

Bachelorarbeit
Im Studiengang Biotechnologie

**Charakterisierung eines putativen Pathogenitäts-
faktors von *Entamoeba histolytica* hinsichtlich
seines Einflusses auf die hämolytische und die
Cysteinpeptidase Aktivität**

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

&

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

vorgelegt von

Ibrahim Shalabi



Unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus und Herrn Prof. Dr. Claus-

Dieter Wacker

Hamburg

Am 21.03.2023

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Wirt-Parasit-Interaktion (Leitung Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus) und unter der Betreuung von Frau Juliett Anders am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin geleistet.

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Ulmenlit 20, 21033 Hamburg

- 2. Gutachterin:** Prof. Dr. Iris Bruchhaus
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Arbeitsgruppe Wirt-Parasit-Interaktion
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

Zusammenfassung

Entamoeba histolytica ist ein intestinales Protozoon, welches die Amöbiasis, eine vernachlässigte Tropenkrankheit, auslöst. Die Krankheit tritt hauptsächlich in tropischen Gebieten mit unzureichender Hygiene auf und verläuft bei den meisten Infizierten asymptomatisch. Etwa 10 % der Infizierten entwickeln jedoch eine invasive Form der Krankheit, bei der die Trophozoiten die Darmwand durchdringen und in den Blutkreislauf gelangen können. Dies führt oft zur Bildung von Amöbenleberabszessen (ALAs), die für den Wirt tödlich sein können. Die genauen Ursachen für den Übergang von einem asymptomatischen in einen invasiven Verlauf sind noch weitgehend unbekannt. Die Zysten werden fäkal-oral übertragen und das Krankheitsbild variiert von Amöbenkolitis bis zur Bildung von ALAs. Die Amöbiasis betrifft jährlich fast 50 Millionen Menschen und war im Jahr 2013 für 11.300 Todesfälle verantwortlich.

Cysteinpeptidasen, Gal/GalNAc Lektine und *amoebapores* wurden als wichtige Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* identifiziert. In mehreren Studien wurden pathogene und nicht-pathogene Klone des Amöbenkulturisolats HM-1:IMSS hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht, um neue Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren. Die Pathogenität ist definiert als die Fähigkeit, im Mausmodell nach einer intrahepatischen Injektion von Trophozoiten ALAs auszulösen. Dabei zeigte sich, dass bestimmte Gene in pathogenen Klonen im Vergleich zu nicht-pathogenen Klonen signifikant unterschiedlich exprimiert werden. Eine solche Studie zeigte, dass das Gen *ehi_127670*, das für ein putatives Protein EHI_127670 kodiert, ein möglicher Pathogenitätsfaktor ist. Im Vergleich zu nicht-pathogenen Klonen weist *ehi_127670* eine erhöhte Expression in pathogenen Trophozoiten auf, und das *Silencing* des Gens in pathogenen *E. histolytica* Trophozoiten führt zu einer Abnahme der Pathogenität im Mausmodell. Bisher konnte noch keine klare Vorstellung über die Natur von EHI_127670 gezogen werden. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, das putative Protein EHI_127670 näher zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden in vorherigen Studien die Cysteinpeptidase-Aktivitäten von verschiedenen Transfektanten bestimmt, die aber zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Konfluenz der Trophozoiten einen Einfluss auf die Cysteinpeptidase-Aktivität haben könnte. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurde die Cysteinpeptidase-Aktivität bei verschiedenen Konfluenzen gemessen. Hierbei wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Konfluenzgrad und der Cysteinpeptidase-Aktivität aufgrund der beobachteten Unterschiede in Abhängigkeit von der Konfluenz festgestellt.

Im zweiten Teil der Untersuchung wurde die hämolytische Aktivität verschiedener *E. histolytica* Transfektanten bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Überexpression des Gens *ehi_127670* in pathogenen und nicht-pathogenen *E. histolytica* Klonen keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit zur Lyse von Erythrozyten hat. In vorherigen Arbeiten wurde jedoch durch das *Silencing* des Gens in pathogenen Klonen ein signifikanter Unterschied in der hämolytischen Aktivität festgestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Gen *ehi_127670* nur einen geringen Einfluss auf die hämolytische und Cysteinpeptidase-Aktivität aufweist. Für die in vorherigen Untersuchungen festgestellten Unterschiede in der Cysteinpeptidase-Aktivität konnte anhand der vorliegenden Studie eine Erklärung gefunden werden. In nachfolgenden Transkriptomanalysen kann geprüft werden, ob das *Silencing* bzw. die Überexpression des Gens *ehi_127670* einen Einfluss auf die Regulation anderer Gene hat.

Abstract

Entamoeba histolytica is an intestinal protozoan that causes amoebiasis, a neglected tropical disease. The disease occurs mainly in tropical areas with inadequate hygiene and is asymptomatic in most infected persons. However, about 10 % of infected people develop an invasive form of the disease, where the trophozoites can penetrate the intestinal epithelium and enter the bloodstream. This often leads to the formation of amoebic liver abscesses (ALAs), which can be fatal for the host. The exact causes for the transition from an asymptomatic to an invasive form are still largely unknown. The cysts are transmitted fecal-orally and the clinical symptoms vary from amoebic colitis to ALAS. Amoebiasis affects nearly 50 million people annually and was responsible for 11,300 deaths in 2013.

Cysteine proteases, Gal/GalNAc lectins and *amoebapores* have been identified as important pathogenicity factors of *E. histolytica*. In several studies, pathogenic and non-pathogenic clones of the amoeba culture isolate HM-1:IMSS were investigated with regard to their gene expression in order to identify new pathogenicity factors. Pathogenicity is defined as the ability to cause ALAs in a mouse model after intrahepatic injection of the trophozoites. This showed that certain genes are expressed significantly different in pathogenic clones compared to non-pathogenic clones. One such study showed that the gene *ehi_127670*, which encodes a hypothetical protein, is a possible pathogenicity factor. Compared to non-pathogenic clones, *ehi_127670* shows increased expression in pathogenic clones, and silencing of the gene leads to a decrease in pathogenicity in pathogenic *E. histolytica* trophozoites. The aim of this work is to characterize the hypothetical protein EHI_127670 in more detail.

To this end, previous studies determined the cysteine peptidase activities of different transfectants but yielded conflicting results. Therefore, it was hypothesized that the confluence of trophozoites might have an influence on cysteine peptidase activity. To investigate this relationship, cysteine peptidase activity was measured at different confluences. A possible correlation between the degree of confluency and the cysteine peptidase activity was established based on the observed differences depending on the confluency.

In the second part of the study, the haemolytic activity of various *E. histolytica* transfectants was determined. It was found that overexpression of the gene *ehi_127670* in pathogenic and non-pathogenic *E. histolytica* clones had no significant effect on the ability to lyse erythrocytes. However, in previous work, silencing of the gene in pathogenic clones was found to

result in a significant difference in haemolytic activity. In summary, the *ehi_127670* gene has little effect on haemolytic and cysteine peptidase activity. The differences in cysteine peptidase activity found in previous studies could be explained by the present study. In subsequent transcriptome analyses, it can be examined whether the *silencing* or overexpression of the gene *ehi_127670* has an influence on the regulation of others.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	iii
Abstract	v
Abkürzungsverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis.....	x
Tabellenverzeichnis	xi
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	1
1.1.1 Systematische Einordnung	1
1.1.2 Entdeckung und Verbreitung	1
1.1.3 Verlauf des Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i> , Krankheitsbild und Symptome	3
1.1.4 Behandlungsmöglichkeiten	5
1.2 Kulturoisolate am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM)	6
1.3 Pathogenitätsfaktoren von <i>E. histolytica</i>	8
1.3.1 Cysteinpeptidasen als Pathogenitätsfaktoren von <i>E. histolytica</i>	9
1.4 Putativer Pathogenitätsfaktor EHI_127670.....	10
1.4.1 Lokalisierung von EHI_127670	10
1.5 <i>Silencing</i> und Überexpressionstransfektanten.....	11
1.6 Zielsetzung	12
2. Material	14
2.1 Geräte und Software	14
2.2 Chemikalien	14
2.3 Verbrauchsmaterialien	15
2.4 Puffer und Lösungen.....	16
2.5 Kulturmedien und Medienzusätze	16
2.6 Reaktionskits.....	17

2.7	Verwendete Organismen.....	17
2.7.1	<i>Entamoeba histolytica</i>	17
2.7.2	Humane Erythrozyten	18
3.	Methoden.....	19
3.1	Kultivierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten.....	19
3.2	Ernte von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten	19
3.3	Zellzahlbestimmung.....	20
3.4	Bestimmung der Konfluenz	20
3.5	Lysatherstellung aus <i>E. histolytica</i> Trophozoiten	21
3.6	Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay.....	21
3.7	Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität.....	22
3.7.1	Bestimmung der Volumenaktivität	22
3.7.2	Bestimmung der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität.....	23
3.8	Bestimmung der hämolytischen Aktivität	23
3.9	Statistik	24
4.	Ergebnisse	25
4.1	Einfluss des <i>Silencings</i> von <i>ehi_127670</i> auf die Cysteinpeptidase-Aktivität der <i>E. histolytica</i> Trophozoiten.....	25
4.2	Einfluss der veränderten Genexpression von <i>ehi_127670</i> auf die hämolytische Aktivität der <i>E. histolytica</i> Trophozoiten.....	29
5.	Diskussion.....	31
6.	Ausblick	37
7.	Literaturverzeichnis.....	38
	Danksagung	45
	Eidesstattliche Erklärung.....	46

Abkürzungsverzeichnis

Abk.:	Beschreibung
ALA	Amöbenleberabszess
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
BSA	<i>bovines serum albumin</i>
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bzw.	beziehungsweise
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E64	Proteaseinhibitor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> ; und andere
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gal/GalNAc	Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifisches Lektin
G418	<i>Geneticin</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mol
m	milli
min	Minute
mm ²	Quadratmillimeter
Myc	Myelocytomatose
np	nicht-pathogen
ns	nicht signifikant
p	pathogen
P	Signifikanzwert (p-Wert)
pH	<i>potentio Hydronium</i> , Potential der Hydromiumionen
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NaPBS	<i>sodium phosphate buffered saline</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
Si	<i>Silencing/ Silencer</i>
SOD	Superoxide dismutase
ÜE	Überexprimierer
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Z-Arg-Arg-pNA	Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid
Δ	Delta, Differenz
ε	Epsilon, Extinktionskoeffizient
μ	mikro
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausbreitung von <i>E. histolytica</i>	2
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i>	5
Abbildung 3: Zusammenfassung der verwendeten <i>E. histolytica</i> -Zelllinien und ihrer Herkunft.	7
Abbildung 4: Prüfung der Pathogenität von Trophozoiten aus <i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS Zelllinien A und B und deren Klone A1-A12 und B1-B12, durch Analyse ihrer Fähigkeit, ALAs im <i>Meriones unguiculatus</i> Tiermodell auszubilden. (Dissertation Matthiesen, 2012; Meyer <i>et al.</i> 2016).....	8
Abbildung 5: Konfokale Bildgebung von EHI_127670 und SOD (Superoxide Dismutase) in fixierten Zellen unter Verwendung von Saponin-Permeabilisierung und Immunfluoreszenzfärbung.	11
Abbildung 6: Spezifische Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) des <i>E. histolytica</i> B2 ^P Klons bei 30 %, 60 %, 90 % und > 100 % Konfluenz.....	26
Abbildung 7: Spezifische Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) der <i>E. histolytica</i> B2 ^{Si} Transfektanten bei 30 %, 60 %, 90 % und > 100 % Konfluenz.	27
Abbildung 8: Vergleich der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) des <i>E. histolytica</i> B2 ^P Klons und der B2 ^{Si} Transfektanten bei 30 %, 60 %, 90 % und > 100 % Konfluenz.	28
Abbildung 9: Bestimmung der hämolytischen Aktivität verschiedener A1 ^{np} und B2 ^P Überexpressions-Transfektanten.....	30
Abbildung 10: Darstellung der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) in verschiedenen Studien bei B2 ^P und B2 ^{Si} <i>E. histolytica</i> Klonen.....	32
Abbildung 11: Bestimmung der Motilität (A, E), der Erythrophagozytose (B, F), der zytopathischen Aktivität (C, G), der Cysteinpeptidase-Aktivität (D, H) von EHI_127670- Transfektanten (Überexpressions-Transfektant: A1 ^{ÜE} , <i>Silencing</i> -Transfektant: B2 ^{Si}). (Unveröffentlichte Daten von J. Anders).....	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Herstellern	14
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Softwares mit Herstellern	14
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien mit Herstellern.....	15
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialliste mit Herstellern	15
Tabelle 5: Zusammensetzung TY-I-SS Medium	16
Tabelle 6: Verwendete Reaktionskits mit Herstellern	17
Tabelle 7: Zelllinien von <i>E. histolytica</i>	17
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Transfektanten	18

1. Einleitung

1.1 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica ist ein anaerober protozoischer Parasit (Schaudinn 1903). Es können verschiedene Arten von Darmamöben bei Menschen vorkommen (z.B. *Entamoeba coli*), wobei nur *E. histolytica* als krankheitsverursachend für den Menschen eingestuft wird. Mit Ausnahme einiger Altweltaffenarten betrifft die Infektion mit *E. histolytica* in erster Linie den Menschen (Van Lunzen *et al.* 1996). Infolge dieser Infektion kann die Amöbiasis ausgelöst werden (Schaudinn 1903). Neben Malaria und Schistosomiasis zählt die Amöbiasis zu den drei häufigsten Parasitosen beim Menschen. Es wird geschätzt, dass jedes Jahr weltweit bis zu 50 Millionen Menschen an Amöbiasis erkranken (WHO/PAHA/UNESCO 1997). Im Jahr 2013 starben 11.300 Menschen aufgrund dieser Infektion (Herricks *et al.* 2017). Dadurch ist die Amöbiasis die vierthäufigste Todesursache aufgrund einer Protozoeninfektion (WHO/PAHA/UNESCO 1997; Walsh 1986; Bercu *et al.* 2007).

1.1.1 Systematische Einordnung

E. histolytica ist taxonomisch Teil des Stammes Amoebozoa, Klasse Entamoebidea, Ordnung Entamoebida, Familie Entamoebidae und Gattung *Entamoeba*. Die Amoebozoa umfassen über 2400 Arten, wobei *E. histolytica* die einzige bekannte Art ist, die beim Menschen pathogen wirkt (Pawlowski *et al.* 2012; Adl *et al.* 2005).

Die besondere Eigenschaft der Amöben besteht darin, dass ihr Aussehen nicht fest ist. Sie nutzen Pseudopodien (Scheinfüßchen), die aus der Zelle hervortreten, um sich fortzubewegen und Nahrung aufzunehmen (Singleton und Sainsbury 2006).

1.1.2 Entdeckung und Verbreitung

E. histolytica hat eine bedeutende Prävalenz in tropischen und subtropischen Regionen (siehe Abbildung 1) (Wertheim *et al.* 2012; Stanley 2003). Die Verbreitung des parasitären Protozoons erfolgt durch den Menschen, der verunreinigtes Trinkwasser und Lebensmittel durch unzureichende hygienische Bedingungen zu sich nimmt (Brandt und Tamayo 1970; Wertheim *et al.* 2012).

Amöbiasis, *Entamoeba histolytica*

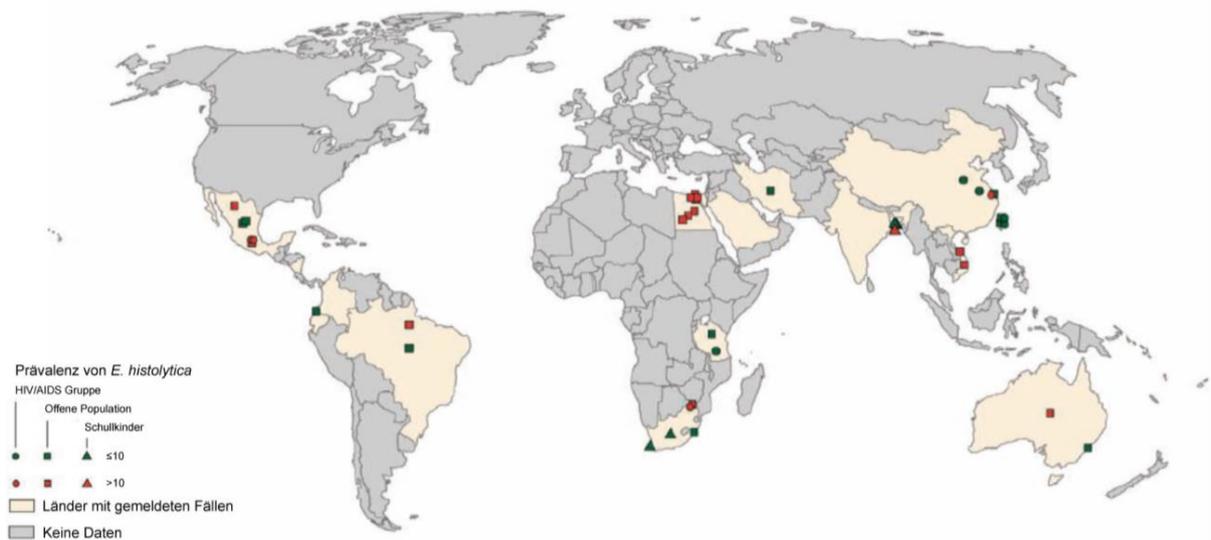


Abbildung 1: Ausbreitung von *E. histolytica*.

Eine Datenerhebung belegt den Anteil von *E. histolytica*-Infektionen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen und Regionen. Infektionen mit einem Anteil von $\leq 10\%$ sind grün markiert, Infektionen mit einem Anteil von $> 10\%$ rot (Ximénez *et al.* 2009). (Modifiziert nach Wertheim *et al.* 2012)

Fedor Lösch war ein russischer Physiologe, der im Jahr 1875 erstmalig die Pathogenität des parasitären Protozoons *E. histolytica* beschrieb. Er hatte das Protozoon in den Stuhlproben und den entzündeten Dickdarmbereichen eines Bauern gefunden, der an Dysenterie verstorben war (Lesh 1875). Fedor Lösch benannte das von ihm entdeckte parasitische Protozoon als *Amoeba coli* und glaubte, dass assoziierte Bakterien die Ursache der Dysenterie des Patienten waren (Lesh 1875). Die endgültige erste vollständige Artbeschreibung von *E. histolytica* stammt von Fritz Schaudinn, der 1903 die Gewebe zerstörenden Fähigkeiten der Amöben beschrieb (Schaudinn 1903; Ralston 2015). Schaudinn verstarb im Alter von 35 Jahren infolge einer schweren Amöbiasis, welche das Resultat eines Selbstversuchs darstellte (Despommier *et al.* 1995). Im Jahr 1891 beschrieben Councilman und Lafleur die wichtigsten Merkmale der durch *E. histolytica* verursachten Darmpathogenese (Councilman und Lafleur 1891). Es dauerte bis zum Jahr 1925, als Boeck als erster *E. histolytica* Trophozoiten kultivierte (Boeck 1925). Im Jahr 1928 hat Dobell den Lebenszyklus von *E. histolytica* vollständig aufgeklärt (Dobell 1928).

1.1.3 Verlauf des Lebenszyklus von *E. histolytica*, Krankheitsbild und Symptome

E. histolytica verfügt über zwei Stadien in seinem Lebenszyklus (Abbildung 2). Die Zyste repräsentiert die unbewegliche und infektiöse Form des Parasiten. Die vierkernige Zyste tritt durch die orale Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser oder Lebensmitteln in den Körper des humanen Wirts ein (Blessmann *et al.* 2002; Brandt und Tamayo 1970; Wertheim *et al.* 2012). Anschließend überlebt die Zyste die Magenpassage mithilfe ihrer säurebeständigen, chitinhalten Hülle und erreicht den Dünndarm. Infolge der pH-Wert-Änderung den basischen und neutralen Bereich im Dünndarm entstehen durch Exzystierung achtkernige metazystische Trophozoiten und im weiteren Verlauf durch mehrmalige Plasmateilungen einkernige Trophozoiten (Despommier *et al.* 1995; Marshall *et al.* 1997). Der Trophozoit stellt die bewegliche Form dar, die durch die Bildung von Pseudopodien charakterisiert ist. Das Überleben außerhalb des Wirts ist für die Trophozoiten nicht möglich (Burchard & Tannich 2004; Stanley 2003; Mehlhorn 2012; Moss 2016). Die Trophozoiten besiedeln anschließend den menschlichen oberen Dickdarm und können dort Monate bis Jahre als Kommensale leben, wobei Bakterien der Darmflora und Nahrungsreste seine Nahrung darstellen (Salles *et al.* 2003). Im unteren Dickdarm des Wirtes kommt es zur asexuellen Vermehrung durch Zweiteilung, bei der die Trophozoiten erneut enzystieren und somit in die Zystenform zurückkehren. Danach werden sie mit den Fäkalien ausgeschieden. Sie können wochenlang in der Umwelt überleben, bis sie von einem neuen Wirt aufgenommen werden. Damit ist der Lebenszyklus abgeschlossen (Mehlhorn 2012; Moss 2016; G. Burchard und E. Tannich 2004; Stanley 2003). Ein derartiger Lebenszyklus von Amöben, bei dem sich große Mengen von bis zu 100 Millionen infektiösen Zysten im Stuhl des Wirts nachweisen lassen, die für mehrere Wochen bis Monate ansteckend bleiben, wird auch als die nicht-invasive Amöbiasis beschrieben (Blessmann *et al.* 2003; Salles *et al.* 2003; Mi-Ichi *et al.* 2016; Burchard & Tannich 2004).

Eine Infektion mit *E. histolytica* kann zudem zur invasiven Verlaufsform führen, die sich entweder innerhalb von Tagen oder sogar Jahren nach der Erstinfektion entwickeln kann. Dieser Verlauf der Infektion ist durch die Fähigkeit der Trophozoiten charakterisiert, die intestinale Mucosa des Dickdarms zu durchdringen und in das Darmepithel einzufallen, was eine Amöbenkolitis verursacht (Stanley 2003). Wenn sich die Amöbiasis extraintestinal entwickelt, gelangen die Trophozoiten nach Perforation des Darmepithels über die Blutbahn in andere

Organe, wie der Lunge, der Leber, oder dem Gehirn und können dort Abszesse verursachen (Blessmann *et al.* 2002; Stanley 2003; Burchard & Tannich 2004). Diese extraintestinale Form des Krankheitsverlaufs endet in etwa 95 % der Fälle in der Leber und führt zur Bildung von Amöbenleberabszessen (ALA) (Burchard & Tannich 2004; Mehlhorn 2012). Die extraintestinale Ausbreitung von *E. histolytica* stellt für den Parasiten ein Ende seines Lebenszyklus dar, da sich die Trophozoiten hier nicht weiter vermehren können.

Während die Infektion in 90 % der Fälle ohne Symptome als nicht invasive Amöbiasis verläuft, kommt es bei 10 % der Erkrankten zu einer invasiven Form (Richard Lucius und Brigitte Loos-Frank 2008). Als Folge kann es zur Entwicklung einer intestinalen Amöbiasis (auch bekannt als Amöbenkolitis) oder einer extraintestinalen Amöbiasis (bekannt als ALA) kommen (Fotedar *et al.* 2007). Typische Symptome der Amöbenkolitis sind häufiges Auftreten von blutigen Diarrhöen, Kolitis, Bauchschmerzen und Fieber. Die extraintestinale Amöbiasis kann zu verschiedenen klinischen Symptomen führen, wie zum Beispiel fokale Läsionen im Parenchym, die sich als Fieber und Beschwerden im rechten Oberbauch äußern (Burchard & Tannich 2004).

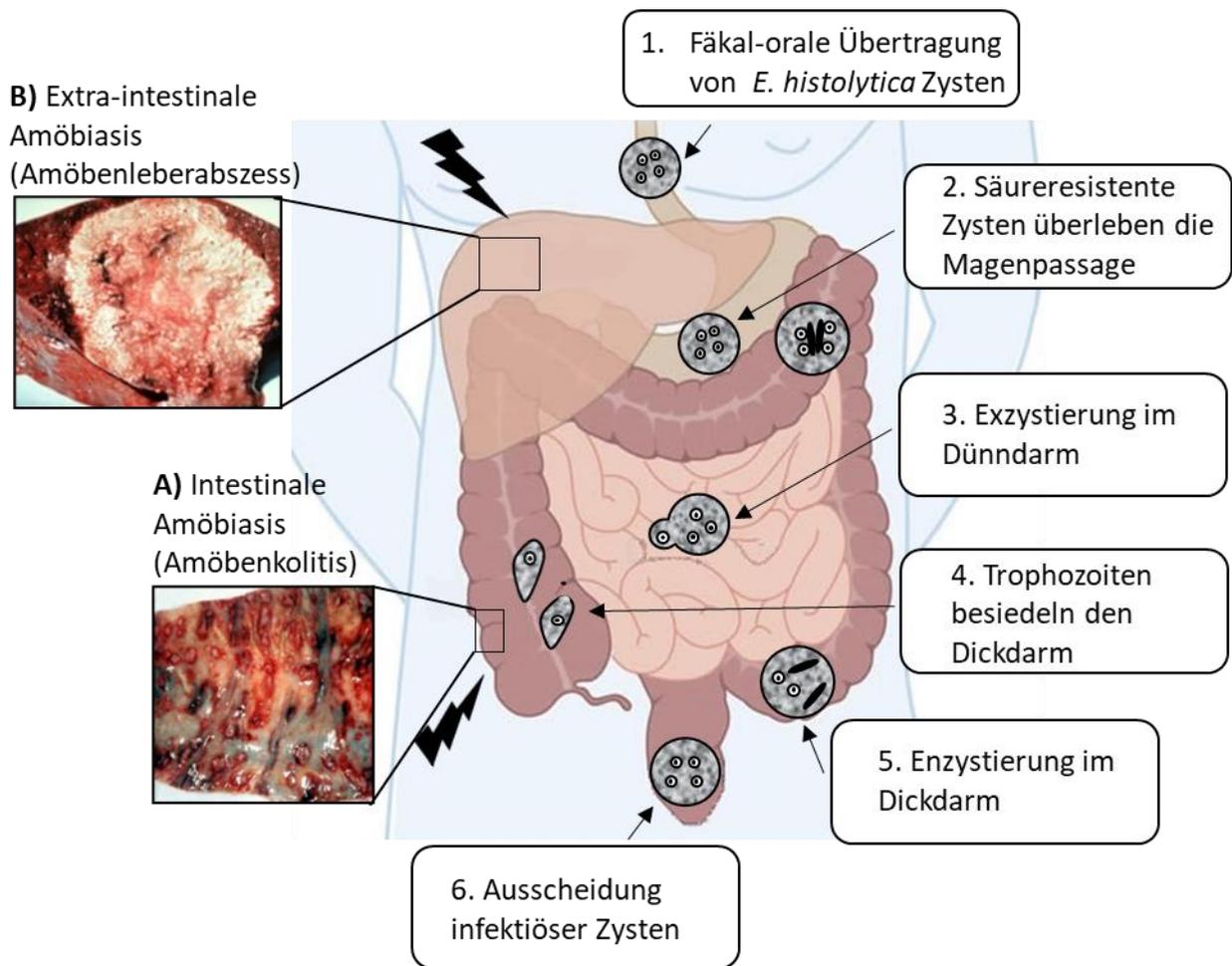


Abbildung 2: Lebenszyklus von *E. histolytica*.

Die Übertragung der infektiösen, säureresistenten, vierkernigen Zysten erfolgt fäkal-oral (1). Nach der Passage durch den Magen (2) erfolgt eine Exzystation (3), die zur Freisetzung von Trophozoiten führt. Weiterhin vermehren sich die Trophozoiten im Dickdarm durch Teilung, nachdem sie sich dort angesiedelt haben (4). Nach der Enzystierung (5) werden reife Zysten über den Stuhl ausgeschieden (6) und können einen neuen Wirt infizieren. Im Fall der intestinalen Verlaufsform der Amöbiasis (A) führen die Trophozoiten zu Schäden im Darmepithel und können sich über den Blutkreislauf in andere Organe, insbesondere die Leber, ausbreiten. In der Leber kommt es dann meist zur Bildung von ALA (B). Modifiziert durch Corinna Lender nach Wuerz *et al.* 2012.

1.1.4 Behandlungsmöglichkeiten

Die Infektion mit *E. histolytica* erfordert eine medikamentöse Behandlung. Zu diesem Zweck werden Kontaktamöbizide genutzt, die sich auf das Darmlumen beschränken und über einen Zeitraum von zehn Tagen verabreicht werden. Hierbei kommen Diloxanidfuroat (Furamide®) und Paromomycin (Humatin®) zum Einsatz, welche beide zur Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika gehören (YOUNG und FREED 1956; Blessmann *et al.* 2002). Durch Bindung an die Ribosomen blockiert Paromomycin die Proteinbiosynthese der Amöben. Gegenüber einer

Therapie mit Diloxanidfuroat wurde eine 34 % höhere Heilungsquote in einer Patientenstudie festgestellt (Blessmann *et al.* 2002).

Metronidazol (Clont® oder Flagyl®), Ornidazol und Tinidazol sind systemische Nitro-Imidazol-Derivate, die zur Behandlung der intestinalen und extraintestinalen Amöbiasis eingesetzt werden. Die Behandlung wird über einen Zeitraum von zehn Tagen fortgesetzt. Im Anschluss daran wird die Verwendung eines Kontaktamöbizids zur Beseitigung der luminalen Formen des Darms eingesetzt (Burchard & Tannich 2004; Haque *et al.* 2003; Powell 1969). Unter Anaerobie im Darm beseitigt das Antibiotikum Metronidazol Amöben, indem es Elektronen auf das Ferredoxin der Amöben überträgt und so Nitroradikale erzeugt, die irreparable Beeinträchtigung an DNA, Proteinen und Lipiden bewirken (Müller 1983). Eine alleinige Behandlung mit Metronidazol führt bei persistierenden Trophozoiten im Darm nicht zu einer vollständigen Eliminierung der Infektion (nur 40-60 %). Daher wird zur vollständigen Eliminierung der Infektion eine kombinierte Therapie mit Paromomycin durchgeführt. Bei einer frühzeitigen Diagnose und angemessenen medikamentösen Therapien, heilen ALA vollständig aus. Im Gegensatz dazu kann ein unbehandelter ALA eine hohe Sterblichkeitsrate verursachen.

1.2 Kulturoisolate am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM)

Zur Erforschung der Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* und zur Identifizierung potenzieller Medikamenten- und Impfstoffansätze werden zwei verschiedene Zelllinien (HM-1:IMSS-A und -B) untersucht. Ursprünglich stammt das Isolat HM-1:IMSS aus einem infizierten Patienten mit Amöbenkolitis und wurde im Jahr 1967 isoliert. Die Zelllinie HM-1:IMSS-B wurde direkt von der American Type Culture Collection (ATCC, Katalog Nr. 30459) im Jahr 1991 bezogen. HM-1:IMSS-A wurde dagegen im Jahr 2001 von Barbara Mann, Charlottesville, University of Virginia, an das BNITM gesendet wurde, die es als Teil einer Kultur nutzte, die für die Genomsequenzierung von *E. histolytica* verwendet wurde (Loftus *et al.* 2005). Obwohl beide Zelllinien vom gleichen Isolat abstammen, unterscheiden sie sich in ihrer Pathogenität. Während die B-Zelllinie im Tiermodell ALAs induziert, kann die Zelllinie A keine Abszesse induzieren (Biller *et al.* 2009).

Mit Hilfe der Zelllinien können Vergleichsstudien zwischen pathogenen und nicht-pathogenen *E. histolytica* durchgeführt werden, um mögliche Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren

(Biller *et al.* 2010; Biller *et al.* 2009; Meyer *et al.* 2016). Eine Darstellung der Zelllinien und ihrer Herkunft, inklusive der aus den Zelllinien hervorgegangenen Klone, die in dieser Studie eingesetzt werden, wird in Abbildung 3 gezeigt.

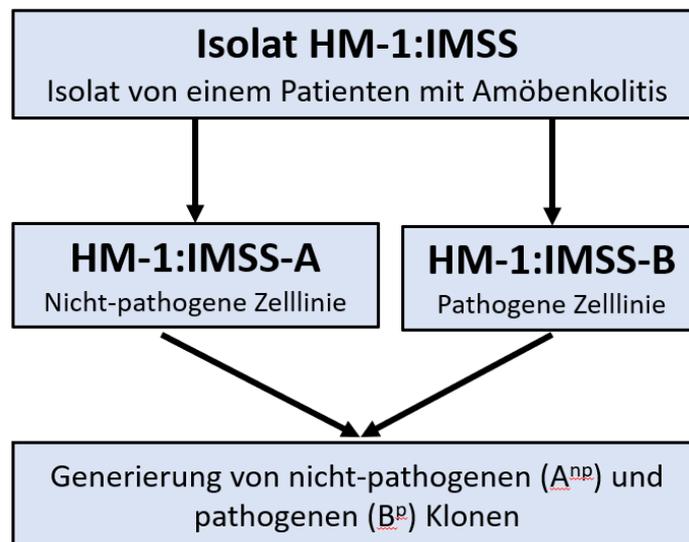


Abbildung 3: Zusammenfassung der verwendeten *E. histolytica*-Zelllinien und ihrer Herkunft.

Das Isolat HM-1:IMSS resultierte in zwei unterschiedlichen Zelllinien – HM-1:IMSS-A, welche nicht-pathogen ist, und HM-1:IMSS-B, welche pathogen ist. Aus den erzeugten Klone der beiden Linien wurde in dieser Studie ein nicht-pathogener Klon (A1^{np}) und ein pathogener Klon (B2^p) eingesetzt.

Trotz des gleichen Ursprungs gibt es Unterschiede in dem Expressionsprofil bei beiden Zelllinien (Biller *et al.* 2010; Biller *et al.* 2014). Es stellt sich heraus, dass beide Zelllinien bezüglich morphologischer und biochemischer Merkmale, sowie ihrer Pathogenität Unterschiede aufweisen. Bei der Untersuchung der Zelllinien ergab sich, dass Zelllinie A eine höhere hämolytische Aktivität im Vergleich zu Zelllinie B aufweist. Auch hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies und der Fähigkeit, Erythrozyten zu phagozytieren, konnten Unterschiede festgestellt werden (Biller *et al.* 2009).

Um eine homogene Zellpopulation für zukünftige Studien zu gewährleisten, wurden jeweils zwölf Klone aus beiden Zelllinien generiert (A1-A12, B1-B12) (Meyer *et al.* 2016; Dissertation Matthiesen, 2012). Dabei wurden die Klone auf Pathogenität untersucht, indem die Größe der ALA in *Meriones unguiculatus* sieben Tage nach Infektion gemessen wurde. Die Untersuchungen ergaben, dass die Klone der Zelllinie HM-1:IMSS-A keine oder lediglich kleine ALAs ausbilden können (siehe Abbildung 4). Daraus lässt sich schließen, dass diese Zelllinie einen nicht-

pathogenen Phänotyp aufweist. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Klonen der Zelllinie HM-1:IMSS-B, dass sie in der Lage sind, ALAs auszubilden, jedoch variierte ihre Pathogenität stark von avirulent (Klon B8^{np}) bis hin zu hochgradig virulent (Klon B2^p) (Meyer *et al.* 2016; Biller *et al.* 2009). Daher wurde der Klon A1^{np} als nicht-pathogen und der Klon B2^p als pathogen für weitere Untersuchungen verwendet.

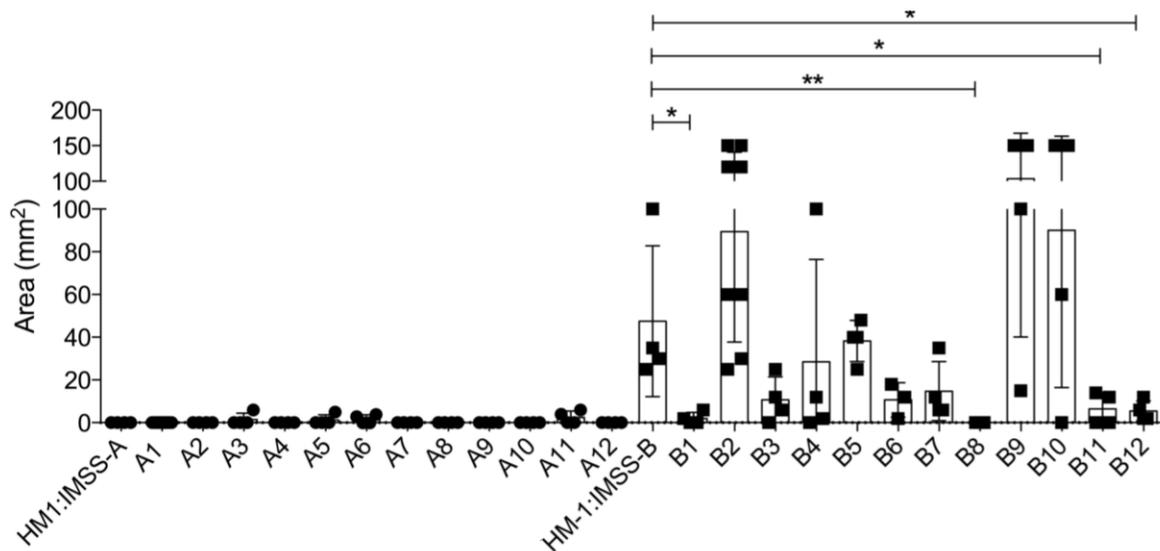


Abbildung 4: Prüfung der Pathogenität von Trophozoiten aus *E. histolytica* HM-1:IMSS Zelllinien A und B und deren Klone A1-A12 und B1-B12, durch Analyse ihrer Fähigkeit, ALAs im *Meriones unguiculatus* Tiermodell auszubilden. (Dissertation Matthiesen, 2012; Meyer *et al.* 2016)

1.3 Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

Die Eigenschaft von *E. histolytica* Gewebe zu zerstören, definiert seine virulente Natur bei der invasiven Form der Amöbiasis. Pathogenitätsfaktoren und die Immunantwort des Wirtes sind wichtige Faktoren in der Pathogenese des Protozoenparasiten. Der Zerstörungsprozess startet, wenn sich Trophozoiten an Zuckern auf den Zellen des Darms heften. Danach erfolgt eine Wanderung in tiefere Schichten, eine Induktion von Apoptose und die Aufnahme abgestorbener Zellen durch die Trophozoiten (Ralston und Petri 2011). Eine Immunreaktion, die zur Abszessbildung beitragen kann, wird durch die Aktivität der Parasiten ausgelöst (Bruchhaus und Matthiesen 2014). Außerdem tragen als Pathogenitätsfaktoren bezeichnete Proteine zu diesen Prozessen bei und fördern ihre Wirkung. Drei Proteinfamilien, Cysteinpeptidasen, Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin spezifisches Lektin (Gal/GalNAc Lektine) und *amoebapores*, wurden als wichtige Faktoren bei der Ausbildung der extraintestinalen Form einer

E. histolytica-Infektion identifiziert. Diese Proteine beeinflussen Prozesse der Zelladhäsion, der Lyse und der Zerstörung von Gewebe.

1.3.1 Cysteinpeptidasen als Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

Die meisten Cysteinpeptidasen in *E. histolytica* fallen in die Kategorie der Clan-CA-Peptidasen, mit einer molekularen Größe von 16 bis 96 kDa. Als Hydrolase-Enzyme sind sie für den Abbau von Proteinen verantwortlich und bilden die größte Gruppe von Peptidasen bei *E. histolytica*. Die Rolle der Cysteinpeptidasen wird vorrangig mit dem Überleben des Parasiten und der Zerstörung des Darmgewebes des Wirts in Verbindung gebracht. Cysteinpeptidasen tragen zur Zerstörung der Mukusschicht, der Invasion und Gewebeerstörung bei, wodurch sie eine essentielle Rolle bei der Entstehung von ALAs spielen (Ocadiz *et al.* 2005; Leippe *et al.* 1995; Lidell *et al.* 2006; Thibeaux *et al.* 2013).

Während einer Invasion von *E. histolytica* greifen diese Peptidasen die Schleimschicht des Dickdarms an und führen zur Zerstörung von Wirtszellen sowie zum Abbau der extrazellulären Matrix (Moncada *et al.* 2003; Laughlin und Temesvari 2005). Darüber hinaus beeinträchtigen sie die Verbindungen zwischen Zellen und umgehen die Immunantwort durch Abbau von Immunglobulinen und dem Komplement-System (Que und Reed 2000). Innerhalb des *E. histolytica*-Genoms wurden durch Homologievergleiche 50 Cysteinpeptidasen identifiziert, die die größte Gruppe der Peptidasen darstellen (Clark *et al.* 2007; Tillack *et al.* 2007). In einer *in-vitro*-Kultur von *E. histolytica* werden fast 90 % der exprimierten Cysteinpeptidasen durch EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 gebildet, die eine zentrale Rolle bei der Pathogenität des Parasiten spielen können. Außerdem ist eine starke Expression von EhCP-A3 und EhCP-A7 auch feststellbar, welche gemeinsam mit EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5 die Hauptgruppe der EhCPs bilden. Cysteinpeptidasen, insbesondere EhCP-A1, EhCP-A2 und EhCP-A5, zeigen eine erhöhte Fähigkeit extrazelluläre Matrixkomponenten, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen, abzubauen (Espinosa-Cantellano und Martínez-Palomo 2000). Weiter wird vermutet, dass Cysteinpeptidasen in der Lage sind, sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort des Wirts zu hemmen (Garcia-Nieto *et al.* 2008). Darüber hinaus wurde eine reduzierte Cysteinpeptidase-Aktivität in Zelllinie A im Vergleich zu Zelllinie B beobachtet (Biller *et al.* 2010). Diese Ergebnisse bekräftigen die bedeutende Rolle dieser Cysteinpeptidasen bei der Invasion des Parasiten in das Wirtsgewebe.

1.4 Putativer Pathogenitätsfaktor EHI_127670

In einer Studie wurde mittels vergleichender Transkriptomanalyse das Gen *ehi_127670*, das für das putative Protein EhHP127 kodiert, als potenzieller neuer Pathogenitätsfaktor identifiziert (Meyer *et al.* 2016). Dabei stellte sich heraus, dass dieses Gen im pathogenen Klon B2^P im Vergleich zu den nicht-pathogenen Klonen A1^{NP} und B8^{NP} deutlich höher exprimiert wird. Die Expression ist in B2^P im Vergleich zu A1^{NP} um den Faktor 192 erhöht.

In der vorliegenden Studie wurde festgestellt, dass die Überexpression von *ehi_127670* in den Trophozoiten der nicht-pathogenen Klone A1^{NP} und B8^{NP}, die Virulenz, wenn auch nicht signifikant, steigern konnte. Dies heißt, dass nicht alle Tiere nach Infektion mit den Transfektanten einen ALA ausgebildet hatten (Meyer *et al.* 2016).

In der Studie von (Matthiesen *et al.* 2019) wurde untersucht, ob das Silencen des Gens *ehi_127670* in den pathogenen B2^P *E. histolytica* eine Auswirkung auf die Pathogenität im Mausmodell hat. Die Ergebnisse zeigen, dass das Silencen zu einer signifikanten Reduktion der ALA-Bildung im Vergleich zum Wildtyp B2^P führte.

Folglich konnte anhand der Ergebnisse *ehi_127670* als möglicher Pathogenitätsfaktor identifiziert werden, der einen Einfluss auf die Entwicklung von ALAs hat (Meyer *et al.* 2016).

1.4.1 Lokalisierung von EHI_127670

In vorangegangenen Arbeiten wurde das myc-markierte EHI_127670-Fusionsprotein mit Hilfe von Western Blot Analysen in der unlöslichen Fraktion lokalisiert. Anschließende Immunofluoreszenzanalysen ergaben eine Lokalisierung des putativen Proteins in offenbar membrangebundenen Vesikeln im Cytoplasma, die als "undefinierte Granulae" bezeichnet werden (siehe Abbildung 5).

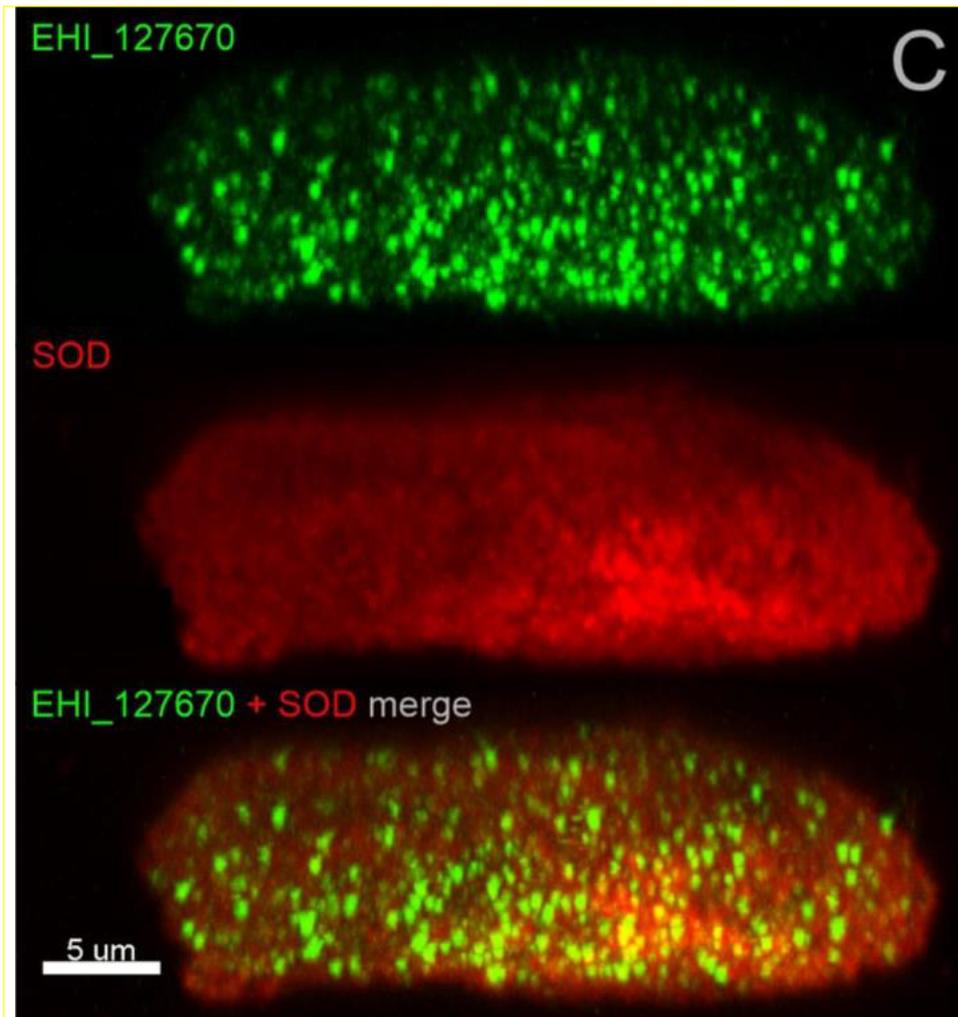


Abbildung 5: Konfokale Bildgebung von EHI_127670 und SOD (Superoxide Dismutase) in fixierten Zellen unter Verwendung von Saponin-Permeabilisierung und Immunfluoreszenzfärbung.

Seitenansicht der Zelle in drei Modi (grün, rot und fusioniert) zum Nachweis von EHI_127670-Myc und SOD, sowohl einzeln als auch fusioniert. 3D-Modell aus 55 Einzelschnitten mit Imaris zusammengesetzt (Bachelorarbeit von A. Hellhund, 2021).

1.5 *Silencing* und Überexpressionstransfektanten

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *E. histolytica* Transfektanten verwendet, in denen das Gen *ehi_127670* entweder überexprimiert oder herunterreguliert ist. Überexpression bezieht sich dabei auf eine erhöhte Expression des Gens *ehi_127670* in den Trophozoiten, während *Silencing* eine Hemmung der Expression bedeutet. In der vorliegenden Arbeit werden die beiden Klone, die eine veränderte Genexpression von *ehi_127670* aufweisen, wie folgt bezeichnet: B2^P *ehi_127670* Si (B2^{Si}) für das herunterregulierte Gen, A1^{NP} *ehi_127670* ÜE (A1^{ÜE}) für das überexprimierte Gen, sowie A1^{NP} *ehi_127670* Myc (A1^{Myc}) bzw. B2^P *ehi_127670* Myc (B2^{Myc}) für die überexprimierten Gene mit einem Myc-Tag. Für die Bestimmung der

Cysteinpeptidase-Aktivität wurden B2^{Si} und B2^P verwendet. *Silencer* tragen kein Plasmid mehr, weswegen die B2^P die richtige Kontrolle sind. Weiterhin wurde für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität A1^{pNC}, A1^{Myc} und A1^{ÜE} sowie B2^{pNC} und B2^{Myc} eingesetzt. Hierbei wurden Trophozoiten der Klone A1^{np} und B2^P mit dem leeren Vektor pNC transfiziert, um eine Kontrolle zur Überexpression zu generieren, da die Transfektion selbst einen Einfluss haben kann. Die A1^{Myc} und B2^{Myc} Transfektanten überexprimieren das Gen *ehi_127670* und tragen einen Myc-tag zur Lokalisierung, wobei das daraus synthetisierte Protein mit Myc fusioniert ist (Matthiesen 2009). Die transfizierten Amöben wurden für diese Arbeit bereitgestellt.

1.6 Zielsetzung

Die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren bei der Erforschung von *E. histolytica* wurde bereits ausgiebig untersucht. Dennoch ist der grundlegende Mechanismus für die Entstehung der Virulenz bislang noch weitestgehend unaufgeklärt. Die Charakterisierung von *E. histolytica*-assoziierten Pathogenitätsfaktoren spielt eine zentrale Rolle bei der Aufklärung von Mechanismen, die zur Entstehung der Virulenz führen. Neueste Forschungsergebnisse haben eine Reihe von möglichen Pathogenitätsfaktoren aufgedeckt, darunter Cysteinpeptidasen, Gal/GalNAc Lektine, sowie *amoebapores* (Ralston und Petri 2011). Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass die Expression des Gens *ehi_127670* einen Einfluss auf die Pathogenität ausübt (Meyer *et al.* 2016). Daher ist es von großer Bedeutung, das putative Protein, das von dem Gen *ehi_127670* kodiert wird, zu untersuchen.

In vorherigen Arbeiten wurde zur Charakterisierung des putativen Pathogenitätsfaktors EHI_127670, die Cysteinpeptidase-Aktivität der B2^P und B2^{Si}, bestimmt. Es wurden jedoch widersprüchliche Ergebnisse ermittelt. Es wird vermutet, dass die Konfluenz einen Einfluss auf die Cysteinpeptidase-Aktivität haben könnte, da diese unterschiedlich eingeschätzt worden ist. Um das herauszufinden, wurde die Cysteinpeptidase-Aktivität bei verschiedenen Konfluenzen bestimmt.

- Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich das *Silencing* des Gens *ehi_127670* auf die Cysteinpeptidase-Aktivität der pathogenen Trophozoiten B2 in Abhängigkeit von der Konfluenz auswirkt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des putativen Pathogenitätsfaktors EHI_127670 von *E. histolytica* hinsichtlich seines Einflusses auf die hämolytische Aktivität. Mit

dem Hämolyse-Assay soll die Fähigkeit von *E. histolytica*-Klonen zur Lyse von Erythrozyten bestimmt werden.

- Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die hämolytische Aktivität von sowohl A1^{pNC}, A1^{Myc} und A1^{ÜE}, als auch von B2^{pNC} und B2^{Myc} analysiert.

2. Material

2.1 Geräte und Software

In den unten aufgelisteten Tabelle 1 und Tabelle 2 sind alle Geräte, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sowie die verwendeten Softwares, einschließlich ihrer Hersteller aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Herstellern

Geräte	Typ	Hersteller
Lichtmikroskop	Eclipse TS100	Nikon
Inkubator	Heratherm IGS750	Thermo Scientific
Inkubator	Function Line	Heraeus
Einkanalpipetten	Pipetman R52470L	Gilson
Sterilwerkbank	Hera Safe	Heraeus
Vortexer	Vortexgenie 2	Scientific Industries
Magnetrührer	RCT	Ika Combimag
Pipettierhilfe	S1 Pipet Filler	ThermoFisher Scientific
pH-Meter	Lab 850	Si Analytics
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifuge	Cpkr Centrifuge	Beckman
Feinwaage	410	Kern
ELISA-Reader	MRX®	DYNEX Magellan
Wasserbad	Typ 1092	GFC
Heizblock	ThermoMixer C	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Varifuge 3.0 R GPKR Centrifuge	Heraeus Sepatech Beckmann Coulter
Multipipette	20 – 300 µl	Rainin

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Softwares mit Herstellern

Software	Hersteller
Prism 9.2.0	Graphpad
Excel 2209	Microsoft Corporation
ImageJ2 2.3.0/1.53p	Java
ELISA-Reader G 3.2	DYNEX Magellan

2.2 Chemikalien

In der unten aufgelisteten Tabelle 3 sind alle Chemikalien, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, mit Herstellern aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien mit Herstellern

Chemikalie	Hersteller
Ascorbinsäure	VWR
Adultes Rinderserum	Capricorn Scientific
Diamond Vitamin Tween 80 Lösung	biozol
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fe(III)-Ammoniumcitrat	Sigma-Aldrich
Glukose	Roth
Hefeextrakt	Becton und Dickinson
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
L-Cystein	US Biological Life Sciences
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Fluka Chemicals
Geneticin G418	Gibco
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	Capricorn Scientific
Salzsäure (HCl)	Roth
Trypticase	Becton und Dickinson
Z-Arg-Arg-pNA	BACHEM

2.3 Verbrauchsmaterialien

In der unten aufgelisteten Tabelle 4 sind alle Verbrauchsmaterialien, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, mit Herstellern aufgeführt.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialliste mit Herstellern

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf
2,0 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf
15 mL Schraubröhre	Sarstedt
50 mL Schraubröhre	Sarstedt
Mikrotestplatte 96 <i>Well</i>	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²)	Marienfeld
Objektträger	Engelbrecht Medizin & Labortechnik
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Nerbe plus
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt
T25 Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Falcon
T12,5 Zellkulturflaschen (12,5 cm ²)	Falcon

2.4 Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind im Folgenden aufgelistet. Diese wurden mittels Dampfdrucksterilisation (Sterilisationszeit: 20 min; Temperatur: 121°C; Überdruck: 1,2 bar) sterilisiert. Der pH-Wert wurde mithilfe von NaOH oder HCl eingestellt.

Cysteinpeptidaseassay-Puffer:

KH ₂ PO ₄	0,1 M
EDTA	2 mM
DTT (kurz vor Gebrauch)	1 mM
ad ddH ₂ O	
pH	7,0

Substrat (Z-Arg-Arg-pNA):

Z-Arg-Arg-pNA	5 mM
ad DMSO	
Lagerung	-20°C

NaPBS (1x):

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	6,7 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	3,3 mM
NaCl	140 mM
ad ddH ₂ O	
pH	7,2

2.5 Kulturmedien und Medienzusätze

In **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.** ist die Zusammensetzung des TY-I-SS Mediums zu finden.

Tabelle 5: Zusammensetzung TY-I-SS Medium

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

Das TY-I-SS Medium (Diamond *et al.* 1978) wurde für die *E. histolytica* Kulturen verwendet. Die Zutaten des TY-I-SS Mediums wurden in 4,34 l ddH₂O gelöst und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt, indem 6 M NaOH verwendet wurden. Anschließend wurde es auf das Endvolumen von 4,35 l aufgefüllt. In zehn 500 mL Laborglasflaschen wurden jeweils 435 mL des inkompletten TY-I-SS Mediums gefüllt und 20 min bei 120°C und 1,4 bar in einem Dampfkochtopf

sterilisiert. Die Komplettierung des TY-I-SS Mediums erfolgte durch Zugabe von jeweils 50 mL adultem Rinderserum (vorher 2 × 30 min bei 56°C inaktiviert), 15 mL Vitamin Tween 80 und 5 mL Penicillin/Streptomycin Lösung (100x) zu 435 mL inkomplettiertem TY-I-SS Medium. Das komplettierte TY-I-SS Medium wurde bei 4°C gelagert und innerhalb von 14 Tagen verbraucht.

2.6 Reaktionskits

In der untenstehenden Tabelle 6 ist das in dieser Arbeit verwendete Reaktionskit mit Hersteller aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Reaktionskits mit Herstellern

Reaktionskit	Hersteller
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific

2.7 Verwendete Organismen

2.7.1 *Entamoeba histolytica*

Taxonomische Gliederung:

Domäne: Eukaryota
 Stamm: Amoebazoa
 Klasse: Archamoebae
 Gattung: Entamoeba
 Art: *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903)

Die *E. histolytica* Zelllinien in dieser Studie stammen aus dem Isolat HM-1:IMSS (ATCC Katalognr. 30459), das 1964 aus einem männlichen Patienten mit Amöbenkolitis isoliert wurde. Die Zelllinie A des HM-1:IMSS-Kulturisolats ist nicht-pathogen, da sie im Tiermodell keine ALA induziert. Im Gegensatz dazu ist die Zelllinie B des HM-1:IMSS-Kulturisolats pathogen, da sie im Tiermodell ALA verursachen kann (Biller *et al.* 2009). 12 Klone wurden aus jeder der Zelllinien A und B des Kulturisolats HM-1:IMSS generiert (Matthiesen 2012). In dieser Studie wurde der Klon A1^{np} und B2^p, die von der HM-1:IMSS-A Zelllinie bzw. HM-1:IMSS-B Zelllinie abstammt, verwendet (Meyer *et al.* 2016). Die beiden Zelllinien sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Zelllinien von *E. histolytica*

Zelllinie	Ursprung	Am BNITM in Kultur seit
HM-1:IMSS – A	American Type Culture Collection	2001
HM-1:IMSS – B	American Type Culture Collection	1991

In dieser Untersuchung wurde mit *E. histolytica* Transfektanten gearbeitet, die das Gen *ehi_127670* entweder überexprimieren oder *silencen*. Die Transfektanten wurden bereitgestellt (Lender 2019). In Tabelle 8 sind die eingesetzten Transfektanten aufgeführt.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Transfektanten

Transfektant	Art	Zelllinie
A1 ^{pNC}	Leervektor (Kontrolle)	HM-1:IMSS-A
A1 ^{Myc}	Überexpression von <i>ehi_127670</i> + Myc-tag	HM-1:IMSS-A
A1 ^{ÜE}	Überexpression von <i>ehi_127670</i>	HM-1:IMSS-A
B2 ^{pNC}	Leervektor (Kontrolle)	HM-1:IMSS-B
B2 ^{Myc}	Überexpression von <i>ehi_127670</i> + Myc-tag	HM-1:IMSS-B
B2 ^{Si}	<i>Silencing</i> von <i>ehi_127670</i>	HM-1:IMSS-B

2.7.2 Humane Erythrozyten

Für den Hämolyse-Assay wurden humane Erythrozyten (Blutgruppe 0) verwendet. Diese Zellen wurden von einer Blutbank als Spenderblut aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) bezogen.

3. Methoden

3.1 Kultivierung von *E. histolytica* Trophozoiten

Für die Studie wurden *E. histolytica* Trophozoiten unter mikroaerophilen und axenischen Bedingungen bei 37 °C in 12,5 cm² Kulturflaschen kultiviert. Dazu wurde komplettiertes TY-I-SS Medium (Diamond *et al.* 1978) bei transfizierten Amöben mit dem Zusatz von 20 µg/mL Selektionsmarker *Genetecin*[®] (G418) verwendet. Die Passage wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Das alte TY-I-SS Medium wurde entfernt und die adhärennten Trophozoiten durch Schütteln in einer vordefinierten Menge frischen TY-I-SS Mediums aufgenommen. Die Schätzung der Teilungsrate unter dem Lichtmikroskop diente als Grundlage, um ein bestimmtes Volumen in eine neue Kulturflasche zu übertragen und diese mit frischem komplettiertem TY-I-SS Medium aufzufüllen. Um eine möglichst anaerobe Umgebung zu schaffen, wurden die Zellkulturflaschen vollständig mit TY-I-SS Medium gefüllt.

3.2 Ernte von *E. histolytica* Trophozoiten

Die Trophozoiten wurden zunächst für die Experimente geerntet. Dazu wurden die Trophozoiten in Kulturflaschen so eingesät, dass sich nach 24 h ein konfluenter Zellrasen gebildet hat. Das TY-I-SS Medium wurde aus der Flasche entfernt und der Zellrasen durch Schütteln in 10 mL kaltem NaPBS gelöst. Die Zellsuspension wurde in eine 15 mL Schraubröhre übertragen und bei 4°C und 400 x *g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde anschließend noch einmal in 5 mL kaltem NaPBS durch Zentrifugation bei 4°C und 400 x *g* für 5 min gewaschen. Das resultierende Zellsediment wurde in 1 mL NaPBS resuspendiert.

Für die Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität (siehe Abschnitt 3.7) wurde das Zellsediment in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen und bei Raumtemperatur und 1000 x *g* für 5 min zentrifugiert. Die Trophozoiten wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität wurden die Trophozoiten gezählt (siehe Abschnitt 3.3) und anschließend für den hämolytischen Assay (siehe Abschnitt 3.8) verwendet.

3.3 Zellzahlbestimmung

Die Neubauer Zählkammer wurde verwendet, um die benötigten Zellzahlen (siehe Abschnitt 3.2) und Erythrozyten (siehe Abschnitt 3.8) zu ermitteln. Für die Zellzahlbestimmung wurden 10 µL der Zellsuspension in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter Verwendung eines Durchlichtmikroskops wurden für die Bestimmung der Trophozoitenzellzahlen vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro mL konnte mithilfe der folgenden Formel berechnet werden:

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

Für die Bestimmung der Erythrozytenzellzahlen wurden vier Kleinquadrate ausgezählt. Die folgende Formel diente zur Berechnung der Zellzahl pro mL:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \text{Gesamtzellzahl in ausgezählten Kleinquadraten} \times 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.4 Bestimmung der Konfluenz

Für die Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität (siehe Abschnitt 3.7) sollten die benötigten Trophozoiten so eingesät werden, dass sich nach 24 h ein 30 %, 60 %, 90 % oder > 100 % konfluenter Zellrasen gebildet hat. Pro Transfektante und Konfluenz wurden vier biologische Replikate untersucht. Nach 24 h wurde der gebildete Zellrasen unter einem Mikroskop untersucht und es wurden Bilder aufgenommen. Die Konfluenz des gewachsenen Zellrasens wurde durch Analyse der aufgenommenen Bilder mithilfe des Programms ImageJ2 bestimmt. Dabei wurden die Bilder mit einem schwarzen Hintergrund aufgenommen, da das Programm die Zellen anhand der Helligkeitsunterschiede zwischen Zellen und Hintergrund erkennt und somit die Zellbedeckung der Fläche in Prozent ermittelt. Anschließend wurde im Programm *threshold* eingestellt, um den Hintergrund von den Zellen zu unterscheiden und somit die prozentuale Zellbedeckung der Fläche im Verhältnis zum Hintergrund zu berechnen. Bei einer Konfluenz von 90 % oder mehr war jedoch eine genaue Bestimmung mit dem Programm nicht möglich, da tote abgelöste Zellen im TY-I-SS Medium der Kulturschale schwimmen und das Ergebnis verfälschen könnten. Infolgedessen musste die Entscheidung mittels direkter

Beobachtung unter einem Mikroskop getroffen werden. Anschließend wurden die Trophozoiten geerntet (siehe Abschnitt 3.2).

Für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität (siehe Abschnitt 3.83.8) sollten die benötigten Trophozoiten so eingesät werden, dass sich nach 24 h ein 90 % konfluenten Zellrasen gebildet hat. Pro Transfektante und Konfluenz wurden mindestens vier biologische Replikate untersucht. Nach 24 h wurde der gebildete Zellrasen unter einem Lichtmikroskop beurteilt. Anschließend wurden die Trophozoiten geerntet (siehe Abschnitt 3.2).

3.5 Lysatherstellung aus *E. histolytica* Trophozoiten

Die Lyse der Trophozoiten wurde mittels der *freeze-and-thaw*-Methode durchgeführt. Dabei wurden die geernteten Trophozoiten (siehe Abschnitt 3.2) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei 37°C für 1 min im Heizblock aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden sie durch Vortexen gemischt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Das Lysat wurde anschließend bei 4°C und 12000 x g für 15 min zentrifugiert, um die lösliche und unlösliche Fraktion zu trennen. Die lösliche Fraktion wurde abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt mit vorgelegtem E-64 zur Hemmung von Proteasen zur Bestimmung des Proteingehalts (siehe Abschnitt 3.63.6) überführt und einen Teil der löslichen Fraktion in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß zur Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität (siehe Abschnitt 3.7). Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.6 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay

Der Proteingehalt in den Lysaten wurde mit dem BCA-Assay (Bicinchoninsäuretest, Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) gemessen. Hierfür wurde im Amöbenlysat (siehe Abschnitt 3.5) der Proteaseinhibitor E64 eingesetzt, um eine Verdauung der zelleigenen Proteine durch Cysteinpeptidasen zu verhindern. Die BCA Protein Assay Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die zu untersuchenden Proteinlösungen mit einem bicinchoninsäurehaltigen Puffer vermischt. Die Peptidbindungen des Proteins reagieren, wodurch Cu^{2+} quantitativ zu Cu^+ reduziert wird. Durch diese Reduktion entsteht mit

Bicinchoninsäure ein violetter Farbkomplex, dessen Absorption mittels ELISA-Reader bei 560 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Die Proteinkonzentration der Proteinlösungen wurde mittels einer Eichkurve ermittelt, die aus einer Reihe von Verdünnungen einer Bovines Serumalbumin (BSA) Stammlösung hergestellt wurde. Die Konzentrationen der Stammlösung und Verdünnungen lagen bei 2 mg/ mL, 1 mg/ mL, 0,5 mg/ mL, 0,25 mg/ mL, 0,125 mg/ mL, 0,0625 mg/ mL und 0,0325 mg/ mL. Zudem wurde jede Probe mit ddH₂O im Verhältnis 1:10 und 1:30 verdünnt oder unverdünnt verwendet. Es wurden drei technische Replikate pro Verdünnung pipettiert. Dabei wurden jeweils 10 µL der Probe einschließlich Lösungen der Verdünnungsreihe in 96-well-Plattenpipettiert. Der nächste Schritt bestand darin, Lösung A und Lösung B in einem Verhältnis von 1:50 miteinander zu mischen. Hierbei wurden 200 µL der gemischten Lösung auf die bereits in der 96-well-Platte befindlichen Proben aufgebracht. Anschließend wurde die Platte für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, bevor die Messung am ELISA-Reader unmittelbar danach vorgenommen wurde.

3.7 Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität

Um die spezifischen Cysteinpeptidaseaktivität zu bestimmen, wurden die geernteten *E. histolytica* Trophozoiten (siehe Abschnitt 3.2) zuerst lysiert (siehe Abschnitt 3.5) und im Lysat die Volumenaktivität (siehe Abschnitt 3.7.13.7.13.6) bestimmt.

3.7.1 Bestimmung der Volumenaktivität

Die spezifische Aktivität der Cysteinpeptidasen in den unterschiedlichen *E. histolytica* Klonen kann mit dem Cysteinpeptidase-Assay bestimmt werden. Zunächst wurde dazu die Volumenaktivität durch Messung des Umsatzes des synthetischen Substrats Z-Arg-Arg-pNA (Benzoyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid) durch die im Amöbenlysat (siehe Abschnitt 3.5) vorhandenen Cysteinpeptidasen bestimmt. Die Abspaltung des p-Nitroanilids (pNA) durch Cysteinpeptidasen führt zu einer gelblichen Färbung des Ansatzes, welche am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann. Hierfür diente eine transparente 96-well-Flachboden-Platte zur Durchführung des Experiments. Zuerst wurden 148 µL Cysteinpeptidasepuffer, angereichert mit 1 mM DTT, in die 96-well-Platte gegeben. Daraufhin wurden 2 µL Amöbenlysat (unverdünnt und 1:5 verdünnt mit ddH₂O) und 50 µL Z-Arg-Arg-pNA

(100 µM Endkonzentration) hinzugefügt. Die Z-Arg-Arg-Verdünnung wurde direkt vor der Messung angesetzt und zügig pipettiert. Anschließend wurde die Änderung der Extinktion über einen Zeitraum von 30 min gemessen. Die Volumenaktivität wurde mithilfe folgender Formel ermittelt:

$$\text{Volumenaktivität} \left(\frac{\text{mU}}{\text{mL}} \right) = \frac{\Delta E \times V_{\text{Messlösung}} (\text{mL}) \times 1000}{t (\text{min}) \times \epsilon_{405\text{nm}} (\text{cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}) \times V_{\text{Probe}} (\text{mL})}$$

ΔE = Änderung der Extinktion

$V_{\text{Messlösung}}$ = Volumen der Messlösung (mL)

t = Zeit (min)

$\epsilon_{405\text{nm}}$ = Stoffkonstante ($8,8 \text{ cm}^2 \times \mu\text{mol}^{-1}$)

V_{Probe} = Volumen der eingesetzten Probe (mL)

3.7.2 Bestimmung der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität

Die spezifische Cysteinpeptidase-Aktivität wurde durch Anwendung der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$\text{Spezifische Aktivität} \left(\frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Volumenaktivität} \left(\frac{\text{mU}}{\text{mL}} \right)}{\text{Proteingehalt} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

3.8 Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Das Ziel des hämolytischen Assays ist es, die Fähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten zur Lyse von Erythrozyten zu bestimmen. Nach zweimaligem Waschen der Erythrozyten mit 5 mL kaltem NaPBS durch Zentrifugation bei $400 \times g$ bei 4°C für 5 min wurden die Erythrozyten gezählt (siehe Abschnitt 3.3). Die jeweiligen Trophozoiten wurden in einem Verhältnis von 1:2000 mit den Erythrozyten gemischt. Dafür wurden $1,25 \times 10^5$ Trophozoiten mit $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten in insgesamt 1 mL warmem NaPBS angesetzt.

Die vorliegenden Proben für die nachfolgende Untersuchung waren die jeweiligen Trophozoiten zusammen mit Erythrozyten, eine Negativkontrolle (A_0) von $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten (in einem Gesamtvolumen von 1 mL warmem ddH₂O) und eine Positivkontrolle (A_{max}) $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten (in einem Gesamtvolumen von 1 mL warmem NaPBS). Wenn die Erythrozyten in ddH₂O aufgelöst werden, ergibt dies eine 100 %ige Hämolyse, während die Mischung mit NaPBS eine 0 %ige Hämolyse ergibt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in einem

Doppelansatz. Die Ansätze wurden nach einem kurzen *spin down* für 1 h bei 37°C im vorgewärmten Heißblock im 1,5 mL Reaktionsgefäß inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze bei 500 x *g* für 1 min zentrifugiert und 200 µL des jeweiligen Überstandes in eine transparente 96-*well*-Platte überführt. Die Hämolyse der Erythrozyten wurde dann mittels ELISA-*Reader* photometrisch bei 530 nm gemessen. Es wurden mindestens vier biologische Replikate analysiert.

Die Berechnung der hämolytischen Aktivität erfolgte mithilfe der folgenden Formel:

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

A = gemessene Extinktion der Probe nach Inkubation der Erythrozyten mit den jeweiligen Trophozoiten

A_{max} = maximale Hämolyse nach Inkubation der Erythrozyten mit ddH₂O

A₀ = Negativkontrolle nach Inkubation der Erythrozyten mit NaPBS

3.9 Statistik

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Software Prism analysiert, wobei verschiedene statistische Methoden angewendet wurden, wie beispielsweise der *Identify outliers* ROUT (Q = 1 %) zur Erkennung von Ausreißern. Weder bei der Cysteinpeptidase-Aktivität noch bei der hämolytischen Aktivität konnten Ausreißer identifiziert werden. Zur Bestimmung von Minimal-, Mittel- und Maximalwerten wurde *Descriptive statistics* verwendet. Zur Bestimmung statistischer Signifikanzen wurde *unpaired Student's t test* mit einem Signifikanzniveau von nicht signifikant > 0,05, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 verwendet.

4. Ergebnisse

Das Gen *ehi_127670* wird in *E. histolytica* als möglicher Pathogenitätsfaktor beschrieben und korreliert positiv mit der Pathogenität des Parasiten. Pathogenität wird hier als die Fähigkeit beschrieben, im Mausmodell ALAs auszulösen, die nicht innerhalb von sieben Tagen nach der Infektion ausheilen. Die Überexpression des Gens *ehi_127670* führt zu einer gesteigerten Fähigkeit von nicht-pathogenen A1 und B8 *E. histolytica* Trophozoiten, ALAs zu induzieren (Meyer *et al.* 2016). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der veränderten Expression des Gens *ehi_127670* auf Cysteinpeptidase- und die hämolytische Aktivität untersucht.

4.1 Einfluss des *Silencings* von *ehi_127670* auf die Cysteinpeptidase-Aktivität der *E. histolytica* Trophozoiten

Eine wesentliche Rolle bei der Virulenz von *E. histolytica* spielen die Cysteinpeptidasen, da sie an der Bildung von ALA beteiligt sind (Tillack *et al.* 2006). Ein Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, welche Auswirkungen das *Silencing* des Gens *ehi_127670* auf die Cysteinpeptidase-Aktivität in den pathogenen B2 Trophozoiten in Abhängigkeit von der Konfluenz hat. Zu diesem Zweck wurde die Cysteinpeptidase-Aktivität in den einzelnen Amöbenlysaten von B2^P und B2^{Si} bei jeweils 30 %, 60 %, 90 % und >100 % Konfluenz bestimmt. Die Cysteinpeptidase-Aktivität in den Lysaten wurde mithilfe des synthetischen Substrats Z-Arg-Arg-pNA, welches von den Cysteinpeptidasen abgebaut wird, ermittelt. Durch die Gelbfärbung, die durch die Abspaltung von p-Nitroanilin (pNA) vom Substrat verursacht wird, wurde mit Hilfe einer photometrischen Messung bei 405 nm quantifiziert. Durch die Bestimmung der optischen Dichte pro Minute konnte die Aktivität der Cysteinpeptidasen berechnet werden. Die spezifische Aktivität wurde anhand dieser Werte und der zuvor im BCA-Assay bestimmten Proteinkonzentration der Lysate berechnet (siehe Abschnitt 3.6 und 3.7).

Die Mittelwerte der gemessenen Cysteinpeptidase-Aktivitäten bei den verschiedenen Konfluenzgraden (30 %, 60 %, 90 %, und >100 %) von B2^P und B2^{Si} *E. histolytica* sind in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt. Vor der statistischen Auswertung wurden die Daten mit Hilfe der *Identify Outliers* Funktion in Prism auf Ausreißer überprüft. Es wurden keine Ausreißer gefunden.

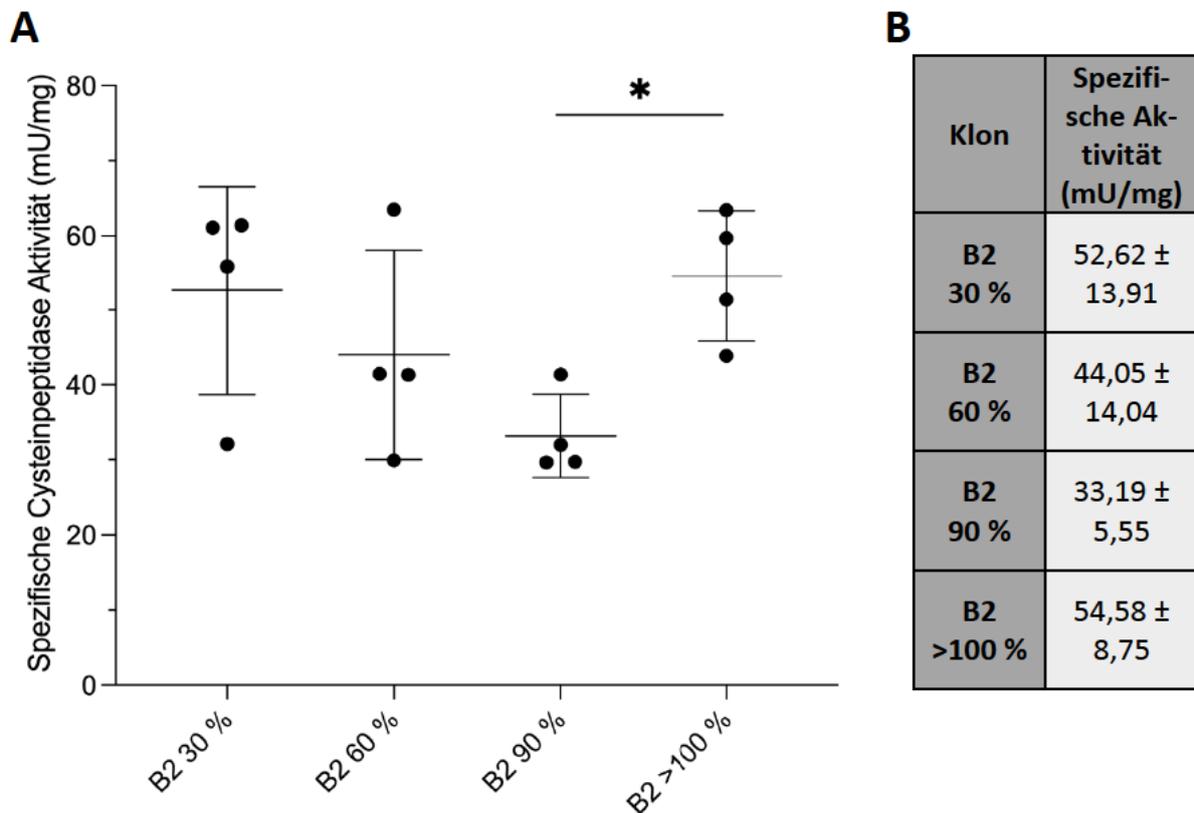


Abbildung 6: Spezifische Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) des *E. histolytica* B2^P Klon bei 30 %, 60 %, 90 % und > 100 % Konfluenz.

A) Vergleich spezifischer Cysteinpeptidase-Aktivität des B2^P Klon bei 30 %, 60 %, 90 % und >100 % konfluentem Zellrasen (n = 4, unpaired Student's t Test, * p ≤ 0,05. **B)** Mittelwerte und Standardabweichungen der Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg).

In Abbildung 6 zeigt sich, dass die spezifische Aktivität von B2^P bei einer Konfluenz von über 100 % mit 55 mU/mg signifikant höher ist als bei einer Konfluenz von 90 % mit 33 mU/mg (p = 0,0286). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Aktivität zwischen den anderen Konfluenzgraden festgestellt werden. Des Weiteren ist zu beobachten, dass mit zunehmender Konfluenz eine Abnahme der spezifischen Aktivität einhergeht, wobei die spezifische Aktivität bei einer Konfluenz von über 100 % wieder auf etwa die Höhe von 30 % Konfluenz steigt. Bei einer Konfluenz von 30 % beträgt die spezifische Aktivität 53 mU/mg, während sie bei >100 % Konfluenz bei 55 mU/mg am höchsten liegt, was einen Unterschied von 2 mU/mg darstellt.

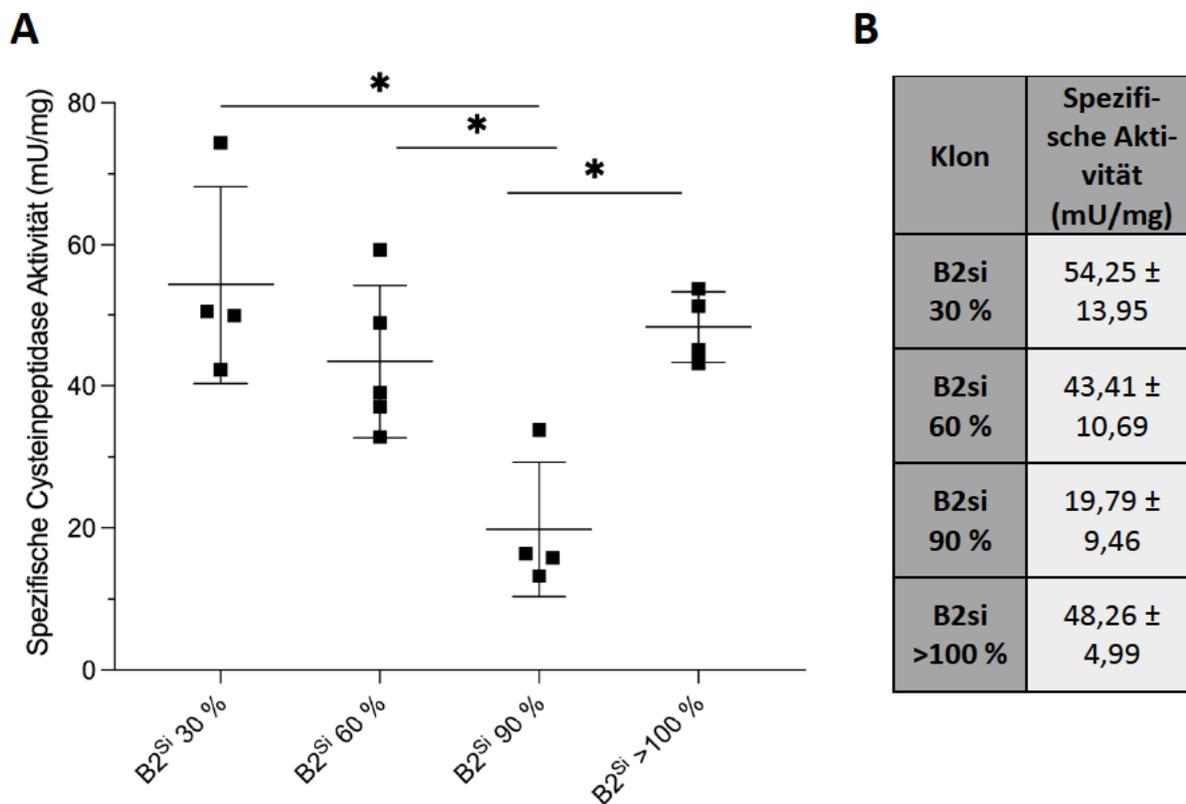


Abbildung 7: Spezifische Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) der *E. histolytica* B2^{Si} Transfektanten bei 30 %, 60 %, 90 % und > 100 % Konfluenz.

A) Vergleich spezifischer Cysteinpeptidase-Aktivität der B2^{Si} Transfektanten bei 30 %, 60 %, 90 % und >100 % konfluentem Zellrasen (n = 4-5, unpaired Student's t Test, * p ≤ 0,05. **B)** Mittelwerte und Standardabweichungen der Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg).

Die Ergebnisse in Abbildung 7 zeigen, dass die spezifische Aktivität von B2^{Si} bei 30 % Konfluenz mit 54 mU/mg (p=0,0286), bei 60 % Konfluenz mit 43 mU/mg (p=0,0317) und bei B2^{Si} >100 % Konfluenz mit 48 mU/mg (p=0,0286) signifikant höher ist als bei 90 % Konfluenz mit 20 mU/mg. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der spezifischen Aktivität zwischen den Konfluenzen von 30 % und 60 % oder 30 % und >100 % bei B2^{Si} festgestellt werden. Eine Abnahme der spezifischen Aktivität wurde hier auch mit zunehmendem Konfluenzgrad beobachtet, mit Ausnahme von >100 % Konfluenz, bei denen die Aktivität auf das Niveau von 30 % blieb. Die höchste spezifische Aktivität wird bei 30 % Konfluenz mit einem Unterschied von 6 mU/mg im Vergleich zu >100 % festgestellt.

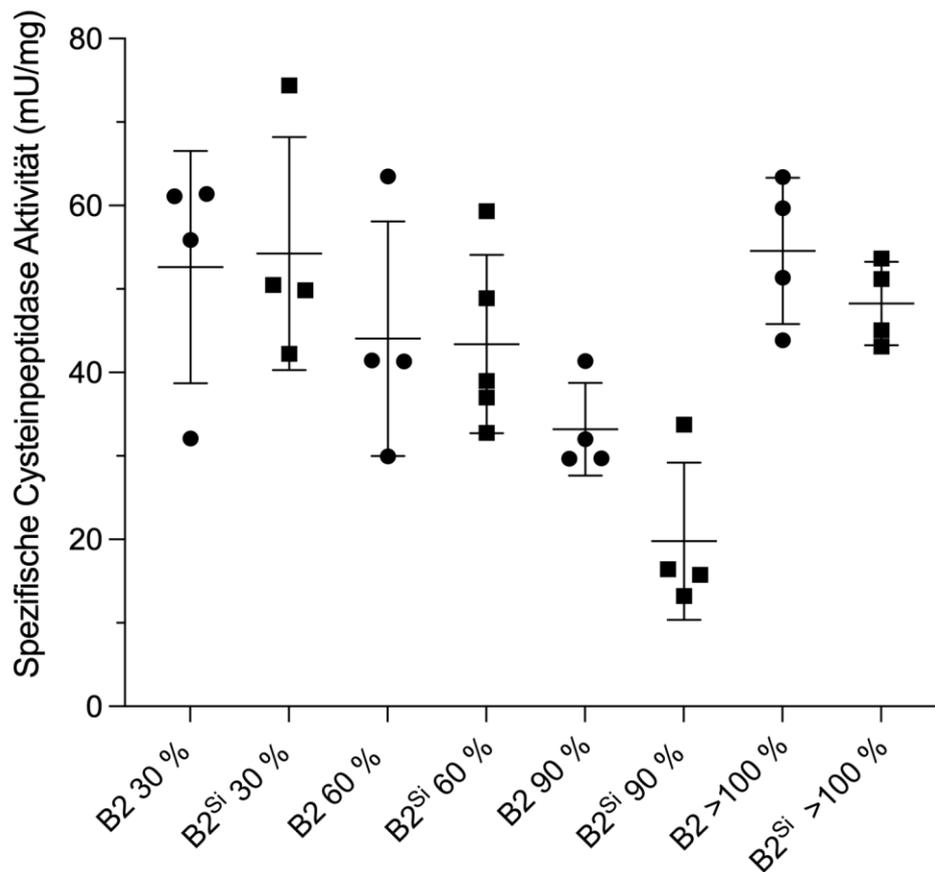
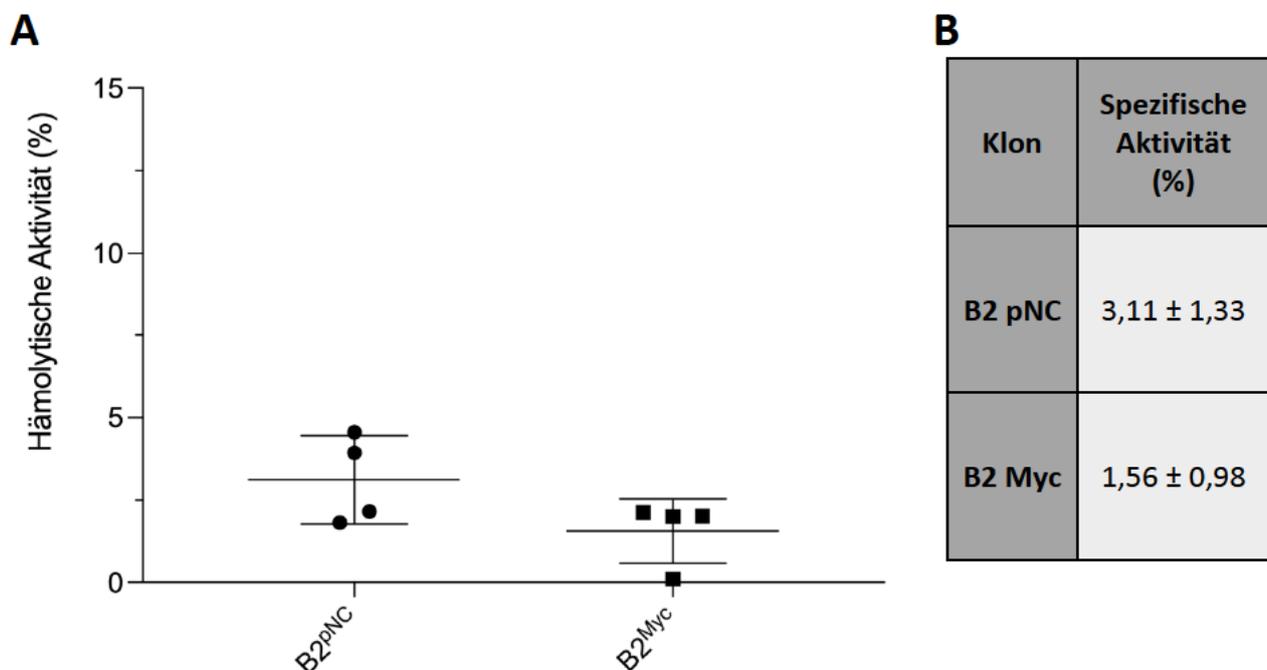


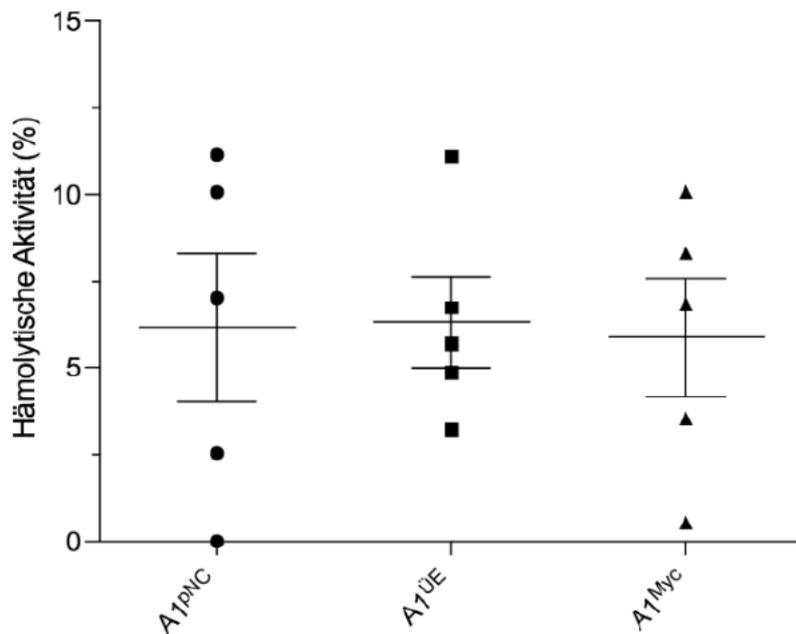
Abbildung 8: Vergleich der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) des *E. histolytica* B2^P Klons und der B2^{Si} Transfektanten bei 30 %, 60 %, 90 % und > 100 % Konfluenz.
(n = 4-5, unpaired Student's t Test).

Abbildung 8 zeigt den Vergleich der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität zwischen B2^P und B2^{Si} bei jeweils 30 %, 60 %, 90 % und >100 % Konfluenz. Basierend auf diesen Ergebnissen ergibt sich, dass das *Silencing* des Gens *ehi_127670* im Vergleich zur Kontrollgruppe B2^P keinen signifikanten Unterschied in der Cysteinpeptidase-Aktivität bei unterschiedlichen Konfluenzgraden bewirkt. Darüber hinaus sind die spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivitäten von B2^P und B2^{Si} bei den verschiedenen Konfluenzgraden fast identisch, außer bei 90 % Konfluenz, wo sie mit einer Differenz von 13 mU/mg am stärksten voneinander abweichen. Die geringste Abweichung von 1 mU/mg tritt bei 60 % Konfluenz auf. Abbildung 8 zeigt auch, dass die spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivitäten bei steigender Konfluenz in beiden *Silencer*- und Kontrollgruppen abnehmen. Allerdings steigt die Aktivität bei überwachsenen Zellkulturen auf ein ähnliches Niveau wie bei 30 % Konfluenz.

4.2 Einfluss der veränderten Genexpression von *ehi_127670* auf die hämolytische Aktivität der *E. histolytica* Trophozoiten

Die Fähigkeit von *E. histolytica*, Erythrozyten zu lysieren, wird als hämolytische Aktivität bezeichnet. Das Ziel dieses Experiments war es, die lysierende Fähigkeit von Erythrozyten bei A1^{np} und B2^{pE} *E. histolytica* Klonen zu untersuchen, die den putativen Pathogenitätsfaktor EHI_127670 überexprimieren. Es sollte hier daher untersucht werden, ob die erhöhte Expression von *ehi_127670* Auswirkungen auf die hämolytische Aktivität von *E. histolytica* hat. Durch die Verwendung des Hämolyse-Assays kann die Fähigkeit von Trophozoiten, Erythrozyten zu lysieren, quantitativ erfasst werden. Zur Durchführung des Experiments wurden Erythrozyten und Trophozoiten im Verhältnis von 1:2000 ($1,25 \times 10^5$ Trophozoiten und $2,5 \times 10^8$ Erythrozyten) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Wenn Erythrozyten lysiert werden, wird Hämoglobin freigesetzt, was durch Photometrie bei 530 nm mit einem ELISA-Reader gemessen wird. Die Absorptionswerte werden zur Berechnung der hämolytischen Aktivität (%) der *E. histolytica* Klone verwendet (siehe Abschnitt 3.8). Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.



C**D**

Klon	Spezifische Aktivität (%)
A1 pNC	6,16 ± 4,90
A1 ÜE	6,31 ± 2,96
A1 Myc	5,87 ± 3,83

Abbildung 9: Bestimmung der hämolytischen Aktivität verschiedener A1^{np} und B2^p Überexpressions-Transfektanten.

A) Bestimmung der hämolytischen Aktivität von B2^{Myc} Transfektanten im Vergleich zur Kontrollgruppe B2^{pNC}. **B)** Mittelwerte und Standardabweichungen (%) der Hämolyseaktivität von A). **C)** Bestimmung der hämolytischen Aktivität von A1^{ÜE} und A1^{Myc} Transfektanten im Vergleich zur Kontrollgruppe A1^{pNC}. **D)** Mittelwerte und Standardabweichungen (%) der Hämolyseaktivität von B). (n = 4-5, unpaired Student's t Test).

Die Ergebnisse der hämolytischen Aktivität in Abbildung 9 (A und B) zeigen, dass weder die Überexpression noch die Anwesenheit des Myc-Tags an *ehi_127670* in den *E. histolytica* Klonen A1^{np} und B2^p einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufweist. Die B2^{Myc} Transfektanten zeigen eine geringfügige Reduktion in der mittleren hämolytischen Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Im Gegensatz dazu weisen die Transfektanten des A1^{np} Klon eine sehr ähnliche durchschnittliche Aktivität von 6 % auf.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, den putativen Pathogenitätsfaktor EHI_127670 näher zu charakterisieren, da die derzeitigen Kenntnisse bezüglich seiner Funktion noch begrenzt sind. Zu diesem Zweck wurde der putative Pathogenitätsfaktor EHI_127670 hinsichtlich seines Einflusses auf die hämolytische und die Cysteinpeptidase Aktivität genauer untersucht.

Die Messung der Aktivität der Cysteinpeptidasen war von besonderem Interesse, da frühere Studien gezeigt haben, dass diese Enzyme einen Virulenzfaktor von *E. histolytica* darstellen und einen direkten Zusammenhang mit der Bildung von ALAs aufweisen (Gupta *et al.* 1998; Gadasi und Kessler 1983; Keene *et al.* 1990; Faust *et al.* 2011; Ankri *et al.* 1999). In früheren Studien wurde der Einfluss einer verringerten Expression des Gens *ehi_127670* auf die Cysteinpeptidase-Aktivität mittels *silencing* Transfektanten untersucht. Hierbei zeigte sich eine direkte Korrelation: eine Reduktion der Expression des Gens *ehi_127670* führte zu einer Senkung der Cysteinpeptidase-Aktivität (Matthiesen *et al.* 2019). Allerdings zeigten nachfolgende Studien divergente Ergebnisse. Es gab Studien, die das oben genannte Ergebnis bestätigten (siehe Abbildung 10, Masterarbeit von A. Haferkorn, 2018; unveröffentlichte Daten von J. Anders). Andererseits führte das *Silencing* in weiteren Untersuchungen zu einer signifikanten Erhöhung der Cysteinpeptidase-Aktivität im pathogenen Klon B2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 10, Masterarbeit von S. Nehls, 2020; unveröffentlichte Daten von A. Hellhund).

Die Cysteinpeptidase-Aktivität von *E. histolytica* Trophozoiten wird mithilfe eines *in vitro*-Assays bestimmt. Hierfür dient das Peptid pNA-Z-ArgArg als Substrat. Für die Bestimmung der Cysteinpeptidase-Aktivität in vergangenen Studien wurden normalerweise 90 % konfluente *E. histolytica* Trophozoiten verwendet. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Konfluenz in den oben beschriebenen Untersuchungen nicht doch stark variierte. Daher wurde in der vorliegenden Studie analysiert, ob eine unterschiedliche Konfluenz der Amöben eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse sein könnten. Daher wurde in dieser Studie die Cysteinpeptidase-Aktivität der *silencing* Transfektante und der entsprechenden Kontrolle bei verschiedenen Konfluenzen (30 %, 60 %, 90 %, >100 %) genauer untersucht.

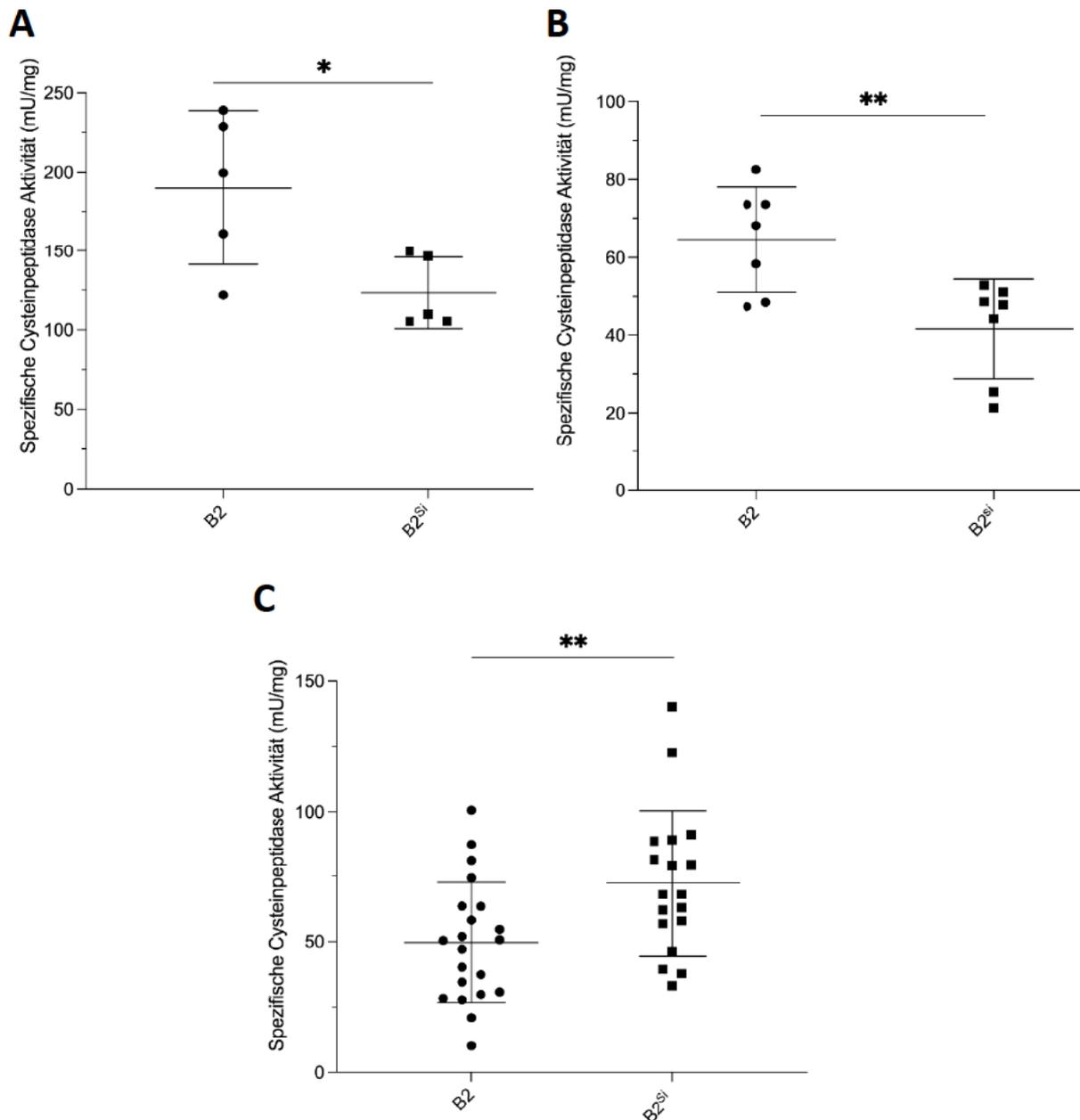


Abbildung 10: Darstellung der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität (mU/mg) in verschiedenen Studien bei B2^P und B2^{Si} *E. histolytica* Klonen.

Vergleich der spezifischen Cysteinpeptidase-Aktivität zwischen dem Kontrollgruppe B2^P und B2^{Si} Transfektanten durchgeführt von **A)** unveröffentlichte Daten von J. Anders, **B)** Masterarbeit von A. Haferkorn 2018, **C)** Masterarbeit von S. Nehls 2020.

Die vorliegenden Ergebnisse (siehe Abbildung 6) zeigen einen Trend zu einer niedrigeren Cysteinpeptidase-Aktivität bei 90 %iger Konfluenz von B2^P Amöben im Vergleich zu solchen mit 30 %iger Konfluenz ($p = 0,0571$). Bei Betrachtung der Veränderungen in der Cysteinpeptidase-Aktivität in Abhängigkeit von den verschiedenen Konfluenzgraden von B2^P scheint die Konfluenz keinen starken Einfluss auf die Cysteinpeptidase-Aktivität zu haben. Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse bei B2^{Si} anders (siehe Abbildung 7). Hier hat die Konfluenz einen stärkeren

Einfluss auf die Cysteinpeptidase-Aktivität. Beim Vergleich der Cysteinpeptidase-Aktivität von B2^P und B2^{Si} wurde ein Unterschied festgestellt, der am stärksten bei einer Konfluenz von 90 % war, jedoch nicht signifikant ist (siehe Abbildung 8). Dabei war die Cysteinpeptidase-Aktivität bei B2^{Si} niedriger als bei B2^P. Die zugrundeliegende Ursache für diesen spezifischen Effekt bei 90 % Konfluenz bleibt ohne weitere Untersuchungen unklar. Es handelt sich hierbei um eine beobachtete Tatsache, bei der jedoch aufgrund der begrenzten Kenntnisse über das putative Protein keine Aussage über den zugrundeliegenden Effekt getroffen werden kann. Es lässt sich lediglich ableiten, dass das *Silencing* des Gens *ehi_127670* einen Einfluss auf die Cysteinpeptidase-Aktivität hat. Im Tiermodell wurde beobachtet, dass die B2^{Si} Transfektanten nicht mehr in der Lage sind, ALAs zu bilden (Matthiesen *et al.* 2019). Aufgrund der vorliegenden Beobachtungen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das *silencing* von *ehi_127670* einen Einfluss auf die Cysteinpeptidase-Aktivität hat und dadurch möglicherweise weniger ALA verursacht. Des Weiteren ist eine Abnahme der Cysteinpeptidase-Aktivität festzustellen, je höher die Konfluenz ist (allerdings ist dies nicht signifikant). Ein Konfluenzgrad von über 100 % führt jedoch wieder zu einem Anstieg der Cysteinpeptidase-Aktivität. Obwohl die Cysteinpeptidase-Aktivität von B2^P bei 90 % und >100 % Konfluenz höher ist als die von B2^{Si} bei 90 % und >100 % Konfluenz, ist die Cysteinpeptidase-Aktivität von B2^{Si} bei 30 % Konfluenz geringfügig höher als die von B2^P bei 30 % Konfluenz. Es lässt sich zudem feststellen, dass die Cysteinpeptidase-Aktivität von B2^P bei >100 % Konfluenz im Vergleich zu B2^{Si} bei 90 % Konfluenz reduziert ist (Differenz: 34,79 mU/mg). Dieser Effekt wird jedoch umgekehrt, wenn B2^P mit 90 % Konfluenz mit B2^{Si} mit 60 % Konfluenz verglichen wird (Differenz: 10,22 mU/mg). Dieser Unterschied in der Cysteinpeptidase-Aktivität bei unterschiedlichen Konfluenzgraden könnte die vorherigen unterschiedlichen Ergebnisse erklären und lässt einen möglichen Zusammenhang zwischen Konfluenzgrad und Aktivität vermuten. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede bei den mittleren Cysteinpeptidase-Aktivitäten von B2^P und B2^{Si} im Vergleich zu anderen Ergebnissen (siehe Abbildung 10) könnte auf Unterschiede in der Aktivität des Substrats z-Arg-Arg zurückzuführen sein, die je nach Hersteller variieren können. Eine niedrigere Aktivität kann beispielsweise zu einer höheren Verbrauchsgeschwindigkeit des Substrats und somit zu einer niedrigeren Cysteinpeptidase-Aktivität führen, während eine höhere Aktivität zu einer höheren Cysteinpeptidase-Aktivität führen kann. Zusätzlich sollten mögliche Fehlerquellen bei der Durchführung des Assays in Betracht gezogen werden. Beispielsweise ist es erforderlich, die Trophozoiten nach der Ernte und die lysierten Trophozoiten während des Assays

stets kühl zu behandeln, um den Abbau von Peptidasen zu verhindern. Des Weiteren könnten auch Unterschiede im Pipettieren eine Rolle spielen.

Mit Hilfe der Quantifizierung der hämolytischen Aktivität, kann die Fähigkeit von *E. histolytica*, Zellen zu lysieren, bestimmt werden. Für die Bestimmung dieser Fähigkeit eignet sich der Hämolyse-Assay. Die ermittelten Daten aus den Untersuchungen der *E. histolytica* Trophozoiten deuten darauf hin, dass eine veränderte Expression des Gens *ehi_127670* keinen signifikanten Einfluss auf die Fähigkeit zur Lyse von Erythrozyten hat (siehe Abbildung 9). Dabei zeigte die hämolytische Aktivität aller A1^{np} Transfektanten Werte von etwa 6 %. Im Gegensatz dazu wiesen die B2^{Myc} Transfektanten im Vergleich zu den Kontrollamöben B2^{pNC} eine geringfügig niedrigere hämolytische Aktivität von 1,5 % auf, während die Kontrollamöben eine hämolytische Aktivität von 3 % erreichten. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass die Ergebnisse der Kontrollgruppen in dieser Studie, bei denen die Kontrollklone mit dem leeren Kontrollvektor pNC transfiziert wurden, mit den Literaturwerten übereinstimmen. Vorangegangene Studien ergaben eine höhere Fähigkeit zur Hämolyse der Zelllinie A im Vergleich zur Zelllinie B (Biller *et al.* 2009). In Übereinstimmung mit den Literaturdaten zeigten die Zellen des Klons A1^{np} auch in dieser Studie die höchste hämolytische Aktivität. Allerdings konnten Meyer und Kollegen den Unterschied in der Hämolytischen Aktivität bei den Klone nicht messen (Meyer *et al.* 2016). In dieser Studie wurden in den Klonen A1^{pNC} Hämolysewerte von 6,16 % ermittelt. Diese Werte sind nahezu identisch mit den Literaturdaten, die in den Klonen A1^{np} Hämolysewerte von 6,85 % beobachteten (Meyer *et al.* 2016). Dabei ist zu beachten, dass der Klon A1^{np} keinen leeren Kontrollvektor pNC enthält. In einer Studie wurde bei dem Klon B2^{pNC} eine hämolytische Aktivität von ca. 4 % gemessen, was der in dieser Studie ermittelten Aktivität von 3,11 % nahekommt (Dissertation von S. C. Lender, 2019). Eine Ähnlichkeit wird auch mit den Literaturdaten für B2^p von 4,54 % gesehen (Meyer *et al.* 2016). Dabei ist zu beachten, dass der Klon B2^p keinen leeren Kontrollvektor pNC enthält.

In einem früheren Forschungsprojekt wurde die Auswirkung des *Silencings* des Gens auf die hämolytische Aktivität im pathogenen Klon B2 und die Überexpression des Gens im nicht-pathogenen Klon A1^{pNC} untersucht (siehe Abbildung 11, D und H, unveröffentlichte Daten von J. Anders). Die Ergebnisse zeigten, dass es bei den A1^{ÜE} im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Auswirkung auf die hämolytische Aktivität gab. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei B2^{Si} eine geringfügige, aber signifikante Abnahme der hämolytischen Aktivität im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Die Kontrollamöben bei B2^P zeigten hierbei eine ähnliche hämolytische Aktivität wie in der vorliegenden Studie. Im Rahmen des Experiments zur Analyse der hämolytischen Aktivität wurde abschließend nachgewiesen, dass kein Einfluss der veränderten Genexpression nachgewiesen werden konnte, jedoch wurde durch das *Silencing* des Gens im Klon B2^P ein signifikanter Effekt beobachtet. Dies führt zu dem Schluss, dass das putative Protein eine kleine Rolle im hämolytischen Prozess spielt. Des Weiteren konnte keine Korrelation zwischen der Pathogenität und der beobachteten hämolytischen Aktivität festgestellt werden, da der nicht-pathogene Klon A1^{NP} die höchste Aktivität aufwies.

Zusätzlich wurden in vorherigen Arbeiten verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die auf verschiedene Eigenschaften wie Motilität, *Monolayer*-Zerstörung und Erythrophagozytose abzielten (siehe Abbildung 11, A-G). Die Ergebnisse legen nahe, dass das untersuchte Gen einen starken und signifikanten Einfluss auf die Beweglichkeit und Zerstörung des *Monolayers* ausübt. Allerdings konnte keine Rolle des Gens *ehi_127670* bei der Erythrophagozytose beobachtet werden.

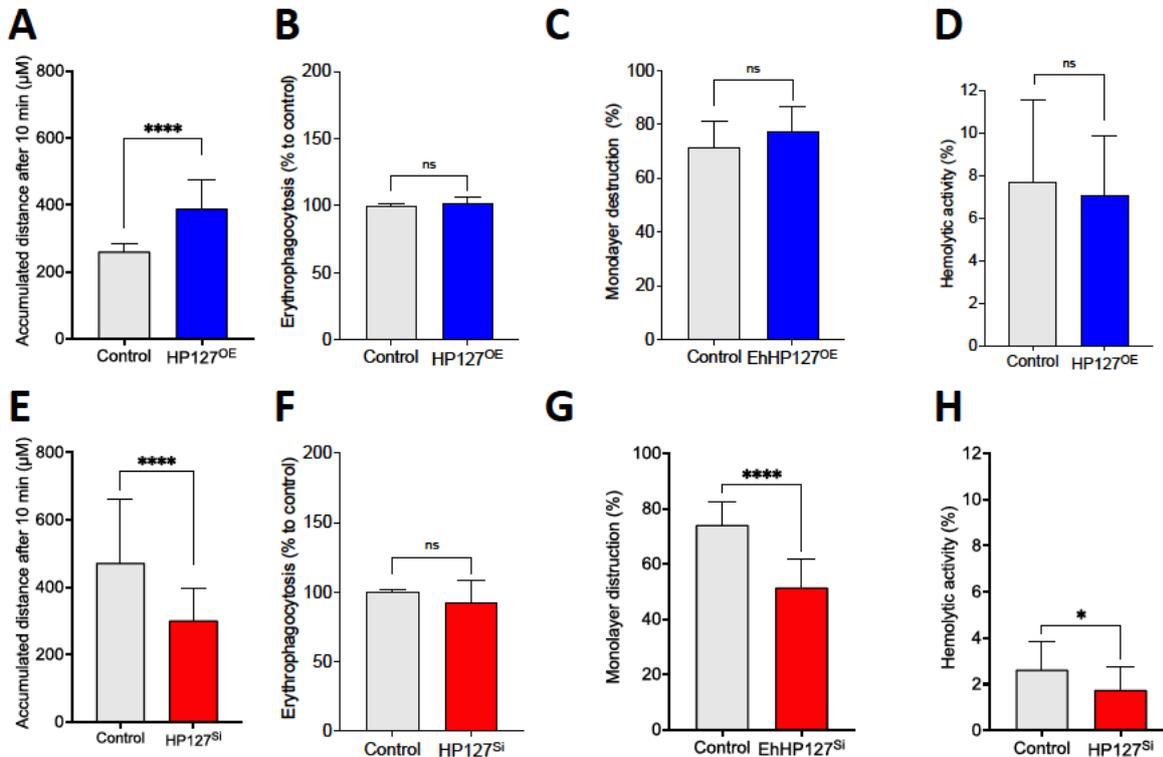


Abbildung 11: Bestimmung der Motilität (A, E), der Erythrophagozytose (B, F), der zytopathischen Aktivität (C, G), der Cysteinpeptidase-Aktivität (D, H) von EHI_127670-Transfektanten (Überexpressions-Transfektant: A1^{UE}, *Silencing*-Transfektant: B2^{Si}). (Unveröffentlichte Daten von J. Anders)

Die Überexpression bzw. das *Silencing* des Gens ist sehr spezifisch. Die Veränderung der Expression von dem Gen *ehi_127670* hat keinen Einfluss auf die Expression anderer Gene von *E. histolytica* (unveröffentlichte Transkriptomanalyse vom B2^{si}). Daher sind alle beobachteten phänotypischen Veränderungen ausschließlich auf das Protein EHI_127670 zurückzuführen (eine persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Iris Bruchhaus).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher noch keine klare Vorstellung über die Natur von EHI_127670 besteht. In Bezug auf das Tierreich gibt es kein Molekül, das diesem ähnlich ist. Allerdings haben sowohl die Ergebnisse dieser Studie als auch die Charakterisierung in früheren Arbeiten gezeigt, dass EHI_127670 einen Einfluss auf den erwähnten Phänotyp ausübt.

6. Ausblick

Die Infektion durch *E. histolytica*, die als Amöbiasis bezeichnet wird, ist von einem invasiven Verlauf und Mechanismen geprägt, deren Erforschung intensiv betrieben wird. Ein Schwerpunkt der Forschung liegt auf der Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren, die zur Entwicklung von ALAs beitragen. Ein tiefgehendes Verständnis des komplexen Zusammenspiels zwischen Parasiten und Wirt ist notwendig, um die Pathogenität von *E. histolytica* besser zu verstehen.

In dieser Arbeit konnte ein geringer Einfluss durch *Silencing* des Gens *ehi_127670* auf die Cysteinpeptidase- und die hämolytische Aktivität der B2^P Trophozoiten ermittelt werden. Trotzdem konnte durch Berücksichtigung früherer Studien zur Charakterisierung dieses Gens eine Korrelation mit der Pathogenität festgestellt werden. In weiteren Transkriptomanalysen kann untersucht werden, ob das *Silencing* bzw. die Überexpression des Gens *ehi_127670* Auswirkungen auf die Regulation anderer Gene hat.

7. Literaturverzeichnis

Adl, Sina M.; Simpson, Alastair G. B.; Farmer, Mark A.; Andersen, Robert A.; Anderson, O. Roger; Barta, John R. *et al.* (2005): The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. In: *The Journal of eukaryotic microbiology* 52 (5), S. 399–451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.

Ankri, S.; Stolarsky, T.; Bracha, R.; Padilla-Vaca, F.; Mirelman, D. (1999): Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. In: *Infection and Immunity* 67 (1), S. 421–422. DOI: 10.1128/IAI.67.1.421-422.1999.

Bercu, Tracy E.; Petri, William A.; Behm, W., JR (2007): Amebic colitis: new insights into pathogenesis and treatment. In: *Current gastroenterology reports* 9 (5), S. 429–433. DOI: 10.1007/s11894-007-0054-8.

Biller, Laura; Davis, Paul H.; Tillack, Manuela; Matthiesen, Jenny; Lotter, Hannelore; Stanley, Samuel L. *et al.* (2010): Differences in the transcriptome signatures of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. In: *BMC Genomics* 11 (1), S. 63. DOI: 10.1186/1471-2164-11-63.

Biller, Laura; Matthiesen, Jenny; Kühne, Vera; Lotter, Hannelore; Handal, Ghassan; Nozaki, Tomoyoshi *et al.* (2014): The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13 (1), S. 132–144. DOI: 10.1074/mcp.M113.031393.

Biller, Laura; Schmidt, Hendrik; Krause, Eberhard; Gelhaus, Christoph; Matthiesen, Jenny; Handal, Ghassan *et al.* (2009): Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. In: *Proteomics* 9 (17), S. 4107–4120. DOI: 10.1002/pmic.200900022.

Blessmann, Joerg; Ali, Ibne Karim M.; Nu, Phuong A. Ton; Dinh, Binh T.; Viet, Tram Q. Ngo; Le Van, An *et al.* (2003): Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. In: *Journal of clinical microbiology* 41 (10), S. 4745–4750. DOI: 10.1128/JCM.41.10.4745-4750.2003.

Blessmann, Joerg; van Linh, Pham; Nu, Phuong Anh Ton; Thi, Hao Duong; Muller-Myhsok, Bertram; Buss, Heidrun; Tannich, Egbert (2002): Epidemiology of amebiasis in a region of high

incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66 (5), S. 578–583. DOI: 10.4269/ajtmh.2002.66.578.

Boeck, W. C. (1925): The Cultivation of *Endamoeba Histolytica*, *Am J Hyg* 5:371-407. DOI: 10.1073/pnas.11.5.235.

Brandt, H.; Tamayo, R. P. (1970): Pathology of human amebiasis. In: *Human pathology* 1 (3), S. 351–385. DOI: 10.1016/s0046-8177(70)80072-7.

Bruchhaus, Iris; Matthiesen, Jenny (2014): Cysteine Peptidases in Pathogenesis. In: Tomoyoshi Nozaki und Alok Bhattacharya (Hg.): *Amebiasis. Biology and Pathogenesis of Entamoeba*. 1. Aufl. s.l.: Springer-Verlag, S. 447–458.

Burchard & Tannich (2004): Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis. Unter Mitarbeit von Burchard, G. und E Tannich „Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Amöbiasis“. *Deutsches Ärzteblatt* 101.45 (2004): 2448.

Clark, C. G.; Alsmark, U. C. M.; Tazreiter, M.; Saito-Nakano, Y.; Ali, V.; Marion, S. *et al.* (2007): Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. In: *Advances in parasitology* 65, S. 51–190. DOI: 10.1016/S0065-308X(07)65002-7.

Councilman, William Thomas.; Lafleur, H. A. (1891): Amoebic dysentery. *Johns Hopkins Hosp Rep* 2:395-548.

Despommier, Dickson D.; Robert W. Gwadz; Peter J. Hotez (1995): Parasitic diseases. In: *Springer Verlag New York*.

Diamond, L. S.; Harlow, D. R.; Cunnick, C. C. (1978): A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (4), S. 431–432. DOI: 10.1016/0035-9203(78)90144-x.

Dobell, Clifford (1928): Researches on the Intestinal Protozoa of Monkeys and Man., *Parasitology* 20:357-412. DOI: 10.1017/S003118200001177X.

Espinosa-Cantellano, M.; Martínez-Palomo, A. (2000): Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. In: *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2), S. 318–331. DOI: 10.1128/CMR.13.2.318.

Faust, D. M.; Marquay Markiewicz, J.; Santi-Rocca, J.; Guillen, N. (2011): New insights into host-pathogen interactions during *Entamoeba histolytica* liver infection. In: *European journal of microbiology & immunology* 1 (1), S. 10–18. DOI: 10.1556/EuJMI.1.2011.1.4.

Fotedar, R.; Stark, D.; Beebe, N.; Marriott, D.; Ellis, J.; Harkness, J. (2007): Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. In: *Clinical Microbiology Reviews* 20 (3), 511-32, table of contents. DOI: 10.1128/CMR.00004-07.

G. Burchard und E. Tannich (2004): Amoebiasis. In: *Deutsches Ärzteblatt*.

Gadasi, H.; Kessler, E. (1983): Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. In: *Infection and Immunity* 39 (2), S. 528–531. DOI: 10.1128/iai.39.2.528-531.1983.

Garcia-Nieto, Rosa Maria; Rico-Mata, Rosa; Arias-Negrete, Sergio; Avila, Eva E. (2008): Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. In: *Parasitology international* 57 (4), S. 417–423. DOI: 10.1016/j.parint.2008.04.013.

Gupta, S.; Ghosh, P.; Naik, S.; Naik, S. R. (1998): Proteinase activity & virulence of *Entamoeba histolytica* on passage through hamster liver. In: *The Indian journal of medical research* 107, S. 173–177.

Haferkorn, Anne (2018): Charakterisierung des hypothetischen Proteins (127670) mittels Überexpression bzw. Silencing in pathogenen und apathogenen *Entamoeba histolytica* Trophozoiten. In: *Master thesis, University Hamburg*.

Haque, Rashidul; Huston, Christopher D.; Hughes, Molly; Houpt, Eric; Petri, William A. (2003): Amebiasis. In: *The New England journal of medicine* 348 (16), S. 1565–1573. DOI: 10.1056/NEJMra022710.

Hellhund, Arne (2021): Establishment of the BioID method in *Entamoeba histolytica* for the characterization of the putative pathogenicity factor EHI_127670. In: *Bachelor thesis, HAW Hamburg*.

Herricks, Jennifer R.; Hotez, Peter J.; Wanga, Valentine; Coffeng, Luc E.; Haagsma, Juanita A.; Basáñez, María-Gloria *et al.* (2017): The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs? In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (8), e0005424. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005424.

- Keene, W. E.; Hidalgo, M. E.; Orozco, E.; McKerrow, J. H. (1990): Entamoeba histolytica: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. In: *Experimental parasitology* 71 (2), S. 199–206. DOI: 10.1016/0014-4894(90)90022-5.
- Laughlin, Richard C.; Temesvari, Lesly A. (2005): Cellular and molecular mechanisms that underlie Entamoeba histolytica pathogenesis: prospects for intervention. In: *Expert reviews in molecular medicine* 7 (13), S. 1–19. DOI: 10.1017/S1462399405009622.
- Leippe, M.; Sievertsen, H. J.; Tannich, E.; Horstmann, R. D. (1995): Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable Entamoeba histolytica. In: *Parasitology* 111 (Pt 5), S. 569–574. DOI: 10.1017/s0031182000077040.
- Lender, Sarah Corinna (2019): Genetische Manipulation des protozoischen Parasiten Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903) zur Charakterisierung putativer Pathogenitätsfaktoren. In: *Dissertation, Universität Hamburg*.
- Lesh, F. A. (1875): Massive development of amebas in the large intestine. Fedor Aleksandrovich Lesh (Lösch). In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 24 (3), S. 383–392. DOI: 10.4269/ajtmh.1975.24.383.
- Lidell, Martin E.; Moncada, Darcy M.; Chadee, Kris; Hansson, Gunnar C. (2006): Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (24), S. 9298–9303. DOI: 10.1073/pnas.0600623103.
- Loftus, Brendan; Anderson, Iain; Davies, Rob; Alsmark, U. Cecilia M.; Samuelson, John; Amedeo, Paolo *et al.* (2005): The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica. In: *Nature* 433 (7028), S. 865–868. DOI: 10.1038/nature03291.
- Marshall, M. M.; Naumovitz, D.; Ortega, Y.; Sterling, C. R. (1997): Waterborne protozoan pathogens. In: *Clinical Microbiology Reviews* 10 (1), S. 67–85. DOI: 10.1128/CMR.10.1.67.
- Matthiesen, Jenny (2009): Charakterisierung putativer EhAIG-Proteine und Aufbau eines ProteinMarkierungssystems bei Entamoeba histolytica (Schaudinn, 1903). In: *Diploma thesis, University Hamburg*.
- Matthiesen, Jenny (2012): Charakterisierung des pathogenen Phänotyps von Entamoeba histolytica (SCHAUDINN, 1903). In: *Dissertation, Universität Hamburg*.

Matthiesen, Jenny; Lender, Corinna; Haferkorn, Anne; Fehling, Helena; Meyer, Martin; Matthies, Thorben *et al.* (2019): Trigger-induced RNAi gene silencing to identify pathogenicity factors of *Entamoeba histolytica*. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (2), S. 1658–1668. DOI: 10.1096/fj.201801313R.

Mehlhorn, Heinz (2012): Die Parasiten des Menschen. Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen. 7. Aufl. 2012. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1579651>.

Meyer, Martin; Fehling, Helena; Matthiesen, Jenny; Lorenzen, Stephan; Schuldt, Kathrin; Bernin, Hannah *et al.* (2016): Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and Pathogenic *Entamoeba histolytica* Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation. In: *PLoS pathogens* 12 (8), e1005853. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005853.

Mi-Ichi, Fumika; Yoshida, Hiroki; Hamano, Shinjiro (2016): *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. In: *PLoS pathogens* 12 (10), e1005845. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005845.

Moncada, Darcy; Keller, Kathy; Chadee, Kris (2003): *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. In: *Infection and Immunity* 71 (2), S. 838–844. DOI: 10.1128/IAI.71.2.838-844.2003.

Moss, Joseph Anthony (2016): Waterborne Pathogens: The Protozoans. In: *Radiologic technology* 88 (1), S. 27–48. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27601690/>.

Müller, M. (1983): Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. In: *Surgery* 93 (1 Pt 2), S. 165–171. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6849201/>.

Nehls, Sarah (2020): Einfluss einer Alkoholdehydrogenase und des hypothetischen Proteins EHI_127670 auf die Virulenz von *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). In: *Master thesis, University Hamburg*.

Ocádiz, Ramón; Orozco, Esther; Carrillo, Eduardo; Quintas, Laura Itzel; Ortega-López, Jaime; García-Pérez, Rosa María *et al.* (2005): EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. In: *Cellular microbiology* 7 (2), S. 221–232. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2004.00453.x.

Pawlowski, Jan; Audic, Stéphane; Adl, Sina; Bass, David; Belbahri, Lassaâd; Berney, Cédric *et al.* (2012): CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. In: *PLoS Biology* 10 (11), e1001419. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001419.

Powell, S. J. (1969): Drug therapy of amoebiasis. In: *Bulletin of the World Health Organization* 40 (6), S. 953–956. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4310726/>.

Que, X.; Reed, S. L. (2000): Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. In: *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2), S. 196–206. DOI: 10.1128/cmr.13.2.196-206.2000.

Ralston, Katherine S. (2015): Chew on this: amoebic trophocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*. In: *Trends in parasitology* 31 (9), S. 442–452. DOI: 10.1016/j.pt.2015.05.003.

Ralston, Katherine S.; Petri, William A. (2011): Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. In: *Trends in parasitology* 27 (6), S. 254–263. DOI: 10.1016/j.pt.2011.02.006.

Richard Lucius; Brigitte Loos-Frank (2008): Allgemeine Aspekte der Biologie von Parasiten. In: *Springer Berlin Heidelberg*, S. 3–102. DOI: 10.1007/978-3-540-37709-2_1.

Salles, José Maria; Moraes, Luis Alberto; Salles, Mauro Costa (2003): Hepatic amebiasis. In: *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 7 (2), S. 96–110. DOI: 10.1590/s1413-86702003000200002.

Schaudinn, Fritz (1903): Untersuchungen über Fortpflanzung einiger Rhizopoden (vorläufige Mitteilung), 1903, Arb Kaiserlichen Ges 19:547–576.

Singleton, Paul; Sainsbury, Diana (2006): Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Stanley, Samuel L. (2003): Amoebiasis. In: *Lancet (London, England)* 361 (9362), S. 1025–1034. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9.

Thibeaux, Roman; Weber, Christian; Hon, Chung-Chau; Dillies, Marie-Agnès; Avé, Patrick; Coppée, Jean-Yves *et al.* (2013): Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. In: *PLoS pathogens* 9 (12), e1003824. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003824.

Tillack, Manuela; Biller, Laura; Irmer, Henriette; Freitas, Michelle; Gomes, Maria A.; Tannich, Egbert; Bruchhaus, Iris (2007): The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. In: *BMC Genomics* 8 (1), S. 170. DOI: 10.1186/1471-2164-8-170.

Tillack, Manuela; Nowak, Nicolas; Lotter, Hannelore; Bracha, Rivka; Mirelman, David; Tannich, Egbert; Bruchhaus, Iris (2006): Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. In: *Molecular and Biochemical Parasitology* 149 (1), S. 58–64. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2006.04.009.

Van Lunzen; Jan; E. Tannich; G. D. Burchard (1996): Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. In: *DEUTSCHES ARZTEBLATT-KOLN-* 93, S. 2659–2665.

Walsh, J. A. (1986): Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. In: *Reviews of infectious diseases* 8 (2), S. 228–238. DOI: 10.1093/clinids/8.2.228.

Wertheim; Heiman F. L.; Horby, Peter; Woodall, John P. (2012): Atlas of Human Infectious Diseases. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. Online verfügbar unter <https://online-library.wiley.com/doi/book/10.1002/9781444354690>.

WHO/PAHA/UNESCO (1997): A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull.* In: 18, S. 13–14. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9197085/>.

Wuerz, Terry; Kane, Jennifer B.; Boggild, Andrea K.; Krajden, Sigmund; Keystone, Jay S.; Fuksa, Milan *et al.* (2012): A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting. In: *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 26 (10), S. 729–733. DOI: 10.1155/2012/852835.

Ximénez, Cecilia; Morán, Patricia; Rojas, Liliana; Valadez, Alicia; Gómez, Alejandro (2009): Re-assessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. In: *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9 (6), S. 1023–1032. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.06.008.

YOUNG, M. D.; FREED, J. E. (1956): The effect of puromycin against *Entamoeba histolytica* and other intestinal parasites. In: *Southern medical journal* 49 (5), S. 537–538. DOI: 10.1097/00007611-195605000-00022.

Danksagung

An erster Stelle gebührt mein aufrichtiger Dank **Allah**, dem Barmherzigen und Allwissenden, dem Schöpfer des Universums und der Quelle meiner Kraft.

Des Weiteren möchte ich mich von ganzem Herzen bei **Frau Prof. Dr. Iris Bruchhaus** für die Möglichkeit bedanken, in ihrer Forschungsgruppe mitzuarbeiten und meine Bachelorarbeit unter ihrer Leitung anzufertigen. Ich bin sehr dankbar, dass Sie mir diesen Einblick in die Welt der Forschung ermöglicht haben und mich unterstützt und gefördert haben.

Ein besonderer Dank gilt auch **Frau Juliett Anders**, die mich während meiner Zeit in der Forschungsgruppe mit ihrer Fürsorge und ihrem Engagement unterstützt hat. Mit ihrer Geduld und ihrem offenen Ohr konnte ich mich jederzeit auf ihre Hilfe verlassen. Durch deine hervorragende Betreuung habe ich wertvolle Erfahrungen gesammelt, die mich nicht nur fachlich und akademisch, sondern auch persönlich weitergebracht haben und bin dafür unendlich dankbar.

Ebenso bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker** für die angenehme Betreuung meiner Thesis und die Begutachtung meiner Arbeit. Ihre Zeit, Ihre anregenden Vorlesungen an der HAW und Ihre sympathische Art haben dazu beigetragen, dass ich meine Bachelorarbeit erfolgreich abschließen konnte.

Ich möchte meinen Dank an die **gesamte Arbeitsgruppe** richten, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt hat und mir immer wieder geholfen hat, wenn ich Unterstützung benötigte. Die Zusammenarbeit war äußerst positiv, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Abschließend möchte ich **meinen Eltern, Geschwistern, meiner Ehefrau sowie meinen Freunden** meinen tiefsten Dank aussprechen. Ohne eure Unterstützung, eure Ermutigung und eure Liebe hätte ich diese Herausforderung nicht meistern können. Ich bin dankbar für jeden Moment, in dem ihr mich auf meinem Weg begleitet haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Hamburg, 21.03.2023

A solid black rectangular box used to redact the signature of the author.

Name (Unterschrift)