998). Für einen weiteren Pathogenitätsfaktor von *E. histolytica*, wurden bereits cis-acting regulatorische "GAAC"-Elemente nachgewiesen: Das *hgl5*-Gen kodiert für die große Untereinheit des β -D-Galaktose/N-Acetylgalaktosamin spezifischen Adhärenzlektins und ist für die kontaktabhängige Lysis der Zielzelle notwendig. Der Promoter enthält fünf stromaufwärts liegende regulatorische "cis-acting" GAAC-Elemente (Gilchrist et al., 1997; Gilchrist et al., 1998; Gilchrist et al., 2001). Die genauen Gründe, warum die Cysteinpeptidasen EhCP5 und EhCP1 sowie Amoebapore unter Kontrolle des Lektinpromotors nicht exprimiert werden konnten (Hellberg et al., 2001) bleiben allerdings weiterhin im Dunkeln. Es könnte durchaus möglich sein, dass die Cysteinpeptidase EhCP1 und Amoebapore - ebenso wie die Cysteinpeptidase EhCP5 - unter Kontrolle von 3'- und 5'-flankierenden Sequenzen überexprimiert werden können.

4.1.2 Die Cysteinpeptidase EhCP5 ist vermutlich an der Prozessierung weiterer Peptidasen von *E. histolytica* beteiligt

Im Aktivitätstest mit Z-Arg-Arg-pNA als spezifisches Substrat konnte die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. histolytica* um ca. Faktor fünf nachgewiesen werden (siehe 3.1). Um genauere Informationen zu erhalten wurden Substrat-SDS-PAGE Untersuchungen (siehe 3.2.2) und Western-Blot Analysen (siehe 3.2.3) durchgeführt.

In der Literatur gibt es viele Hinweise auf Cysteinpeptidasen von *E. histolytica*, die auf Substrat-SDS-PAGE Untersuchungen beruhen (Lushbaugh et al., 1985; Scholze et al., 1988; Reed et al., 1989; Ostoa-Saloma et al., 1989; Avila et al., 1993; Spice et al., 1993; Navarro-Garcia et al., 1995; Serrano et al., 1996; Temesvari et al., 1999). Die Peptidasemuster der Substratgele der meisten Studien stimmen relativ gut überein, wobei das Muster über 50 kDa variiert (Ostoa-Saloma et al., 1989; Spice et al., 1993; Navarro-Garcia et al., 1995; Serrano et al., 1996; Leon et al., 1997). Der Verdau der im 12%igen SDS-Gel copolymerisierten Gelatine im Bereich um 48 kDa konnte der Aktivität der Cysteinpeptidase EhCP1, der Verdau bei ca. 35 kDa konnte der Aktivität der Cysteinpeptidase EhCP2 zugeordnet werden (Hellberg et al., 2000). Rekombinant exprimierte EhCP5 ist im Bereich von 28,4 kDa aktiv (Hellberg et al., 2002).

Für Zellextrakte aus pNeoEhCP5-TOPO transfizierten *E. histolytica* war in den Größenbereichen 25, 28, 35, und 51 kDa eine – im Vergleich zu Kontrolleextrakten aus pNeoBox transfizierten Trophozoiten – gleichmäßige Zunahme der proteolytischen Aktivität zu beobachten (siehe Abb. 8). Demgegenüber beschränkte sich die Erhöhung der proteolytischen Aktivität zusätzlich angefertigter Kontrolleextrakte aus pNeoEhCP2 transfizierten Trophozoiten auf den Größenbereich um 35 kDa (siehe Abb. 8).

Da die Größen der verstärkt aufgetretenen Banden im Zymogramm denen von EhCP1 und EhCP2 entsprachen (Hellberg et al., 2000) wurden Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen EhCP1 und EhCP2 durchgeführt (siehe 3.2.3). Im Western Blot mit Zellextrakten pNeoEhCP5-TOPO transfizierter *E. histolytica* wurden größere Mengen der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 mit spezifischen Antikörpern detektiert (siehe Abb. 9). Der Größenbereich um 35 kDa entspricht somit offensichtlich der Aktivität der Cysteinpeptidase EhCP2, der um 51 kDa wahrscheinlich der Aktivität der Cysteinpeptidase EhCP1 (Hellberg et al., 2000). Die Differenz für die Cysteinpeptidase EhCP1 im Bereich von 51 kDa zu den Versuchen von Hellberg et al. ergeben sich vermutlich aus der Zusammensetzung der Substrat-SDS-Gele (Ostoa-Saloma et al., 1989; Spice et al., 1993; Hellberg et al., 2000).

Die Aktivitäten, in den Größenbereichen 25 kDa und 28 kDa sind vermutlich der Cysteinpeptidase EhCP5 zuzuordnen (Hellberg et al., 2002). Ob sich eine weitere durch die Cysteinpeptidase EhCP5 aktivierte Cysteinpeptidase hinter diesen Aktivitäten verbirgt ist unbekannt.

Um eine Schädigung der Zelle durch Cysteinpeptidasen auszuschließen, wird die proteolytische Aktivität *in vivo* strikt reguliert. Dies wird durch Veränderung der Syntheserate sowie – auf posttranslationalem Wege – durch endogene Inhibitoren, Aktivierung von Zymodemen und Veränderung der Abbaurate erreicht (Hooper 2002). Cysteinpeptidasen werden als inaktive Vorläuferproteine, die aus einem Signalpeptid (Präpeptid) und einem Propeptid bestehen, gebildet (Rawlings et al., 1994). Für Papain und Cathepsin B konnte gezeigt werden, dass die Propeptide als starke, reversible Inhibitoren der muren Enzyme fungieren (Fox et al., 1992; Taylor et al., 1995), indem sie die Substratbindungstasche in entgegen gesetzter Orientierung zum Substrat binden (Turk et al., 1996; Cygler et al., 1996). Das Propeptid gewährleistet die korrekte Faltung des Enzyms und das Verbleiben im inaktiven Zustand. Zur Erlangung enzymatischer Aktivität muss das Propeptid abgespalten werden. Die Aktivierung der Cysteinpeptidasen kann durch intermolekulare Wechselwirkung oder Autokatalyse zustande kommen (Eakin et al., 1992; Taylor et al., 1992; Sanderson et al., 2000). Für die rekombinant exprimierte Cysteinpeptidase EhCP5 wurde bereits die autokatalytische posttranslationale Prozessierung zum aktiven Enzym *in vitro* nachgewiesen (Hellberg et al., 2002).

Im Northern-Blot mit RNA aus pNeoEhCP5-TOPO transfizierten Amöben wurden die Transkripte für die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 nicht vermehrt nachgewiesen (siehe Abb. 7). Somit haben vermutlich posttranslationale Modifikationen durch die Cysteinpeptidase EhCP5 zu dem veränderten Aktivitätsniveau der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 (siehe 3.2.1 und Abb. 8) geführt. Weiterhin könnten durch die posttranslationale Modifikation der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 Epitope für die jeweiligen Antikörper zugänglich gemacht worden sein, was zum vermehrten Nachweise im Western-Blot führte (siehe Abb. 9).

Anhand der obig dargestellten Ergebnisse wurde gezeigt, dass die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 vermutlich durch die Cysteinpeptidase EhCP5 prozessiert werden und die Regulation auf posttranslatonaler Ebene durch intermolekulare Wechselwirkungen erfolgt. Die Eingangs erwähnte Erhöhung der proteolytischen Aktivität um ca. Faktor fünf (siehe 3.2.1) lässt sich somit nicht nur der Aktivität der überexprimierten EhCP5 zuordnen, sondern beruht auch auf der Aktivität der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2.

Ankri et al. beobachteten, dass die Hemmung der Cysteinpeptidase EhCP5 durch "Antisense"-Konstrukte die gesamte proteolytische Aktivität der Amöben um ca. 90% verringerte und das in Gelatine SDS-Gelen die Aktivitäten weiterer Cysteinpeptidasen gehemmt wurden (Ankri et al., 1998; Ankri et al., 1999b). Da die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 für ca. 90% der proteolytischen Aktivität von *E. histolytica* verantwortlich sind (Bruchhaus et al., 1996) und die Cysteinpeptidase EhCP5 die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 anscheinend posttranslational aktiviert (siehe Abb. 7, Abb. 8 und Abb. 9), werden die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse durch die obig aufgeführten Arbeiten von Ankri et al. und Bruchhaus et al. erhärtet.

Die Interpretation von Ankri et al. war, dass die proteolytische Aktivität durch eine verminderte Translation weiterer Cysteinpeptidasen durch die *ehcp5*- "Antisense"-Konstrukte zustande kam (Ankri et al., 1998; Ankri et al., 1999b).

Diese Interpretation muss mit den erlangten Ergebnissen in Frage gestellt werden. Dem Mechanismus, auf dem die vermeintliche "Antisense"-Hemmung weiterer Cysteinpeptidasen beruht, liegt wahrscheinlich nicht eine verminderte Translation von Cysteinpeptidasen, sondern die fehlende posttranslationale Aktivierung der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 durch die Cysteinpeptidase EhCP5 zugrunde.

Weiterhin spricht gegen die Interpretation von Ankri et al., dass die Nukleotidsequenzen der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 zur Cysteinpeptidase EhCP5 nur zu ca. 50% sequenzhomolog sind (Bruchhaus et al., 1996), so dass eine Antisense Hemmung – wie bereits von Hellberg et al. beschrieben - unwahrscheinlich erscheint (Hellberg et al., 2001).

Im Northern-Blot wurde gezeigt, dass der Promotor der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. dispar* funktionell aktiv ist (siehe Abb. 7). Demgegenüber konnte in Zellextrakten NeoEhCP5 transfizierter *E. dispar* die Cysteinpeptidase EhCP5 im Western-Blot nicht nachgewiesen werden (siehe 3.2.3) und die Zellen waren dementsprechend nicht in der Lage, eine aktive Cysteinpeptidase EhCP5 zu exprimieren (siehe 3.2.1 und 3.2.2). Im Gegensatz zur Cysteinpeptidase EhCP5 war es möglich die Cysteinpeptidase EhCP2 unter Kontrolle des Lektinpromotors funktionell in *E. dispar* überzuexprimieren (Hellberg et al., 2001). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ein intaktes Gen für die Cysteinpeptidase EhCP5 nicht mehr in *E. dispar* vorkommt (Willhoeft et al., 1999b), während ein Gen für die EhCP2 mit 96% Sequenzhomologie vorhanden ist (Bruchhaus et al., 1996).

Die genauen Gründe für die Unterschiede in der Genexpression der beiden Cysteinpeptidasen in *E. dispar* und *E. histolytica* bleiben allerdings unklar.

4.1.3 Einfluss der Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 auf die Pathogenität der Amöben

Um den Einfluss der Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 auf die Pathogenität der Amöben *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen wurden verschiedene Modelle gewählt.

4.1.3.1 Versuche zur *in vitro* Pathogenität NeoEhCP5 transfizierter *E. histolytica* (Cytopathische Eigenschaften / Erythrophagozytose / Hämolyse)

Die Zerstörung eines Zellrasens dient der Beurteilung der cytopathischen Eigenschaften der Amöben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cytopathischen Eigenschaften im CHO-Test mit Zellextrakten und viablen Amöben untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Trophozoitenextrakte aus pNeoEhCP5-TOPO transfizierten *E. histolytica* als auch viable

pNeoEhCP5-TOPO transfizierte Trophozoiten einen signifikant erhöhten cytopathischen Effekt aufwiesen (siehe Abb. 10).

Es gibt bereits einige Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* auf die Zerstörung von Zellrasen. Die Hemmung der proteolytischen Aktivität durch Cysteinpeptidaseinhibitoren oder "Antisense"-Versuche führte bei Verwendung von Trophozoitenextrakten zur vollständigen Hemmung und bei Verwendung von intakten Trophozoiten nur zum teilweisen Verlust der cytopathischen Eigenschaften (Ankri et al., 1998; Hellberg et al., 2001). Um den Einfluss weiterer Faktoren auf den cytopathischen Effekt zu untersuchen, wurde die Expression von Amöbapore und des Adhärenzlektins durch "Antisense" RNA inhibiert. In diesen Versuchen wurde eine Reduktion des cytopathischen Effektes beobachtet (Bracha et al., 1999; Ankri et al., 1999a). Aus den obig erwähnten Arbeiten kann geschlossen werden, dass es sich beim cytopathischen Effekt um einen multifaktoriellen Prozess handelt, für den sowohl Cysteinpeptidasen als auch Amöbapore und das Adhärenzlektin verantwortlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der Zerstörung von CHO Zellrasen gezeigt, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 maßgeblich am cytopathischen Effekt beteiligt ist (siehe Abb. 10). In Versuchen mit 100 µg Zellextrakt wurde für pNeoEhCP5-TOPO transfizierte *E. histolytica* eine 100%ige Zellrasenzerstörung, für die Kontrollzellen erst ab 200 µg Zellextrakt eine ca. 50%ige Zerstörung des CHO-Zellrasens gemessen (siehe Abb. 10). Hieraus resultiert ein mindestens vierfacher cytopathischer Effekt durch die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5. Somit besteht tendenziell ein Zusammenhang zwischen der Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 um Faktor 5 und dem Cytopathischen Effekt von mindestens Faktor 4. Da durch die Cysteinpeptidase EhCP5 vermutlich weitere Cysteinpeptidasen posttranslational aktiviert wurden (siehe Abb. 7, Abb. 8 und Abb. 9), kann dieser Effekt allerdings nicht alleinig der Cysteinpeptidase EhCP5 zugeschrieben werden.

Im Gegensatz zu Versuchen mit Zellextrakten war der cytopathische Effekt in Versuchen mit intakten Trophozoiten weniger ausgeprägt und betrug ca. Faktor 1,5 – 2 (siehe Abb. 10). Vermutlich beruht der cytopathische Effekt bei Verwendung intakter Trophozoiten - zusätzlich zur proteolytischen Aktivität – auf der zellkontaktabhängigen Lyse der Zielzellen, die über das β -D-Galaktose/N-Acetylgalaktosamin-spezifische Adhärenzlektin (Petri, Jr. et al., 1987; Mann et al., 1991; Tannich et al., 1991b; Tannich et al., 1992) und porenbildende Peptide (Young et al., 1982; Leippe et al., 1991; Leippe et al., 1994; Leippe 1997) vermittelt werden.

Die cytopathische Aktivität der Amöben spielt wahrscheinlich bei der Besiedlung des Darms und der Wanderung der Trophozoiten von *E. histolytica* durch das Bindegewebe eine Rolle. Sowohl *E. histolytica* als auch *E. dispar* sind auf eine Interaktion mit dem Darmepithel angewiesen, um eine Ausscheidung der Trophozoiten zu verhindern. Die Unterschiede in der proteolytischen Aktivität – hier insbesondere die Unterschiede im Vorhandensein von EhCP1 und EhCP5 – sind vermutlich für die Gewebsinvasion von *E. histolytica* entscheidend.

Für Trophozoiten von *E. histolytica* wurde bereits gezeigt, dass eine drastische Reduktion der Gesamtcysteinpeptidaseaktivität eine erheblich verringerte Entzündungsreaktion bzw. Schädigung der Mukosa hervorruft (Zhang et al., 2000).

Ein Zusammenhang zwischen der proteolytischen Aktivität und der Zerstörung von Zellrasen wurde auch für weitere Organismen wie z.B. *Trichomonas vaginalis* (Alvarez-Sanchez et al., 2000) und *Streptococcus pyogenes* (Kapur et al., 1993) beschrieben. In Zellextrakten von *Aspergillus fumigatus* sind Serinpeptidasen *in vitro* ebenfalls zum Ablösen von Zellen befähigt (Tomee et al., 1997). Vermutlich stellt dies eine wichtige Eigenschaft pathogener Pilze zum Überwinden der physikalischen Barriere des Epitheliums dar.

Neben der Zerstörung von Zellverbänden ist die Phagozytose von Zielzellen ein weiteres wichtiges Kriterium für die Pathogenität von *E. histolytica* und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. In der Literatur werden - wie für die cytopathischen Eigenschaften - auch für die Erythrophagozytose nicht kongruente Ergebnisse gefunden.

Tsutsumi konnte in *in vivo* Untersuchungen keine Korrelation zwischen der Erythrophagozytose und der Pathogenität der Amöben nachweisen (Tsutsumi et al., 1992). In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass obwohl die Verwendung von Cysteinpeptidaseinhibitoren keinen Einfluss auf die Phagozytose von Bakterien und Erythrozyten hatte (Montfort et al., 1993; Ghosh et al., 1997), die Inhibition der Cysteinpeptidasen mittels Expression von Antisense-RNA zu einer verringerten Erythrophagozytose von Trophozoiten von *E. histolytica* führte (Ankri et al., 1998). Verwunderlich erscheint hierbei, dass die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP2 demgegenüber zu einer verminderten Erythrophagozytose führt (Hellberg et al., 2001).

Die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 führte zu einer um 35% verminderten Erythrophagozytose (siehe 3.2.4.2) und geht somit mit der Arbeit von Hellberg et al. konform. Während EhCP2 transfizierte Zellen eine deutlich erniedrigte Hämolyse zeigten (Hellberg et al., 2001), hatte die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 keinerlei Einfluss auf die hämolytischen Eigenschaften von *E. histolytica*.

4.1.3.2 Bildung von Amöbenleberabszessen in Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*)

Versuche zur *in vivo* Pathogenität der Amöben sind von großer Bedeutung, um den Einfluss der einzelnen Cysteinpeptidasen auf die Pathogenität der Trophozoiten zu messen.

Es gibt bislang viele Hinweise für den Einfluss der Cysteinpeptidasen auf die Pathogenität der Amöben. Ein wichtiges Indiz ist, dass der nicht pathogene Kommensale *E. dispar* proteolytisch weniger aktiv als *E. histolytica* ist und das weniger Gene, die für Cysteinpeptidasen codieren, in *E. dispar* nachgewiesen wurden (Tannich et al., 1991c; Bruchhaus et al., 1996; Bruchhaus et al., 2003). Weiterhin ist bekannt, dass die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* an der Zerstörung der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Luaces et al., 1988; Schulte et al., 1989). Die Virulenz der Amöben korreliert direkt mit

der proteolytischen Aktivität der jeweiligen Zellextrakte (Gadasi et al., 1983a; Lushbaugh et al., 1985; Keene et al., 1990) und die Amöbenleberabszessbildung wird durch Cysteinpeptidaseinhibitoren (Stanley, Jr. et al., 1995), Laminin (Li et al., 1995) und die Inhibition der Cysteinpeptidase EhCP5 durch "Antisense" RNA (Ankri et al., 1999b) unterbunden. Weiterhin wurde bereits berichtet, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 an der Entzündungsreaktion von "SCID-Xenograft-cells" beteiligt ist (Zhang et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Überexpression der EhCP5 im Tiermodell untersucht werden. Hierzu wurden transfizierte Trophozoiten in die Leber von Wüstenrennmäusen injiziert. Der Versuch wurde – wie unter 2.28 beschrieben – freundlicherweise von Dr. Hannelore Lotter durchgeführt.

In mit pNeoEhCP5-TOPO transfizierten *E. histolytica* infizierten *Meriones unguiculatus* wurde signifikant mehr Abszessgewebe in der Leber gebildet, als in Tieren der Kontrollgruppe (siehe 3.2.4.3).

Demgegenüber wurde für die Cysteinpeptidase EhCP2 festgestellt, dass sie eine untergeordnete Rolle für die Amöbenleberabszessbildung spielt (Olivos-Garcia et al., 2003) und die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP2 um ca. Faktor 7 zu keiner vermehrten Amöbenleberabszessbildung führt (Hellberg et al., 2001). Ein weiteres Indiz dafür, dass die Cysteinpeptidase EhCP2 eine untergeordnete Rolle für die Pathogenität von *E. histolytica* spielt ist die Tatsache, dass eine zu 96,4% homologe Cysteinpeptidase EdCP2 auch im nicht pathogenen Kommensalen *E. dispar* exprimiert wird (Bruchhaus et al., 1996; Bruchhaus et al., 2003).

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 vermutlich die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 posttranslational aktiviert. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass vielleicht weitere Cysteinpeptidasen durch die EhCP5 aktiviert werden und an der Amöbenleberabszessbildung beteiligt sind. Weiterhin ist nicht bekannt, ob für die Invasion *in vivo* weitere Cysteinpeptidasen benötigt werden. Die Unterschiede in der proteolytischen Aktivität und der Fähigkeit von *E. histolytica* und *E. dispar* Gewebe zu zerstören, scheinen somit primär auf die Aktivität der Cysteinpeptidasen EhCP5 und EhCP1 zurückzuführen zu sein. Die Cysteinpeptidase EhCP1 ist allerdings vermutlich durch Genduplikation aus der Cysteinpeptidase EhCP2 hervorgegangen (Bruchhaus et al., 1996). Da die Cysteinpeptidase EhCP1 zu 87% homolog zur Cysteinpeptidase EhCP2 ist, kann - aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 - vermutet werden, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 einen Hauptpathogenitätsfaktor von *E. histolytica* darstellt.

Fraglich bleibt, aus welchem Grund die Amöben in das Gewebe invadieren, da den Amöben mit der Gewebsinvasion die Möglichkeit zur Verbreitung genommen ist.

4.2 Resistenz von *E. histolytica* gegenüber E-64

In parasitischen Protozoen werden zunehmend Resistenzen gegenüber den zur Zeit gebräuchlichen Medikamenten beobachtet. Cysteinpeptidasen werden als mögliche "drug-targets" in Erwägung gezogen (Selzer et al., 1999; Lecaille et al., 2002).

Es gibt viele Hinweise darauf, dass Cysteinpeptidasen Hauptpathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* darstellen. Von diversen Arbeitsgruppen wurde bereits gezeigt, dass die Hemmung der proteolytischen Aktivität zur Verminderung der Pathogenität *in vivo* führte. In Tiermodellen mit Nagern reduzierte die Behandlung mit E-64 die Bildung von Amöbenleberabszessen (Stanley, Jr. et al., 1995). Laminin blockiert die Substratbindungstasche von Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* und verringerte signifikant die Bildung von Amöbenleberabszessen (Li et al., 1995). Amöben konnten gentechnisch so verändert werden, dass sie nur noch über 10% der proteolytische Aktivität verfügen. Diese Zellen konnten im Tiermodell mit Hamstern keine Abszesse mehr bilden (Ankri et al., 1999b). Somit erscheinen Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* als mögliche "drug-targets" geeignet. Um hierüber weitere Aussagen treffen zu können, wurden Trophozoiten von *E. histolytica* in Gegenwart verschiedener Cysteinpeptidaseinhibitoren kultiviert.

Die Ergebnisse zeigten, dass membranpermeable Cysteinpeptidaseinhibitoren mit einem breiten Substratspektrum für die Amöben unter axenischen Kulturbedingungen immer letal sind (siehe Abb. 13). Weiterhin war es nicht möglich eine Resistenz gegenüber Z-Phe-Ala-DMK, E-64d und HMB zu generieren (siehe 3.3.2), was auf die Wichtigkeit der Cysteinpeptidasen für das Wachstum der Amöben und die Möglichkeiten von Cysteinpeptidaseinhibitoren für die Bekämpfung der Amoebiasis hinweist. Im Gegensatz zu den sehr potenten membrangängigen Inhibitoren ist E-64 weniger toxisch und führte erst in sehr viel höheren Dosierungen zur Stagnation des Wachstums. Nach ca. vier Tagen starben die Trophozoiten ab und in der Zellkultur waren viele Zelltrümmer und wenige intakte Zellen zu erkennen. Erst nach ca. zehn Tagen vermehrten sich vereinzelt Zellen, die kultiviert werden konnten. Diese Zellen waren dazu in der Lage, in Gegenwart von sehr hohen E-64 Dosierungen zu überleben (siehe Abb. 12).

Somit bestand – abhängig von den Eigenschaften des Inhibitors – die Möglichkeit für die Amöben eine Resistenz auszubilden. Zwei Eigenschaften des Inhibitors müssen hierbei unterschieden werden: Zum einen die Affinität des Inhibitors zu den Cysteinpeptidasen des Parasiten, zum anderen die Membranpermeabilität des Inhibitors.

Die Membranpermeabilität von Peptidoxiden kann durch Ersetzen von Agmatin durch eine Alkylgruppe und der Carboxylgruppe durch Ester oder Amid erhöht werden (siehe 1.5.1 und Abb. 1). Die Affinität zum Substrat wird durch die Seitenkette determiniert. Die Affinitäten von E-64 und E-64d zum Substrat sind nahezu identisch. Beide E-64 Derivate unterscheiden sich jedoch in ihrer Membranpermeabilität.

Vermutlich gelangte E-64 – als nicht membranpermeabler Cysteinpeptidaseinhibitor – nicht in sämtliche Zellkompartimente, sondern wurde durch Pinocytose von den Zellen

aufgenommen. Demzufolge wirkte E-64 wahrscheinlich primär auf membranständige Cysteinpeptidasen und Cysteinpeptidasen die in den Phagolysosomen lokalisiert sind. Demgegenüber gelangten die membrangängigen Inhibitoren passiv durch Diffusion in sämtliche Zellkompartimente, wodurch die gesamte proteolytische Aktivität der Zellen innerhalb kürzester Zeit verloren geht. Davon waren vermutlich auch Cysteinpeptidasen sekretorischer Vesikel, die am Prozessieren von Proteinen beteiligt sind, betroffen. Die letztgenannte Funktion der Cysteinpeptidasen könnte für das Wachstum der Amöben von entscheidender Bedeutung sein und die Toxizität der membrangängigen Inhibitoren erklären. Die Resistenz der Amöben war eine stabile Eigenschaft und blieb über einen Zeitraum von mindestens vier Monaten erhalten. Aus diesem Grunde unterscheidet sich die E-64 Resistenz von der *in vitro* induzierten Resistenz gegenüber Metronidazol die nach kurzer Zeit verloren ging (Wassmann et al., 1999).

Anders als alle anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren hatte Z-Phe-Phe-DMK nahezu keinen Effekt auf das Wachstum der Amöben (siehe Abb. 13). Z-Phe-Ala-DMK und Z-Phe-Phe-DMK gehören zur Gruppe der Diazomethylketone. Die Affinität zum Substrat wird über die Dipeptidylgruppe determiniert. Die Substrataffinität von Z-Phe-Ala-DMK ist gegenüber Cysteinpeptidasen mit einer Cathepsin B ähnlichen Spezifität höher als die von Z-Phe-Phe-DMK (Kirschke et al., 1981; Kirschke et al., 1988; Crawford et al., 1988).

Die Substratspezifität von Cathepsin B und Cathepsin L wird durch die Aminosäure 205 (Papainsequenz), die die S2-Bindungsstelle determiniert, festgelegt. Cathepsin B ähnliche Cysteinpeptidasen besitzen in dieser Position gewöhnlich saure Gruppen (Asp o. Glu) (Scholze et al., 1988; Scholze et al., 1994; Jacobs et al., 1998), während in Cathepsin L ähnlichen Cysteinpeptidasen Alanin diese Position einnimmt (Barrett et al., 1998). Die Gesamtstruktur der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* entspricht der von Cathepsin L, die proteolytische Aktivität allerdings der von Cathepsin B. Die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* degradieren das für Cathepsin B typische Substrat Z-Arg-Arg-pNA (Hellberg et al., 2001).

Keine der Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* besitzen Alanin in Position 205, aber sieben Cysteinpeptidasen besitzen Aspartat in Position 205. Aus diesem Grunde hat Z-Phe-Phe-DMK eine sehr viel niedrigere Affinität zu den Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* als Z-Phe-Ala-DMK (siehe 3.3.3) und folglich keine Auswirkung auf die EC₅₀ der Amöben. Weiterhin ist in der Substrat SDS-PAGE zu erkennen, dass sämtliche Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* in gleichem Maße durch Z-Phe-Ala-DMK vollständig und durch Z-Phe-Phe-DMK nur teilweise gehemmt wurden (siehe Abb. 14).

Für die Cysteinpeptidase EhCP5 wurde beschrieben, dass sie – anders als EhCP1 und EhCP2 – nicht durch Interaktion an Bacitracin Säulen chromatographisch gereinigt werden konnte (Hellberg et al., 2000). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die aktiven Zentren dieser Cysteinpeptidasen unterscheiden. Aus dem Vergleich der modellierten dreidimensionalen Strukturen von EhCP1 und EhCP5 (Jacobs et al., 1998) ist ersichtlich, dass die

Substratbindungsstelle der Cysteinpeptidase EhCP5 hydrophober ist, als die der Cysteinpeptidase EhCP1 (Hellberg et al., 2000).

Mittels Kationenaustauschchromatographie können Cathepsin B und Cathepsin L voneinander getrennt werden. Nur Cathepsin L bindet an eine entsprechende Matrix. Einen weiteren Hinweis darauf, dass sich die Cysteinpeptidasen EhCP5 und EhCP1 / EhCP2 in ihrem aktiven Zentrum unterscheiden bringt die Beobachtung, dass sich die Cysteinpeptidase EhCP5 an einer Kationenaustauschsäule von den Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 getrennt werden konnte (Bruchhaus et al., 1996). Die Substratbindungstaschen der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 sind untereinander konserviert. Die Substratbindungstasche der Cysteinpeptidase EhCP5 ist durch andere Aminosäuren ausgekleidet, von denen einige mit denen von Cathepsin L übereinstimmen. Diese Besonderheiten der Cysteinpeptidase EhCP5 machten sich im Zymogramm allerdings nicht bemerkbar (siehe Abb. 14). Die Aktivitäten sämtlicher Banden war in ähnlicher Weise durch die Diazomethylketone Z-Phe-Ala-DMK und Z-Phe-Phe-DMK beeinflusst und es war nicht möglich die Cysteinpeptidase EhCP5 im Zymogramm zu identifizieren.

Demgegenüber wurde für Cysteinpeptidasen von *Trichomonas vaginalis* und *Tritrichomonas foetus* unterschiedliche Affinitäten gegenüber verschiedenen Substraten und Inhibitoren nachgewiesen. Die Cysteinpeptidasen von *T. vaginalis* ließen sich anhand ihrer Substratspezifität in drei Gruppen einordnen. Die unterschiedliche Substratspezifität spiegelte sich in einer unterschiedlichen Sensitivität der Cysteinpeptidasen gegenüber verschiedenen Inhibitoren wieder. Andererseits konnten sämtliche Cysteinpeptidasen von *T. foetus* Z-Arg-Arg-NHMec degradieren und variierten in der Spezifität gegenüber weiteren Substraten und Inhibitoren. Z-Phe-Ala-DMK und Z-Phe-Phe-DMK waren relativ schlechte Inhibitoren. Somit sind die Cysteinpeptidasen von *T. vaginalis* und *T. foetus* – im Gegensatz zu den Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* – bezüglich ihrer Spezifität sehr heterogen (North 1994).

Da sich die hauptsächlich exprimierten Cysteinpeptidasen in ihrem Substratspektrum nicht unterscheiden, kann mit einem hochspezifischen Inhibitor gegenüber Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* nahezu die gesamte proteolytische Aktivität des Parasiten gehemmt werden. In den Versuchen von Ankri et al. wurde gezeigt, dass für das Wachstum von *E. histolytica in vitro* eine proteolytische Aktivität von nur 10% ausreicht (Ankri et al., 1998). Diese Zellen waren aber nicht mehr in der Lage Amöbenleberabszesse zu bilden (Ankri et al., 1999b). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde gezeigt, dass die Amöben, wenn die proteolytische Aktivität vollständig gehemmt wurde, nicht mehr in der Lage waren zu wachsen (siehe Abb. 12 und Abb. 13). Somit ist die proteolytische Aktivität für das Überleben der Trophozoiten *in vitro* notwendig. Nur resistente Zellen können sich trotz vollständiger Hemmung der proteolytischen Aktivität mit gleicher Teilungsrate wie ohne Inhibitor vermehren.

Von besonderem Interesse ist, dass die rekombinant exprimierte Cysteinpeptidase EhCP5 durch die irreversiblen Cysteinpeptidaseinhibitoren K11002 und K11777 gehemmt wird

(Hellberg et al., 2002). Für diese Inhibitoren wurde bereits nachgewiesen, dass sie *Leishmania major in vitro* abtöten, ohne Wirtszellen zu schädigen (Selzer et al., 1999).

Eine Vielzahl von Resistenzmechanismen gegenüber verschiedenen Medikamenten konnte in den letzten Jahren in Parasiten beobachtet werden. Eine Resistenz kann zur verminderten Aufnahme oder zur vermehrten Sezernierung der Chemotherapeutika führen. Weitere Resistenzmechanismen sind die Veränderung des durch Chemotherapeutika betroffenen Enzyms, woraus eine verminderte Bindung führt, sowie die verminderte Aktivierung der durch die Chemotherapeutika betroffener Proteine (Borst et al., 1995; Cowman 1995; Barrett et al., 1999; Perez-Victoria et al., 2002).

Die Amöben scheinen erstaunlicherweise genau das Gegenteil zu machen. In Northern-Blot Analysen wurde nachgewiesen, dass sowohl resistente als auch nicht resistente Amöben in Gegenwart von E-64 vermehrt Transkripte für die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 bilden (siehe Abb. 19). Vermutlich versuchen die Amöben, die proteolytische Aktivität durch vermehrte Expression von Cysteinpeptidasegenen wieder herzustellen. Weiterhin beruhte der Resistenzmechanismus nicht auf einer Veränderung der betroffenen Enzyme, da die proteolytische Aktivität sowohl in resistenten als auch in nicht resistenten Zellen durch Cysteinpeptidaseinhibitoren vollständig inhibiert war (siehe Abb. 15).

In diesem Zusammenhang sei der kürzlich im Detail aufgeklärte Resistenzmechanismus von *Trypanosoma cruzi* gegenüber Cysteinpeptidaseinhibitoren erwähnt. Die Hemmung der proteolytischen Aktivität ist für *T. cruzi* tödlich, da die Prozessierung der Cysteinpeptidasen des Parasiten unterbunden wird. Dies führt zur Anreicherung nicht prozessierter Proteine im Golgi-Apparat woraufhin der Proteintransport unterbrochen wird (Engel et al., 1998b). In Cysteinpeptidaseinhibitor resistenten *T. cruzi* war der sekretorische Stoffwechselweg demgegenüber hochreguliert. In transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde beobachtet, dass unprozessierte Proformen von Cruzain in Vesikeln zu den Flagellartaschen transportiert und im Bereich der Flagellartaschen sezerniert wurden (Engel et al., 2000).

In ganz ähnlicher Weise waren Amöben in Gegenwart von E-64 nicht mehr in der Lage Cysteinpeptidasen zu prozessieren. In Western-Blot Untersuchungen wurde für die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 ein "Shift" zu einer höheren molekularen Masse beobachtet, wenn die Amöben in Gegenwart von E-64 kultiviert wurden (siehe Abb. 16). Weiterhin konnte in der 2D-SDS-PAGE mit Zellextrakten aus Trophozoiten, die in Gegenwart von E-64 kultiviert wurden, Spots beobachtet werden, deren zugehörige Peptidmassen mit den theoretischen Peptidmassen der Prodomäne der EhCP1 und EhCP2 übereinstimmten (siehe Abb. 17). Für Spots, die in Abwesenheit des Inhibitors auftraten, wurden ausschließlich Peptidbereiche der maturen Form gefunden. An dieser Stelle sei daran erinnert, dass die autokatalytische Aktivierung der Cysteinpeptidase EhCP5 bereits *in vitro* nachgewiesen wurde (Hellberg et al., 2002) und dass die Cysteinpeptidase EhCP5 für Prozessierung der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 vermutlich notwendig ist ((siehe

Abb. 7, Abb. 8 und Abb. 9) in Verbindung mit (Ankri et al., 1998)). Die autokatalytische Aktivierung der EhCP5 und die vermutete intermolekulare Aktivierung der Cysteinpeptidase EhCP1 und EhCP2 durch die Cysteinpeptidase EhCP5 waren somit in Gegenwart von E-64 nicht mehr möglich. Resistente Amöben waren aber dazu in der Lage, nicht prozessierte Proformen der Cysteinpeptidasen zu sezernieren (siehe Abb. 23). In diesem Zusammenhang sei auf eine Beobachtung in der 2D-SDS-PAGE verwiesen. Die Intensitäten der Spots Nr. 1 und 2 sind – bei Kultivierung der Amöben mit E-64 – für die beiden Zellpopulationen unterschiedlich groß. In Gelen, die mit Extrakten aus sensitiven Zellen angefertigt wurden, sind diese Spots sehr viel deutlicher zu erkennen als in Gelen, die mit Extrakten aus resistenten Zellen angefertigt wurden (siehe Abb. 17). Die 2D-SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung lässt keine exakte Quantifizierung zu. Dennoch untermauert diese Beobachtung die Vermutung, die auf dem Western-Blot (siehe Abb. 16) und dem Sezernierungsversuch (siehe Abb. 23) beruht: Vermutlich sezernieren resistente Zellen Cysteinpeptidasen, so dass während der Kulturführung ohne E-64 (vor Dosierung) gebildete, prozessierte Cysteinpeptidasen in diesen Zellen nicht mehr vorhanden sind. Weiterhin dünnen sich die gebildeten, prozessierten Cysteinpeptidasen während der längerfristigen Kulturführung mit E-64 vermutlich durch die Vermehrung der Zellen aus. Demgegenüber treten in sensitiven Zellen diese prozessierten Cysteinpeptidasen abundant auf, sind aber funktionell nicht mehr aktiv (siehe Abb. 15), da sie durch E-64 irreversibel gehemmt werden. Im Gegensatz zu *T. cruzi* (Engel et al., 2000) konnte in resistenten *E. histolytica* in transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen kein vermehrtes Auftreten sekretorischer Vesikel beobachtet werden. Hier wären weitere Studien notwendig, um herauszufinden, ob die Anzahl sekretorischer Vesikel in resistenten Amöben zunimmt. Aufgrund der Zellstruktur von *E. histolytica* ist es allerdings schwieriger als in *T. cruzi* hierüber Aussagen zu treffen. Die einzige offensichtliche ultrastrukturelle Veränderung, war die Bildung von abundant auftretenden fibrillären Strukturen in Zellen, die in Gegenwart von E-64 wuchsen (siehe Abb. 20). Mit Antikörpern gegen Aktin wurde gezeigt, dass diese Strukturen nicht Aktin zuzurechnen sind. In den ultrastrukturellen Aufnahmen waren wiederum keine Unterschiede zwischen resistenten und nicht resistenten Zellen zu beobachten.

Auf der anderen Seite unterscheidet sich die Resistenz der Amöben von der Resistenz der Trypanosomen insofern, als die Amöben sehr schnell in TY-Medium isoliert werden konnten, aber nicht gegenüber anderen Inhibitoren kreuzresistent waren (siehe 3.3.1 und Abb. 13). Im Gegensatz dazu hat es ein Jahr gedauert um Cysteinpeptidaseinhibitor resistente *T. cruzi* zu generieren. Hierzu musste die Konzentration des Cysteinpeptidaseinhibitors schrittweise erhöht werden. Des Weiteren waren die Trypanosomen gegenüber vier weiteren Cysteinpeptidaseinhibitoren kreuzresistent (Engel et al., 2000).

Von besonderem Interesse war die Frage nach der Pathogenität E-64 resistenter Amöben. Um hierüber eine Aussage treffen zu können, wurden Tests zur *in vitro* und *in vivo* Pathogenität durchgeführt. Die *in vitro* Pathogenität resistenter Amöben wurde im Cytopathogenitätstest

mit Trophozitenextrakten und viablen Trophoziten untersucht. In diesen Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen resistenten und nicht resistenten Amöben festgestellt werden (siehe 3.3.9.1).

Der größte Unterschied zwischen resistenten und nicht resistenten Amöben war in der Bildung von Amöbenleberabszessen im Tiermodell zu beobachten (siehe 3.3.9.2). In Übereinstimmung mit früheren Studien führte die Präinkubation von Trophoziten mit E-64 zu einer verminderten Amöbenleberabszessbildung, inhibierte die Bildung von Amöbenleberabszessen jedoch nicht vollständig (Stanley, Jr. et al., 1995). Im Gegensatz dazu war die Bildung von Amöbenleberabszessen durch E-64 resistente Zellen die in Abwesenheit von E-64 wuchsen, in sieben von acht Tieren signifikant reduziert (siehe Abb. 22).

Somit scheinen Cysteinpeptidaseinhibitoren für die Behandlung der Amoebiasis geeignet. Insbesondere die obig erwähnten Inhibitoren K11002 und K11777 für die bereits nachgewiesen wurde, dass sie *Leishmania major in vitro* abtöten, ohne Wirtszellen zu schädigen (Selzer et al., 1999), lassen vermuten, dass Cysteinpeptidaseinhibitoren neue Behandlungswege eröffnen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Cysteinpeptidasen EhCP1, EhCP2 und EhCP5 sind für ca. 90% der proteolytischen Aktivität der Amöben verantwortlich. Aufgrund der Membranassoziation der EhCP5, dem Fehlen von EhCP1 und EhCP5 in *E. dispar* und der hohen Sequenzübereinstimmung der Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 ist zu vermuten, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 einen Hauptpathogenitätsfaktor der Amöben darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion der Cysteinpeptidase EhCP5 im Hinblick auf die proteolytische Aktivität und Pathogenität von *E. histolytica* näher untersucht. Dabei gelang erstmalig eine Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 in *E. histolytica*.

In Aktivitätstests mit spezifischen Substraten für die Cysteinpeptidasen von *E. histolytica* war die proteolytische Aktivität EhCP5 überexprimierender *E. histolytica* um ca. Faktor fünf gesteigert. Die Zunahme der Aktivität konnte sowohl der Cysteinpeptidase EhCP5 als auch den Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 zugeordnet werden. Aus den Ergebnissen ist zu schließen, dass die Cysteinpeptidase EhCP5 vermutlich die Cysteinpeptidasen EhCP1 und EhCP2 prozessiert.

Weiterhin wurde die Pathogenität der EhCP5 überexprimierenden Zellen *in vitro* untersucht. Dabei war die Cytopathogenität der Trophozoiten um den Faktor 1,5 bis 2 erhöht, die der Zellextrakte demgegenüber um den Faktor 4 gesteigert. Die Erythrophagozytose war dagegen um 35% vermindert. Die hämolytischen Eigenschaften waren nicht beeinflusst.

Eine signifikante Erhöhung der Amöbenleberabszessbildung durch die Überexpression der Cysteinpeptidase EhCP5 konnte ebenfalls gezeigt werden. Dies zeigt somit die wichtige Bedeutung der Cysteinpeptidase EhCP5 als Pathogenitätsfaktor von *E. histolytica*.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Resistenzentwicklung durch den Cysteinpeptidaseinhibitor E-64 studiert. Dabei wurden E-64 resistente *E. histolytica* generiert, die in Gegenwart von E-64 keine proteolytische Aktivität mehr aufweisen, sich aber mit gleicher Wachstumsrate vermehren wie in Abwesenheit von E-64. Die Zellen wiesen keine Kreuzresistenz gegenüber membrangängigen Cysteinpeptidaseinhibitoren auf.

Von besonderem Interesse war die Frage nach der Pathogenität der Zellen *in vivo* und *in vitro*. Die cytopathischen Eigenschaften der Zellen unterschieden sich nicht von Wild-Typ Zellen. Demgegenüber war die Bildung von Amöbenleberabszessen durch resistente Zellen auch in Abwesenheit des Inhibitors signifikant verringert. Weiterhin gab es Hinweise darauf, dass resistente Zellen nicht prozessierte Cysteinpeptidasen sezernieren können. Vermutlich reichern sich nicht prozessierte Cysteinpeptidasen in nicht resistenten Zellen an, was das Absterben der Trophozoiten auslösen könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Cysteinpeptidasen entscheidend für die Pathogenität von *E. histolytica* sind. Resistente Zellen sind aber durchaus dazu in der Lage, *in vitro* unter Kulturbedingungen ohne proteolytische Aktivität zu überleben.

Die Pathogenität von *E. histolytica* ist vermutlich ein multifaktorieller Prozess, an dem die Cysteinpeptidasen – insbesondere EhCP5 – einen bedeutenden Anteil haben.

6 LITERATUR

- Alvarez-Sanchez, M. E., Avila-Gonzalez, L., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Ortega-Lopez, J., and Arroyo, R. (2000). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb.Pathog.* 28, 193-202.
- Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U., and Mirelman, D. (1999a). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol.Microbiol.* 33, 327-337.
- Ankri, S., Stolarsky, T., Bracha, R., Padilla-Vaca, F., and Mirelman, D. (1999b). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. *Infect.Immun.* 67, 421-422.
- Ankri, S., Stolarsky, T., and Mirelman, D. (1998). Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *Mol.Microbiol.* 28, 777-785.
- Arhets, P., Olivo, J. C., Gounon, P., Sansonetti, P., and Guillen, N. (1998). Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biol.Cell* 9, 1537-1547.
- Ashall, F., Angliker, H., and Shaw, E. (1990). Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 170, 923-929.
- Avila, E. E. and Calderon, J. (1993). *Entamoeba histolytica* trophozoites: a surface-associated cysteine protease. *Exp.Parasitol.* 76, 232-241.
- Baker, B. F. and Monia, B. P. (1999). Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim.Biophys.Acta* 1489, 3-18.
- Banuelos, C., Orozco, E., Gomez, C., Gonzalez, A., Medel, O., Mendoza, L., and Perez, D. G. (2002). Cellular location and function of the P-glycoproteins (EhPgps) in *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant trophozoites. *Microb.Drug Resist.* 8, 291-300.
- Barrett, A. J. (1997). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). *Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997).* *Eur.J.Biochem.* 250, 1-6.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner Jr, J. F. (1998). *Handbook of proteolytic enzymes.*
- Barrett, M. P. and Fairlamb, A. H. (1999). The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitol.Today* 15, 136-140.

- Becker, I., Perez-Tamayo, R., Montfort, I., Alvizouri, A. M., and Perez-Montfort, R. (1988). *Entamoeba histolytica*: role of amebic proteinases and polymorphonuclear leukocytes in acute experimental amebiasis in the rat. *Exp.Parasitol.* 67, 268-280.
- Berger, A. and Schechter, I. (1970). Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 257, 249-264.
- Bergmann, M. and Ross, W. F. (1936). On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their activation. *J.Biol.Chem.* 114, 717-726.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bohn, E. W., Matsukage, A., and Wilson, S. H. (1974). Stimulation of DNA polymerase activity by the combination of p-hydroxymercuribenzoate and dithiothreitol. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 59, 243-251.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., and Falkow, S. (1992). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. 1977. *Biotechnology* 24, 153-171.
- Borst, P. and Ouellette, M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu.Rev.Microbiol.* 49, 427-460.
- Bracha, R. and Mirelman, D. (1984). Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. *J.Exp.Med.* 160, 353-368.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M., and Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol.Microbiol.* 34, 463-472.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., and Tannich, E. (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol.Microbiol.* 22, 255-263.
- Bruchhaus, I., Leippe, M., Lioutas, C., and Tannich, E. (1993). Unusual gene organization in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *DNA Cell Biol.* 12, 925-933.
- Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N., and Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot.Cell* 2, 501-509.
- Buss, H., Lioutas, C., Dobinsky, S., Nickel, R., and Tannich, E. (1995). Analysis of the 170-kDa lectin gene promoter of *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 72, 1-10.

- Chavez-Munguia, B., Espinosa-Cantellano, M., Castanon, G., and Martinez-Palomo, A. (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Arch.Med.Res.* 31, S165-S167.
- Chester, N. and Marshak, D. R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.* 209, 284-290.
- Clark, C. G. and Diamond, L. S. (1991). Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol.Biochem.Parasitol.* 49, 297-302.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69, 2110-2114.
- Cowman, A. F. (1995). Mechanisms of drug resistance in malaria. *Aust.N.Z.J.Med.* 25, 837-844.
- Crawford, C., Mason, R. W., Wikstrom, P., and Shaw, E. (1988). The design of peptidyl-diazomethane inhibitors to distinguish between the cysteine proteinases calpain II, cathepsin L and cathepsin B. *Biochem.J.* 253, 751-758.
- Cygler, M., Sivaraman, J., Grochulski, P., Coulombe, R., Storer, A. C., and Mort, J. S. (1996). Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure.* 4, 405-416.
- Dalton, J. P. and Mulcahy, G. (2001). Parasite vaccines--a reality? *Vet.Parasitol.* 98, 149-167.
- Diamond, L. S. and Clark, C. G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J.Eukaryot.Microbiol.* 40, 340-344.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 72, 431-432.
- Eakin, A. E., Mills, A. A., Harth, G., McKerrow, J. H., and Craik, C. S. (1992). The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J.Biol.Chem.* 267, 7411-7420.

- Engel, J. C., Doyle, P. S., Hsieh, I., and McKerrow, J. H. (1998a). Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J.Exp.Med.* 188, 725-734.
- Engel, J. C., Doyle, P. S., Palmer, J., Hsieh, I., Bainton, D. F., and McKerrow, J. H. (1998b). Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 5), 597-606.
- Engel, J. C., Torres, C., Hsieh, I., Doyle, P. S., McKerrow, J. H., and Garcia, C. T. (2000). Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J.Cell Sci.* 113 (Pt 8), 1345-1354.
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* 132, 6-13.
- Fox, T., de Miguel, E., Mort, J. S., and Storer, A. C. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* 31, 12571-12576.
- Franke de Cazzulo, B. M., Martinez, J., North, M. J., Coombs, G. H., and Cazzulo, J. J. (1994). Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol.Lett.* 124, 81-86.
- Gadasi, H. and Kessler, E. (1983a). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. *Infect.Immun.* 39, 528-531.
- Gadasi, H. and Kobiler, D. (1983b). *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. *Exp.Parasitol.* 55, 105-110.
- Ghosh, S. K., Lohia, A., Kumar, A., and Samuelson, J. (1996). Overexpression of P-glycoprotein gene 1 by transfected *Entamoeba histolytica* confers emetine-resistance. *Mol.Biochem.Parasitol.* 82, 257-260.
- Ghosh, S. K. and Samuelson, J. (1997). Involvement of p21racA, phosphoinositide 3-kinase, and vacuolar ATPase in phagocytosis of bacteria and erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: suggestive evidence for coincidental evolution of amebic invasiveness. *Infect.Immun.* 65, 4243-4249.
- Gilchrist, C. A., Holm, C. F., Hughes, M. A., Schaenman, J. M., Mann, B. J., and Petri, W. A., Jr. (2001). Identification and characterization of an *Entamoeba histolytica* upstream regulatory element 3 sequence-specific DNA-binding protein containing EF-hand motifs. *J.Biol.Chem.* 276, 11838-11843.

- Gilchrist, C. A., Mann, B. J., and Petri, W. A., Jr. (1998). Control of ferredoxin and Gal/GalNAc lectin gene expression in *Entamoeba histolytica* by a cis-acting DNA sequence. *Infect.Immun.* 66, 2383-2386.
- Gilchrist, C. A., Purdy, J., Mann, B. J., and Petri, W. A., Jr. (1997). Control of gene expression in *Entamoeba histolytica* by a cis-acting upstream regulatory element. *Arch.Med.Res.* 28 Spec No, 39-40.
- Grassmann, W. and Dyckerhoff, H. (1928). *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 41-
- Gupta, R. C., Khandelwal, R. L., and Sulakhe, P. V. (1990). Effects of sulfhydryl agents, trifluoperazine, phosphatase inhibitors and tryptic proteolysis on calcineurin isolated from bovine cerebral cortex. *Mol.Cell Biochem.* 97, 43-52.
- Hamann, L., Nickel, R., and Tannich, E. (1995). Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 8975-8979.
- Hanada, K, Tamai, M., Morimoto, S, Adachi, T., Ohmura, S., Sawada, J., and Tanaka, I. (1978a). Inhibitory Activities of E-64 Derivatives on Papain. *Agric.Biol.Chem.* 42, 537-541.
- Hanada, K, Tamai, M., Ohmura, S., Sawada, J., Seki, T, and Tanaka, I. (1978b). Structure and Synthesis of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agric.Biol.Chem.* 42, 529-536.
- Hanada, K, Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., and Tanaka, I. (1978c). Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agric.Biol.Chem.* 42, 523-528.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166, 557-580.
- Harth, G., Andrews, N., Mills, A. A., Engel, J. C., Smith, R., and McKerrow, J. H. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 58, 17-24.
- Hellberg, A., Leippe, M., and Bruchhaus, I. (2000). Two major 'higher molecular mass proteinases' of *Entamoeba histolytica* are identified as cysteine proteinases 1 and 2. *Mol.Biochem.Parasitol.* 105, 305-309.

- Hellberg, A., Nickel, R., Lotter, H., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2001). Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. *Cell Microbiol.* 3, 13-20.
- Hellberg, A., Nowak, N., Leippe, M., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2002). Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr.Purif.* 24, 131-137.
- Henley, G. L., Lee, C. M., and Takeuchi, A. (1976). Freeze-etching observations of trophozoites of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Z.Parasitenkd.* 48, 181-190.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., and Stueber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6, 1321-1325.
- Hohenberg, H., Mannweiler, K., and Muller, M. (1994). High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *J.Microsc.* 175 (Pt 1), 34-43.
- Hooper, N. M. (2002). Proteases: a primer. *Essays Biochem.* 38, 1-8.
- Huete-Perez, J. A., Engel, J. C., Brinen, L. S., Mottram, J. C., and McKerrow, J. H. (1999). Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J.Biol.Chem.* 274, 16249-16256.
- Hughes, M. A. and Petri, W. A., Jr. (2000). Amebic liver abscess. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 14, 565-82, viii.
- Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E., and Leippe, M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol.Microbiol.* 27, 269-276.
- Kapur, V., Topouzis, S., Majesky, M. W., Li, L. L., Hamrick, M. R., Hamill, R. J., Patti, J. M., and Musser, J. M. (1993). A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb.Pathog.* 15, 327-346.
- Karrer, K. M., Peiffer, S. L., and DiTomas, M. E. (1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 3063-3067.

- Katunuma, N. and Kominami, E. (1995). Structure, properties, mechanisms, and assays of cysteine protease inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol.* 251, 382-397.
- Keene, W. E., Hidalgo, M. E., Orozco, E., and McKerrow, J. H. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp.Parasitol.* 71, 199-206.
- Keene, W. E., Pettitt, M. G., Allen, S., and McKerrow, J. H. (1986). The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J.Exp.Med.* 163, 536-549.
- Kirschke, H., Barrett, A. J., and Rawlings, N. D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile.* 2, 1581-1643.
- Kirschke, H. and Shaw, E. (1981). Rapid interaction of cathepsin L by Z-Phe-PheCHN₂ and Z-Phe-AlaCHN₂. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 101, 454-458.
- Kirschke, H., Wikstrom, P., and Shaw, E. (1988). Active center differences between cathepsins L and B: the S1 binding region. *FEBS Lett.* 228, 128-130.
- Knobloch, J. and Mannweiler, E. (1983). Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 32, 727-732.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lecaille, F., Kaleta, J., and Bromme, D. (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem.Rev.* 102, 4459-4488.
- Lee, B. J., Singh, A., Chiang, P., Kemp, S. J., Goldman, E. A., Weinhouse, M. I., Vlasuk, G. P., and Rosenthal, P. J. (2003). Antimalarial activities of novel synthetic cysteine protease inhibitors. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47, 3810-3814.
- Leippe, M. (1997). Amoebapores. *Parasitol.Today* 13, 178-183.
- Leippe, M., Andra, J., Nickel, R., Tannich, E., and Muller-Eberhard, H. J. (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol.Microbiol.* 14, 895-904.

- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R. D., and Muller-Eberhard, H. J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88, 7659-7663.
- Leon, G., Fiori, C., Das, P., Moreno, M., Tovar, R., Sanchez-Salas, J. L., and Munoz, M. L. (1997). Electron probe analysis and biochemical characterization of electron-dense granules secreted by *Entamoeba histolytica*. Mol.Biochem.Parasitol. 85, 233-242.
- Li, E., Yang, W. G., Zhang, T., and Stanley, S. L., Jr. (1995). Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. Infect.Immun. 63, 4150-4153.
- Luaces, A. L. and Barrett, A. J. (1988). Affinity purification and biochemical characterization of histolysin, the major cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. Biochem.J. 250, 903-909.
- Lucassen, R., Nishina, K., and Supattapone, S. (2003). In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. Biochemistry 42, 4127-4135.
- Lushbaugh, W. B., Hofbauer, A. F., and Pittman, F. E. (1985). *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. Exp.Parasitol. 59, 328-336.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., and Samuelson, J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle ("crypton") in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Mol.Cell Biol. 19, 2198-2205.
- Mann, B. J., Torian, B. E., Vedvick, T. S., and Petri, W. A., Jr. (1991). Sequence of a cysteine-rich galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88, 3248-3252.
- Massaro, E. J. and Markert, C. L. (1966). Ionic effects on self-reactivation of p-hydroxymercuribenzoate-inhibited lactate dehydrogenase. Arch.Biochem.Biophys. 116, 319-331.
- McKerrow, J. H. (1989). Parasite proteases. Exp.Parasitol. 68, 111-115.
- Montfort, I., Olivos, A., and Perez-Tamayo, R. (1993). Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *E. histolytica*. Parasitol.Res. 79, 160-162.
- Mora-Galindo, J., Gutierrez-Lozano, M., and Anaya-Velazquez, F. (1997). *Entamoeba histolytica*: kinetics of hemolytic activity, erythrophagocytosis and digestion of erythrocytes. Arch.Med.Res. 28 Spec No, 200-201.

- Mottram, J. C., Frame, M. J., Brooks, D. R., Tetley, L., Hutchison, J. E., Souza, A. E., and Coombs, G. H. (1997). The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J.Biol.Chem.* 272, 14285-14293.
- Navarro-Garcia, F., Chavez-Duenas, L., Tsutsumi, V., Posadas, del Rio, and Lopez-Revilla, R. (1995). *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. *Exp.Parasitol.* 80, 361-372.
- Nellen, W. and Sczakiel, G. (1996). In vitro and in vivo action of antisense RNA. *Mol.Biotechnol.* 6, 7-15.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Nickel, R. and Tannich, E. (1994). Transfection and transient expression of chloramphenicol acetyltransferase gene in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 7095-7098.
- North, M. J. (1994). Cysteine endopeptidases of parasitic protozoa. *Methods Enzymol.* 244, 523-539.
- North, M. J., Cotter, D. A., and Franek, K. J. (1990). Cysteine proteinase changes during macrocyst formation in *Dictyostelium mucoroides*. *FEMS Microbiol.Lett.* 60, 153-157.
- Olivos-Garcia, A., Gonzalez-Canto, A., Lopez-Vancell, R., De Leon, Md M., Tello, E., Nequiz-Avendano, M., Montfort, I., and Perez-Tamayo, R. (2003). Amebic cysteine proteinase 2 (EhCP2) plays either a minor or no role in tissue damage in acute experimental amebic liver abscess in hamsters. *Parasitol.Res.* 90, 212-220.
- Olson, J. E., Lee, G. K., Semenov, A., and Rosenthal, P. J. (1999). Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorg.Med.Chem.* 7, 633-638.
- Ostoa-Saloma, P., Cabrera, N., Becker, I., and Perez-Montfort, R. (1989). Proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. *Mol.Biochem.Parasitol.* 32, 133-143.
- Otto, H. H. and Schirmeister, T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem.Rev.* 97, 133-172.

- Perez-Victoria, J. M., Di Pietro, A., Barron, D., Ravelo, A. G., Castanys, S., and Gamarro, F. (2002). Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr. Drug Targets*. 3, 311-333.
- Petri, W. A. and Ramakrishnan, G. (1999). Applying antisense technology to the study of *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Trends Microbiol.* 7, 471-474.
- Petri, W. A., Jr., Haque, R., and Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 39-64.
- Petri, W. A., Jr., Smith, R. D., Schlesinger, P. H., Murphy, C. F., and Ravdin, J. I. (1987). Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest* 80, 1238-1244.
- Purdy, J. E., Mann, B. J., Pho, L. T., and Petri, W. A., Jr. (1994). Transient transfection of the enteric parasite *Entamoeba histolytica* and expression of firefly luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91, 7099-7103.
- Purdy, J. E., Pho, L. T., Mann, B. J., and Petri, W. A., Jr. (1996). Upstream regulatory elements controlling expression of the *Entamoeba histolytica* lectin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78, 91-103.
- Ravdin, J. I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* 8, 247-260.
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290 (Pt 1), 205-218.
- Rawlings, N. D. and Barrett, A. J. (1994). Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 461-486.
- Reed, S. L., Keene, W. E., and McKerrow, J. H. (1989). Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2772-2777.
- Rosenthal, P. J. (1999). Proteases of protozoan parasites. *Adv. Parasitol.* 43, 105-159.
- Rosenthal, P. J., Lee, G. K., and Smith, R. E. (1993). Inhibition of a *Plasmodium vinckei* cysteine proteinase cures murine malaria. *J. Clin. Invest* 91, 1052-1056.
- Rosenthal, P. J., McKerrow, J. H., Aikawa, M., Nagasawa, H., and Leech, J. H. (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest* 82, 1560-1566.

- Rosenthal, P. J., Olson, J. E., Lee, G. K., Palmer, J. T., Klaus, J. L., and Rasnick, D. (1996). Antimalarial effects of vinyl sulfone cysteine proteinase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1600-1603.
- Rosenthal, P. J., Wollish, W. S., Palmer, J. T., and Rasnick, D. (1991). Antimalarial effects of peptide inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase. *J. Clin. Invest.* 88, 1467-1472.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sajid, M. and McKerrow, J. H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1-21.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.*
- Sanderson, S. J., Pollock, K. G., Hilley, J. D., Meldal, M., Hilaire, P. S., Juliano, M. A., Juliano, L., Mottram, J. C., and Coombs, G. H. (2000). Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *Biochem. J.* 347, 383-388.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J., and Roe, B. A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143, 161-178.
- Sargeant, P. G., Jackson, T. F., Wiffen, S., Bhojnani, R., Williams, J. E., Felmingham, D., Goldmeir, D., Allason-Jones, E., Mindel, A., and Phillips, E. (1987). The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical laboratory diagnosis. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 18, 69-75.
- Sargeant, P. G., Williams, J. E., and Grene, J. D. (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72, 519-521.
- Schaenman, J. M., Driscoll, P. C., Hockensmith, J. W., Mann, B. J., and Petri, W. A., Jr. (1998). An upstream regulatory element containing two nine basepair repeats regulates expression of the *Entamoeba histolytica* hgl5 lectin gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94, 309-313.

- Schluter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C., and Clos, J. (2000). Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. *Biochim.Biophys.Acta* 1491, 65-74.
- Scholze, H. and Schulte, W. (1988). On the specificity of a cysteine proteinase from *Entamoeba histolytica*. *Biomed.Biochim.Acta* 47, 115-123.
- Scholze, H. and Tannich, E. (1994). Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods Enzymol.* 244, 512-523.
- Schulte, W. and Scholze, H. (1989). Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J.Protozool.* 36, 538-543.
- Scory, S., Caffrey, C. R., Stierhof, Y. D., Ruppel, A., and Steverding, D. (1999). *Trypanosoma brucei*: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Exp.Parasitol.* 91, 327-333.
- Selzer, P. M., Chen, X., Chan, V. J., Cheng, M., Kenyon, G. L., Kuntz, I. D., Sakanari, J. A., Cohen, F. E., and McKerrow, J. H. (1997). *Leishmania major*: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. *Exp.Parasitol.* 87, 212-221.
- Selzer, P. M., Pingel, S., Hsieh, I., Ugele, B., Chan, V. J., Engel, J. C., Bogyo, M., Russell, D. G., Sakanari, J. A., and McKerrow, J. H. (1999). Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 11015-11022.
- Serrano, J. J., de la, Garza M., Reyes, M., Leon, G., Tovar, R., and Munoz, M. K. (1996). *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitol.Res.* 82, 200-205.
- Shenai, B. R., Sijwali, P. S., Singh, A., and Rosenthal, P. J. (2000). Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J.Biol.Chem.* 275, 29000-29010.
- Singh, A. and Rosenthal, P. J. (2001). Comparison of efficacies of cysteine protease inhibitors against five strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45, 949-951.
- Singh, A. K. and Rosenthal, P. J. (2004). Selection of cysteine protease inhibitor resistant malaria parasites is accompanied by amplification of falcipain genes and alteration in inhibitor transport. *J.Biol.Chem.*

- Singh, U., Gilchrist, C. A., Schaenman, J. M., Rogers, J. B., Hockensmith, J. W., Mann, B. J., and Petri, W. A. (2002). Context-dependent roles of the *Entamoeba histolytica* core promoter element GAAC in transcriptional activation and protein complex assembly. *Mol.Biochem.Parasitol.* 120, 107-116.
- Singh, U. and Rogers, J. B. (1998). The novel core promoter element GAAC in the *hgl5* gene of *Entamoeba histolytica* is able to direct a transcription start site independent of TATA or initiator regions. *J.Biol.Chem.* 273, 21663-21668.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150, 76-85.
- Souza, A. E., Waugh, S., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (1992). Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett.* 311, 124-127.
- Spice, W. M. and Ackers, J. P. (1993). Influence of bacteria on electrophoretic proteinase patterns of *Entamoeba histolytica* isolates. *Int.J.Parasitol.* 23, 671-674.
- Stanley, S. L. (2001). Pathophysiology of amoebiasis. *Trends Parasitol.* 17, 280-285.
- Stanley, S. L., Jr., Zhang, T., Rubin, D., and Li, E. (1995). Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect.Immun.* 63, 1587-1590.
- Storer, A. C. and Menard, R. (1994). Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 486-500.
- Strachan, W. D., Chiodini, P. L., Spice, W. M., Moody, A. H., and Ackers, J. P. (1988). Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 1, 561-563.
- Tachibana, H., Ihara, S., Kobayashi, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T., and Watanabe, Y. (1991). Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 29, 2234-2239.
- Tannich, E. and Burchard, G. D. (1991a). Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J.Clin.Microbiol.* 29, 250-255.

- Tannich, E., Ebert, F., and Horstmann, R. D. (1991b). Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 88, 1849-1853.
- Tannich, E., Ebert, F., and Horstmann, R. D. (1992). Molecular cloning of cDNA and genomic sequences coding for the 35-kilodalton subunit of the galactose-inhibitable lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Mol.Biochem.Parasitol. 55, 225-227.
- Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J., and Arnold, H. H. (1989). Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 86, 5118-5122.
- Tannich, E., Scholze, H., Nickel, R., and Horstmann, R. D. (1991c). Homologous cysteine proteinases of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Differences in structure and expression. J.Biol.Chem. 266, 4798-4803.
- Taylor, M. A., Briggs, G. S., Baker, K. C., Cummings, N. J., Pratt, K. A., Freedman, R. B., and Goodenough, P. W. (1995). Expression of the pro-regions of papain and papaya proteinase IV in *Escherichia coli* and their inhibition of mature cysteine proteinases. Biochem.Soc.Trans. 23, 80S-
- Taylor, M. A., Pratt, K. A., Revell, D. F., Baker, K. C., Sumner, I. G., and Goodenough, P. W. (1992). Active papain renatured and processed from insoluble recombinant propapain expressed in *Escherichia coli*. Protein Eng 5, 455-459.
- Temesvari, L. A., Harris, E. N., Stanley, S. L., Jr., and Cardelli, J. A. (1999). Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. Mol.Biochem.Parasitol. 103, 225-241.
- Tomee, J. F., Wierenga, A. T., Hiemstra, P. S., and Kauffman, H. K. (1997). Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. J.Infect.Dis. 176, 300-303.
- Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C. G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. Mol.Microbiol. 32, 1013-1021.
- Trissl, D., Martinez-Palomo, A., De La, Torre M., de la, Hoz R., and Perez, de Suarez (1978). Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. J.Exp.Med. 148, 1137-1143.

- Troeberg, L., Morty, R. E., Pike, R. N., Lonsdale-Eccles, J. D., Palmer, J. T., McKerrow, J. H., and Coetzer, T. H. (1999). Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp.Parasitol.* 91, 349-355.
- Tsutsumi, V., Ramirez-Rosales, A., Lanz-Mendoza, H., Shibayama, M., Chavez, B., Rangel-Lopez, E., and Martinez-Palomo, A. (1992). *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 86, 170-172.
- Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M., and Turk, V. (1996). Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384, 211-214.
- Vargas-Villarreal, J., Olvera-Rodriguez, A., Mata-Cardenas, B. D., Martinez-Rogriguez, H. G., Said-Fernandez, S., and Alagon-Cano, A. (1998). Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A2. *Parasitol.Res.* 84, 310-314.
- Voigt, H., Olivo, J. C., Sansonetti, P., and Guillen, N. (1999). Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 8), 1191-1201.
- Walsh, J. A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev.Infect.Dis.* 8, 228-238.
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J.Biol.Chem.* 274, 26051-26056.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Biol.Chem.* 244, 4406-4412.
- White, N. J. (1998). Drug resistance in malaria. *Br.Med.Bull.* 54, 703-715.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D., and Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal.Biochem.* 175, 231-237.
- Willhoeft, U., Buss, H., and Tannich, E. (1999a). DNA sequences corresponding to the ariel gene family of *Entamoeba histolytica* are not present in *E. dispar*. *Parasitol.Res.* 85, 787-789.

- Willhoeft, U., Campos-Gongora, E., Touzni, S., Bruchhaus, I., and Tannich, E. (2001). Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Protist.* 152, 149-156.
- Willhoeft, U., Hamann, L., and Tannich, E. (1999b). A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect.Immun.* 67, 5925-5929.
- Willhoeft, U. and Tannich, E. (1999c). The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 99, 41-53.
- World Health Organisation (1997). Amebiasis. *W. H. O. Wkly. Epidemiol. Rec.*, 97-100.
- Wynants, H., Van den, Ende J., Randria, J., Van Gompel, A., Van den, Enden E., Brands, C., Coremans, P., Michielsens, P., Verbist, L., and Colebunders, R. (1995). Diagnosis of amoebic infection of the liver: report of 36 cases. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.* 75, 297-303.
- Young, J. D., Young, T. M., Lu, L. P., Unkeless, J. C., and Cohn, Z. A. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J.Exp.Med.* 156, 1677-1690.
- Zhang, Z., Wang, L., Seydel, K. B., Li, E., Ankri, S., Mirelman, D., and Stanley, S. L., Jr. (2000). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol.Microbiol.* 37, 542-548.
- Zidovetzki, R., Sherman, I. W., Prudhomme, J., and Crawford, J. (1994). Inhibition of *Plasmodium falciparum* lysophospholipase by anti-malarial drugs and sulphhydryl reagents. *Parasitology* 108 (Pt 3), 249-255.

7 DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. Iris Bruchhaus dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante und vielseitige Thema zu bearbeiten. Ihre hervorragende Betreuung, stete Hilfsbereitschaft und wertvollen Anregungen waren während meiner Arbeit von unschätzbarem Wert und äußerst motivierend.

Herrn Prof. Dr. Egbert Tannich danke ich für die große Unterstützung, seine wertvollen Anregungen und sein großes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hagen Bretting möchte ich meinen herzlichen Dank für die Begutachtung dieser Arbeit aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich besonders herzlich bei Dr. Andrea Hellberg für eine hervorragende Einführung in die Welt der Cysteinpeptidasen bedanken. Dr. Hannelore Lotter gebührt großer Dank für die Durchführung der Versuche mit *Meriones unguiculatus*. Heidrun von Thien danke ich herzlich für die Unterstützung und Durchführung molekularbiologischer Arbeiten und ihre stete Hilfsbereitschaft. Ein großer Dank gilt Christel Schmetz für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten. Meike Bente und Simone Harder danke ich für die umfassende Hilfe und Einführung in die 2D-SDS-PAGE. Dr. Henriette Irmer danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung des schriftlichen Teils der Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an PD Dr. Volker Heussler, Dr. Frank Ebert, Dr. Andreas Krüger, Dr. Martin Wiese, Dr. Felix Asche, Dr. Martina Wiesgigl, Britta Weseloh, Ina Hennings und allen anderen, die mir sowohl mit vielen praktischen Tipps für die tägliche Laborarbeit als auch mit ihrer moralischen Unterstützung zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt meiner lieben Mutter, die in jeder Situation zu mir steht und mich - nicht nur durch ihren festen Glauben an mich - stets unterstützt.