

**Molekulare Charakterisierung
Saposin-ähnlicher Proteine
von *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Julia Winkelmann
aus Hamburg

Würzburg 2005

Eingereicht am: 07.10.05

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter : Prof. Dr. M. Leippe

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums: 07.12.05

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat, und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 06. Oktober 2005

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	<i>Entamoeba histolytica</i> SCHAUDINN, 1903.....	3
1.3	Amoebiasis	4
1.4	Amoebapores und Amoebapore-ähnliche Proteine anderer Amöbenarten	5
1.5	Saposin-ähnliche Proteine	8
1.6	Zielsetzung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.1	Elektrophorese-Reagenzien	16
2.1.2	Molekulargewichtsstandards	16
2.1.3	Immunreagenzien	16
2.1.4	Fluoreszenzreagenzien.....	17
2.1.5	Enzyme und Inhibitoren	17
2.2	Medien und Kulturplatten	17
2.3	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	19
2.4	Oligonukleotide.....	19
2.5	Lipide	20
2.6	Bakterien	20
2.7	Eukaryotische Organismen und Zellen	21
2.8	Proteine.....	21
2.9	Sequenzanalysen und Homologievergleiche.....	22
2.10	Molekulare Modellierung.....	23
2.11	Genexpressionsanalyse.....	23
2.11.1	Kokultivierung von humanen HT29-Zellen mit Trophozoiten von <i>E. histolytica</i>	23
2.11.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Trophozoiten von <i>E. histolytica</i>	23
2.11.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	24
2.11.4	Reinigung der isolierten Gesamt-RNA und Abbau restlicher DNA.....	24
2.11.5	Analyse der RNA auf einem 1%igen, denaturierenden Agarose-MOPS-Gel	24
2.11.6	Herstellung markierter, komplementärer DNA (cDNA) mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter dCTPs	25
2.11.7	Hybridisierung von cDNA an genspezifische Oligonukleotide.....	26
2.11.8	Datenerfassung und Auswertung.....	27
2.11.9	mRNA Isolierung mittels OligodT-gekoppelter "Avidin-Polystyrene Beads".....	27
2.11.10	Herstellung komplementärer DNA (cDNA) mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion.....	28

II

2.11.11	Analyse der PCR-DNA-Fragmente auf einem 2%igem Agarose-TBE-Gel	29
2.11.12	Fällung von DNA	29
2.11.13	Klonierung der SAPLIP-DNA-Fragmente in den "pDrive Cloning Vector" oder den "pCR [®] -2.1-TOPO-Vektor"	29
2.11.14	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	30
2.11.15	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen.....	30
2.11.16	Kontrolle der Transformation durch PCR mit vektor-internen Oligonukleotiden.....	31
2.11.17	DNA-Isolierung mittels hydrophober Interaktionschromatographie.....	31
2.11.18	Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.11.19	Analyse der Nukleotidsequenz	32
2.12	Klonierung zur Expression der SAPLIP/GFP-Fusionsproteine	33
2.12.1	Einfügen der Schnittstelle für die Endoproteinase Igase	33
2.12.2	Anreicherung der SAPLIP-DNA-Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Klonierung in den Expressionsvektor pTAEx	34
2.12.3	Spaltung des Expressionsvektors pTAEx durch die Restriktionsendonuklease Eco52I.....	34
2.12.4	Auffüllen der überhängenden DNA-Enden des gespaltenen Expressionsvektors pTAEx und anschließende Dephosphorylierung	34
2.12.5	Reinigung des pTAEx-Vektors mittels hydrophober Interaktionschromatographie ...	34
2.12.6	Analyse und Gewinnung der SAPLIP-Fragmente mittels eines 1%igen LMP-Agarosegels	35
2.12.7	Ligation der SAPLIP-Fragmente in den Expressionsvektor.....	35
2.12.8	Herstellung elektroporationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	35
2.12.9	Elektroporation von elektroporationskompetenten <i>E.coli</i> -Zellen.....	36
2.12.10	Analyse der Transformation durch Anregung der Bakterienkolonien mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm.....	36
2.12.11	Kontrolle der fluoreszierenden Transformationskolonien durch PCR mit vektor-internen Oligonukleotiden	36
2.12.12	Schnellpräparation von Plasmid-DNA	37
2.13	Proteinanalyse	37
2.13.1	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.13.2	Sibernitratfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	39
2.13.3	Markierung von Cysteinen mit Monobromobimane	39
2.13.4	Western-Blot.....	40
2.13.5	Absorption von primären Antikörpern mit <i>E.coli</i> -Proteinen	41
2.13.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.14	Expression der SAPLIP/GFP-Fusionsproteine.....	43
2.14.1	Synthese der rekombinanten SAPLIP/GFP-Fusionsproteine für die Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot.....	43
2.14.2	Überprüfung der Löslichkeit der rekombinanten SAPLIP/GFP-Fusionsproteine im Zellextrakt	44
2.14.3	Synthese der GFP-Fusionsproteine von SAPLIP 3, SAPLIP 6 und der SAPLIP-Domäne von SAPLIP 12.....	44
2.15	Reinigung der GFP-Fusionsproteine mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	45
2.15.1	Zellaufschluß	45
2.15.2	Reinigung mittels Nickelionen-Affinitätschromatographie.....	46
2.15.3	Inkubation mit oxidiertem und reduziertem Glutathion für die Ausbildung von Disulphidbrücken und Einengen der Probe mittels PEG 35000.....	47
2.15.4	Trennung des SAPLIPs oder der SAPLIP-Domäne von dem GFP mittels der Endoproteinase Pro-Pro-Y-Pro (Igase).....	47

III

2.16	Reinigung des rekombinanten SAPLIP 3, SAPLIP 6 und der rekombinanten SAPLIP-Domäne 12 mittels hydrophober Interaktionschromatographie.....	48
2.16.1	Konzentrierung und Reinigung des SAPLIPs oder der SAPLIP-Domäne an einer hydrophoben Matrix	48
2.16.2	Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie an Umkehrphasen	48
2.16.3	Gefriertrocknung.....	42
2.16.4	Zirkulardichroismus Spektroskopie.....	43
2.16.5	Massenspektrometrie	43
2.17	Test auf Assoziation mit Liposomen.....	49
2.17.1	Herstellung multilamellarer Liposomen	49
2.17.2	Inkubation der Liposomen mit Protein	49
2.18	Test auf porenbildende Aktivität.....	50
2.18.1	Herstellung kleiner, unilamellarer Calcein-Liposomen.....	50
2.18.2	Aktivitätsmessung.....	50
2.19	Test auf antibakterielle Aktivität.....	51
2.19.1	Mikrosuszeptibilitätstest	51
2.19.2	Fluoreszenzgestützter Membranpermeabilisierungstest	52
2.20	Test auf hämolytische Aktivität	53
2.21	Liposomeninteraktionen von SAPLIP 3.....	54
2.21.1	Darstellung mittels Gelfiltration	54
2.21.2	Darstellung mittels konfokaler Lasermikroskopie.....	54
2.21.3	Membranfusionstest.....	55
2.22	Rekonstitutionsexperiment mit Prosaposin-defizienten Fibroblasten	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Datenbankanalyse.....	57
3.2	Analyse der Genexpression und ihrer Regulation durch humane Kolonzellen.....	62
3.2.1	Analyse mittels reverser Transkriptions-PCR	62
3.2.2	Analyse mittels Mikroarray	62
3.3	Molekulare Klonierung und rekombinante Expression der SAPLIP-Domänen.....	66
3.4	Expression und Reinigung der rekombinanten SAPLIPs.....	72
3.5	Aktivitätstests	76
3.5.1	Liposomenbindungstest	76
3.5.2	Porenbildende Aktivität	77
3.5.3	Antibakterielle Aktivität	80
3.5.4	Test auf hämolytische Aktivität.....	83
3.5.5	Liposomeninteraktionen von SAPLIP 3	83
3.5.6	Membranfusionstest.....	86
3.6	Rekonstitutionsexperiment mit Prosaposin-defizienten Fibroblasten	87

4 DISKUSSION	89
5 ZUSAMMENFASSUNG	110
6 SUMMARY	113
7 LITERATUR.....	116
8 ANHANG	129
8.1 Abkürzungsverzeichnis	129
8.2 Sequenzen der genspezifische Oligonukleotide zur Klonierung der SAPLIP-Domänen.....	132
8.3 Sequenzen der genspezifische Oligonukleotide für die Mikroarray Analyse	133
DANKSAGUNG	134
LEBENS LAUF	135

1 Einleitung

1.1 Einführung

Amöboide Organismen stellen eine bedeutende Lebensform innerhalb der Gruppe der Protozoen dar. Man findet sie sowohl freilebend im Boden und im Wasser als auch parasitisch mit einer Vielzahl von Wirten. Die Gruppe der Amöben ist phylogentisch sehr divers, doch ist ihnen ihre phagozytotische Aktivität gemeinsam, wobei die meisten Vertreter sich von Bakterien ernähren. Sie haben Mechanismen für das Töten von internalisierten Bakterien entwickelt und können dadurch das mikrobielle Wachstum innerhalb ihrer Nahrungsvakuolen verhindern. Diese Mechanismen finden sich als zelluläre Abwehr gegen Pathogene ebenfalls in den phagozytierenden Zellen mehrzelliger Organismen verwirklicht, wie den Makrophagen und Neutrophilen des Menschen (Elsbach und Weiss, 1992).

Auch *Entamoeba histolytica* ist ein amöboider Einzeller, der primär den Dünndarm des Menschen asymptomatisch besiedelt, darüber hinaus aber auch die humane Amöbenruhr (Amoebiasis), einer der lebensbedrohlichsten parasitischen Infektionskrankheiten, verursachen kann (Stauffer und Ravdin, 2003). Eine zentrale Rolle als Pathogenitätsfaktor wird einer Familie porenbildender Proteine, den Amoebapores, zugesprochen. Diese Proteine gehören strukturell der Proteinfamilie der Saposin-ähnlichen Proteine (**SAP**osin-**L**ike-**P**roteins, SAPLIPs) an, die trotz ihrer ähnlichen Faltung stark unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen (Munford *et al.*, 1995). Vorhersagen ihrer Funktionen aufgrund von Sequenzdaten sind bisher nicht möglich, sie besitzen jedoch alle die Eigenschaft mit Lipiden zu interagieren. Ihr Vorkommen beschränkt sich dabei nicht nur auf die Amöben, als Vertreter primitiver Einzeller, sondern erstreckt sich über die Wirbellosen bis hin zu den Säugetieren einschließlich des Menschen (Bruhn, 2005).

In vitro konnte für die Amoebapores sowohl antibakterielle (Leippe *et al.*, 1994b) als auch cytotoxische Aktivität gegen humane Zelllinien nachgewiesen werden (Leippe *et al.*, 1994a). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Amoebapores einen essentiellen Teil der cytolytischen Maschinerie während der invasiven Amoebiasis darstellen (Berninghausen und Leippe, 1997; Bracha *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 2003; Bujanover *et al.*, 2003), doch als primäre Funktion der Amoebapores wird das Töten von Bakterien innerhalb der Nahrungsvakuolen angesehen (Andrä *et al.*, 2003; Leippe, 1997). *E. histolytica* ernährt sich im Darm des Menschen von Bakterien. Dafür muss die Amöbe die phagozytierten Bakterien schnell und effizient töten und die Beute anschließend als Quelle für ihren Nährstoffbedarf degradieren.

Der Größe nach strukturell und auch funktionell den protozoischen Amoebapores entsprechende Proteine konnten in den Granula der zytotoxischen Lymphozyten von Schwein und Mensch entdeckt werden, nämlich das NK-lysin und das Granulysin (Andersson *et al.*, 1995; Peña und Krensky, 1997). Das humane Effektorprotein stellte sich als wichtiger Bestandteil der inneren Abwehr gegen Pathogene, wie z. B. intrazelluläre Bakterien, heraus (Stenger *et al.*, 1998). SAPLIPs wirken aber nicht nur als antimikrobielle Effektorproteine. Neben sehr speziellen Funktionen in Abhängigkeit vom Organismus, wie z. B. das stadienregulierende Countin von *Dictyostelium discoideum* (Brock und Gomer, 1999), findet man viele Vertreter in verschiedenen höheren Organismen beteiligt am Abbau komplexer Lipide nach endozytotischer Aufnahme, wie z. B. die SAPLIP-Domänen der Enzyme Acyloxyacyl Hydrolase oder der sauren Sphingomyelinase oder sie dienen als Cofaktoren von Enzymen des Lipidkatabolismus, wie die Saposine (Bruhn, 2005).

In der Datenbank des Genomsequenzierungsprojekts für *E. histolytica* konnte schon in einem frühen Stadium der Sequenzierung zusätzlich zu den drei Amoebapore-Genen eine erstaunlich hohe Anzahl von Genen identifiziert werden, die für putative SAPLIPs kodieren und deren Transkription darüber hinaus nachgewiesen werden konnte (Bruhn und Leippe, 2001). Dieses lässt auf eine essentielle Bedeutung dieser Proteinfamilie für die Amöbe schließen. Da *E. histolytica* als unersättliche, phagozytierende Zelle mit einer Vielfalt von Zielzellen interagiert, wäre die naheliegendste Funktion, dass die putativen SAPLIPs zu einem sehr fein abgestimmten antimikrobiellen System gehören und die Aktivitäten der Amoebapores unterstützen und ergänzen. Aufgrund der funktionellen Mannigfaltigkeit dieser Proteinfamilie ist es aber auch denkbar, dass diese neuen, putativen SAPLIPs in der Amöbe ähnlich vielfältige Aufgaben übernehmen könnten, wie die bekannten Familienmitglieder in anderen Organismen.

1.2 *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903

Entamoeba histolytica ist ein einzelliger Parasit, der die humane Amöbenruhr (Amoebiasis) verursacht. Der Name wurde durch Fritz Schaudinn im Jahr 1903 gegeben und lässt sich wohl von der Eigenschaft dieser Amöbe, mit hoher Effizienz Zellen zu zerstören und Zellverbände aufzulösen, ableiten. Man war lange Zeit der Ansicht, dass es eine pathogene und eine nicht pathogene Form der Art *E. histolytica* gibt. Erst im Jahr 1993 veröffentlichten Diamond und Clark eine Neubeschreibung der Art, wobei die pathogene Art den Namen *E. histolytica* (Schaudinn, 1903) behielt und die nicht pathogene den Namen *Entamoeba dispar* erhielt, wie bereits im Jahr 1925 von Emile Brumpt vorgeschlagen (Diamond und Clark, 1993). Morphologisch sind die beiden Arten nicht zu unterscheiden, aber *E. dispar* ist nicht in der Lage invasive Amoebiasis zu erzeugen, sondern besiedelt den Darm ausschließlich asymptomatisch. Wegen der zum Teil erheblichen genetischen, immunologischen und biochemischen Unterschiede werden sie heute als eigenständige Spezies ausgewiesen (Clark, 2000; WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

Der Lebenszyklus von *E. histolytica* umfasst zwei Stadien: die beweglichen Trophoziten, die sich durch Zweiteilung vermehren und die infektiösen, meist vierkernigen Zysten mit einem Durchmesser zwischen 10 und 16 μm (Diamond und Clark, 1993). Die Größe der Trophoziten beträgt zwischen 20 und 40 μm . Die Fortbewegung erfolgt amöboid gleitend mittels lappenförmiger Ausstülpungen des Cytoplasmas, den Pseudopodien. Diese dienen auch der Nahrungsaufnahme, indem sie potentielle Nahrungspartikel, wie z. B. Bakterien, umfließen, die dann durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden und dort in speziellen Vesikeln, den Nahrungsvakuolen, verdaut werden.

Das Cytoplasma ist angefüllt mit Vakuolen unterschiedlichster Größe und Gestalt. Morphologisch konnten weder ein klassisches endoplasmatisches Retikulum noch ein Golgi-Komplex identifiziert werden, doch lassen sich Membrananordnungen aufgrund der Lokalisation von grundlegenden Elementen der Vesikeltransportmaschinerie einem einfach strukturiertem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Komplexen zuordnen (Mazzuco *et al.*, 1997). *E. histolytica* ist mikroaerophil. Obwohl die elektronenmikroskopische Analyse auch das Fehlen von Mitochondrien zeigte (Bakker-Grunwald und Wostmann, 1993), konnten später 2 Gene im Kerngenom identifiziert werden, die für typische mitochondriale Proteine kodieren und über Immunlokalisation wurden Organellen mit mitochondrialem Ursprung, die als Mitosome bezeichnet werden, identifiziert (Bakatselou *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 1999). Daher vermutet man, dass die

fehlenden Mitochondrien eher eine evolutionäre Reduktion darstellen und nicht als ursprünglich angesehen werden können (Leon-Avila und Tovar, 2004).

1.3 Amoebiasis

Heutzutage sterben jährlich immer noch zwischen 50 000 und 100 000 Menschen auf der Welt an Amoebiasis (Clark, 2000; Petri und Singh, 1999; WHO/PAHO/UNESCO, 1997). Diese Infektionskrankheit ist deshalb die dritthäufigste parasitische Todesursache. Ihre Verbreitung erstreckt sich weltweit, aber hauptsächlich auf die armen Gegenden der Entwicklungsländer, in denen mangelnde Hygienemaßnahmen die Grundlage für diese Infektionskrankheit bieten (Haque *et al.*, 2001).

Die infektiösen Zysten von *E. histolytica* werden mit Wasser oder Nahrung, die durch Fäkalien verunreinigt sind, aufgenommen. Die Wand der Zysten ist resistent gegen die Magensäure. Die Exzystierung erfolgt im Lumen des Dünndarms, was die Freisetzung der bewegungsfähigen Trophozoiten im Darmlumen nach sich zieht. Diese besiedeln den Dickdarm und ernähren sich dort von Bakterien. Die Mehrzahl der Infektionen durch *E. histolytica* verläuft asymptomatisch. Es folgt die erneute Enzystierung der Trophozoiten und die anschließende Ausscheidung der Zysten. Nur in etwa 10 % der Infektionen entwickelt sich die invasive Amöbiasis (Haque *et al.*, 2001). Es kommt zu wässrigen und blutigen Durchfällen, verursacht durch Trophozoiten, die in die Darmwand eindringen. Darüber hinaus können auch Leberabszesse (ALA, "amoebic liver abscess") oder andere extraintestinale Läsionen auftreten, die durch die Ausbreitung der Trophozoiten über den Blutstrom aus dem Darm in andere Organe ausgelöst werden. Derartige invasive Amöben, die das Darmlumen verlassen haben, enzystieren sich im Gewebe nicht mehr und können dadurch auch nicht mehr zur Verbreitung durch neue Infektionen beitragen (Clark, 1995). Ebenso kommt es durch die starken Durchfälle häufig zur Ausscheidung von nicht enzystierten und damit nicht infektiösen Trophozoiten und nur wenigen Zysten. Die Wahl dieses Zyklus ist somit für die Erhaltung der Art äußerst nachteilig (Clark, 1995; Stauffer und Ravdin, 2003). So sind auch die Faktoren, die die Invasion der Amöben in die Darmwand auslösen, nicht bekannt. Als hauptsächliche Pathogenitätsfaktoren werden das Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal/GalNAc)-spezifische Lektin, das die Anheftung an die Epithelzellen vermittelt (Ankri *et al.*, 1999; Petri *et al.*, 2002), sezernierte Cystein-Proteasen, die extrazelluläre Matrixproteine des Dickdarms degradieren (Bruchhaus *et al.*, 2003; Leippe *et al.*, 1995; Que und Reed, 1997) und die porenbildenden Amoebapores, die die Wirtszellen in einem

kontaktabhängigen Mechanismus lysieren (Leippe, 1997; Leippe *et al.*, 1991), verantwortlich gemacht.

Eine ähnliche invasive Krankheit, aber bei Reptilien wie Schlangen und Eidechsen, wird von der Art *Entamoeba invadens* verursacht. Zysten des Parasiten wurden auch in Stuhlproben von Schildkröten und Alligatoren gefunden, allerdings waren die befallenen Tiere symptomlos (Donaldson *et al.*, 1975). Der Lebenszyklus gleicht dem von *E. histolytica*, doch lässt sich im Gegensatz zu dieser Art, die Enzystierung *in vitro* unter axenischen Bedingungen induzieren und somit der gesamte Entwicklungszyklus untersuchen (Eichinger, 2001a). Auch die entsprechenden Pathogenitätsfaktoren wurden gefunden, wie z. B. die Expression eines ähnlichen Lektins (Eichinger, 2001a), Cysteinproteinasen (Scholze und Schulte, 1990; Sharma *et al.*, 1996), sowie den Amoebapores orthologe Proteine (Accession Nummern: AY253925 (Invapore A), AY253926 (Invapore B), AY253927 (Invapore X); (Dissertation, R. Herbst, 2001)).

1.4 Amoebapores und Amoebapore-ähnliche Proteine anderer Amöbenarten

Bereits in den frühen 80er Jahren wurde in Amöbenextrakten porenbildende Aktivität gefunden (Lynch *et al.*, 1982), aber erst wesentlich später gelang die Reindarstellung des Proteins Amoebapore (Leippe *et al.*, 1991). Zwei weitere Isoformen wurden in den cytoplasmatischen Granula der Amöbe entdeckt (Leippe *et al.*, 1994b) und die drei Isoformen Amoebapore A, B und C genannt.

Die Aufklärung der Primärstruktur zeigte, dass es sich um Polypeptide handelt, die jeweils aus 77 Aminosäureresten bestehen und eine molekulare Masse von etwa 8 kDa aufweisen (Leippe *et al.*, 1994a; Leippe *et al.*, 1992). Sie besitzen das für die Familie der Saposin-ähnlichen Proteine typische Cysteinmuster. Erst kürzlich konnte die Tertiärstruktur durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) aufgeklärt werden (Hecht *et al.*, 2004; Leippe *et al.*, 2005) und ähnelt der Faltung Saposin-ähnlicher Proteine, wie z. B. dem NK-lysin (Liepinsh *et al.*, 1997). Allerdings gibt es auch einige grundlegende Unterschiede in den Strukturen von Amoebapore und NK-lysin, die sich in den biologischen Aktivitäten widerspiegeln (Bruhn *et al.*, 2003).

Die Amoebapores sind in der Lage, sehr effektiv sowohl Bakterien als auch eukaryotische Zellen zu töten, indem sie die Zellmembran perforieren und die Zellen an den Folgen der Membranverletzung sterben (Berninghausen und Leippe, 1997; Gutschmann *et al.*, 2003; Leippe, 1997). Als molekularem Mechanismus der Porenbildung soll die pH-abhängige

Bildung von Amoebapore-Dimeren zugrunde liegen, die wiederum oligomerisieren und sich zu einer Pore anordnen. Ihre hydrophilen Reste kleiden das Innere aus, während die hydrophoben Reste auf der Außenseite liegen (Hecht *et al.*, 2004; Leippe *et al.*, 2005).

Die cytolytische Reaktion der Amoebapores erinnert stark an die der cytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen (Young und Cohn, 1987), doch ist die Amöbe vor allem auch eine unersättliche phagozytierende Zelle, die sich als Darmparasit hauptsächlich von den Darmbakterien ernährt und bis zu 1000 Bakterien pro Stunde aufnehmen, töten und verdauen kann (Leippe, 1999; Mirelman, 1987). Die granulären, cytoplasmatischen Vesikel mit den Amoebapores entlassen ihren Inhalt in die Nahrungsvakuolen, so dass die Amoebapores ihre wahrscheinlich primäre Aufgabe, nämlich das Wachstum von phagozytierten Bakterien innerhalb der Nahrungsvakuolen zu kontrollieren und sie zu töten, ausführen können (Andrä *et al.*, 2003; Leippe, 1997). Die Annahme, dass es sich um die ursprüngliche Aufgabe der Amoebapores handelt, wird von der Tatsache unterstützt, dass auch die apathogene Art *E. dispar* den Amoebapores entsprechende, orthologe Proteine besitzt, die Disarpores genannt werden. Sie sind jedoch in deutlich geringerem Maße in Amöbenextrakten anzutreffen und besitzen zudem geringere Aktivität (Nickel *et al.*, 1999).

Für das extrazelluläre Töten von Wirtszellen wird der Inhalt der Granula wahrscheinlich in den intrazellulären Spalt zwischen Amöbe und Zielzelle sezerniert, wodurch der Kontakt für das Lysieren der Zelle durch die cytotoxischen Amoebapores ermöglicht wird (Leippe, 1997). Die enorme Bedeutung der Amoebapores für die Pathogenität des Erregers konnte dadurch unterstrichen werden, dass ein virulenter Stamm von *E. histolytica*, bei dem die Expression von Amoebapore A durch genetische Techniken inhibiert wird, avirulent ist (Bracha *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 2003; Bujanover *et al.*, 2003).

Für den Schutz der Amöbe vor den eigenen, toxischen Proteinen wird die spezielle Lipidzusammensetzung der Membran von *E. histolytica*, nämlich als vorherrschendes Phospholipid das ungewöhnliche Phosphonolipid Ceramidaminoethanolamin (39 %) sowie ein hoher Anteil an Cholesterol verantwortlich gemacht (Aley *et al.*, 1980; Andrä *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Amoebapore A nicht an die Trophozoiten von *E. histolytica* bindet und mit Liposomen, die die Zusammensetzung der Amöbenmembran simulieren, nicht oder nur schlecht interagieren kann.

Auch die freilebende, fakultativ parasitische Amöbenart *Naegleria fowleri* besitzt Amoebapore-ähnliche Polypeptide, die Naegleriapores (Herbst *et al.*, 2002). Allerdings werden sie, im Gegensatz zu den Amoebapores, als große Vorläuferproteine synthetisiert. Jedes der zwei Vorläuferproteine besteht aus mehreren Isoformen der Naegleriapores. So

besteht dasjenige von Naegleriapore A aus 3 Naegleriapores (A1-A3), während dasjenige von Naegleriapore B aus 5 Naegleriapores (B1-B5) besteht. Die A2 und die B1 Isoformen der Naegleriapores konnten aus Amöbenextrakten anhand ihrer porenbildenden Aktivität gereinigt und anschließend ihre antibakteriellen und cytolytischen Aktivitäten nachgewiesen werden (Herbst *et al.*, 2002). Drei weitere Isoformen, nämlich Naegleriapore B2, B4 und B5 wurden anhand der Markierung ihrer Cysteine mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes identifiziert und gereinigt (Herbst *et al.*, 2004). Für Naegleriapore B2 und B5 konnte anschließend ebenfalls antibakterielle Aktivität nachgewiesen werden. Ein weiterer Unterschied zu den Amoebapores besteht darin, dass einige der Naegleriapore-Isoformen glykosyliert sind (Herbst *et al.*, 2004). Auch *N. fowleri* ernährt sich phagozytotisch von Bakterien, so dass den Naegleriapores als porenbildende Polypeptide, das schnelle Töten von phagozytierten Bakterien, ähnlich den Amoebpores in *E. histolytica*, als primäre Aufgabe zugeschrieben wird. In Anbetracht der fakultativ parasitischen Lebensweise könnten die Naegleriapores durch ihre cytolytische Aktivität bei der Invasion des Parasiten eine große Rolle spielen und als Pathogenitätsfaktor von *N. fowleri*, analog den Amoebapores, angesehen werden (Leippe und Herbst, 2004).

Im Genom der freilebenden Amöbe *Dictyostelium discoideum* konnten bisher 11 Gene, die für SAPLIP-Sequenzen kodieren, identifiziert werden (Bruhn, 2005). Ein Gen, das für eine einzelne SAPLIP-Domäne im Verbund mit weiteren Proteindomänen kodiert, wurde funktionell charakterisiert. Untersuchungen mit „Knockout“-Mutanten ergaben, dass sich die genetisch veränderten Organismen im Gegensatz zum Wildtyp durch die Bildung kleinerer Fruchtkörper auszeichnet. Dabei wurden im Hungerzustand zunächst große Aggregate gebildet, die dann in kleinere Einheiten zerfielen. Aufgrund dieser Eigenschaft „Zellen zählen“ zu können, wurde das Genprodukt Countin genannt (Brock und Gomer, 1999; Brown und Firtel, 2000).

1.5 Saposin-ähnliche Proteine

Die Proteinfamilie der SAPLIPs ist hauptsächlich über ihre strukturelle Gemeinsamkeit definiert. Ihre Mitglieder stammen aus ganz unterschiedlichen Organismen und sind an einer Vielfalt von physiologischen Prozessen beteiligt, aber alle weisen sechs Cystein-Reste sowie einige hydrophobe Aminosäurereste an konservierten Positionen in ihren Aminosäuresequenzen auf (Munford *et al.*, 1995). Diese sind an der Ausbildung von drei Disulfidbrücken beteiligt und alle bisher aufgeklärten Tertiärstrukturen bestehen aus fünf α -Helices (Ahn *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2003; de Alba *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004; Kervinen *et al.*, 1999; Liepinsh *et al.*, 1997). Die drei intramolekularen Disulfidbrücken führen zu einer sehr stabilen Struktur, die dafür sorgt, dass diese Proteine sowohl eine hohe Hitze- als auch Säureresistenz aufweisen. Die funktionelle Gemeinsamkeit liegt darin, dass alle bekannten Mitglieder mit Lipiden interagieren können, was meistens in Form einer Membraninteraktion, die für die spezifische Funktion benötigt wird, nachgewiesen werden konnte. Zur Zeit sind mehr als 200 verschiedene Proteine als SAPLIPs in den Datenbanken annotiert, wovon 7 Gene, die für Vorläuferproteine von 11 SAPLIP-Domänen kodieren, im menschlichen Genom gefunden wurden. Die phylogenetisch primitivsten Organismen, in denen man SAPLIPs sowohl in Form von Sequenzanalysen als auch auf der Proteinebene finden konnte, sind die Amöbozoa. Die Analyse prokaryotischer Genome lieferte bisher keine Sequenzen, die für putative SAPLIPs kodieren (Bruhn, 2005).

Die ersten charakterisierten Proteine, denen die Proteinfamilie auch ihren Namen verdankt, waren die humanen Saposine. Hierbei handelt es sich um 4 glykosylierte Proteine, Saposin A-D, die aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein in den späten Endosomen/Lysosomen freigesetzt werden. Die maturen Proteine bestehen aus 70 – 80 Aminosäureresten und haben eine Funktion bei der Vermittlung des Abbaus von Sphingolipiden durch lysosomale Hydrolasen. Jedes Saposin zeigt dabei eine Spezialisierung für eine besondere Hydrolase (Sandhoff und Kolter, 2003).

Spezifische Gendefekte oder -mutationen des Gens für Saposin B oder C zeigten, dass sie für bestimmte Speicherkrankheitsbilder, hauptsächlich durch Anhäufung von spezifischen Sphingolipiden gekennzeichnet, verantwortlich sind, durch die wiederum ihre physiologische Rolle abgeleitet werden konnte (Christomanou *et al.*, 1989; Wenger *et al.*, 1989). So konnte geschlossen werden, dass das Saposin B den Abbau von Sulfatiden durch Aktivierung der Arylsulfatase A vermittelt und Saposin C eine essentielle Rolle in der Regulation des Glukosylceramid-Katabolismus spielt, indem es als physiologischer Aktivator der

Glukosylceramid- β -Glukosidase wirkt. Darüber hinaus kann Saposin C auch den Abbau von Galaktosylceramid in lebenden Zellen aktivieren. Durch einen genetisch veränderten Mausstamm mit einer Mutation im Saposin A Gen, der deshalb einen späten Ausbruch einer Speicherkrankheit mit dem Anhäufen von Galaktosylceramid entwickelt, konnte erstmals eine Krankheit durch einen Defekt des Saposin A gezeigt werden (Matsuda *et al.*, 2001). So nimmt man an, dass Saposin A bei der Degradation von Galaktosylceramid eine Rolle spielt.

Für Saposin D konnte bisher keine spezielle Erkrankung gezeigt werden. Es wird aber, gestützt durch *in vitro* Experimente, vermutet, dass es die Hydrolyse von Ceramid begünstigt (Ciaffoni *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 1994).

Darüber hinaus konnten weitere funktionelle Eigenschaften bestimmt werden, die nicht so offensichtlich im Zusammenhang mit dem Abbau der Sphingolipide stehen. Die Saposine und das Prosaposin können Ganglioside binden und solubilisieren, stabile Komplexe mit ihnen bilden und ihren Transfer von Donor- auf Akzeptormembranen vermitteln (Hiraiwa *et al.*, 1992). Außerdem ist Prosaposin ein neurotrophischer Faktor, wobei die neurotrophe Aktivität innerhalb der Saposin C-Domäne liegt (O'Brien *et al.*, 1995). Prosaposin soll ebenfalls an den Regulationsprozessen der Apoptose von Zellen, die nicht neuronalen Ursprungs sind, beteiligt sein (Misasi *et al.*, 2004). Auch die Bildung von wasserlöslichen Komplexen zwischen Saposinen und neutralen Sphingolipiden wie den Cerebrosiden wurde beschrieben (Soeda *et al.*, 1993). Kürzlich wurde den Saposinen eine Beteiligung in der Lipid-Antigenpräsentation zugesprochen (Kang und Cresswell, 2004; Winau *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass sie Lipide von Membranen extrahieren und die Antigen-präsentierenden Moleküle damit beladen.

Die Acyloxyacylhydrolase (AOAH) ist ein leukozytisches Enzym, das Acyloxyacyl-Bindungen in der Lipid A-Region von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) hydrolysiert und dadurch dessen toxische Eigenschaft vernichtet (Munford und Hunter, 1992). Außerdem katalysiert es den Transfer der Acylreste von LPS und Phosphatidylethanolamin auf Akzeptorlipide. Es wird als Vorläuferprotein mit einer internen Disulfidbrücke synthetisiert, bevor es proteolytisch zu zwei Untereinheiten gespalten wird. Dieses glykosylierte Heterodimer besteht aus einer größeren Untereinheit mit einem molekularen Gewicht von ~ 50 kDa und einer kleineren mit einem molekularen Gewicht von ~ 14 kDa (Munford und Hall, 1989). Die kleinere Untereinheit besteht aus der SAPLIP-Domäne. Ihr kommt wohl eine Aufgabe bei der Erkennung von LPS als Substrat, sowie dem intrazellularen Sortieren und Lokalisieren des Enzyms zu. Außerdem trägt es zur katalytischen Funktion bei, wobei das

eigentliche katalytische Zentrum aber in der größeren Untereinheit liegt (Staab *et al.*, 1994). Neben den sechs Cysteinen, die das typische, konservierte SAPLIP-Motiv widerspiegeln und in die intramolekulare Disulfidbrückenbindung involviert sind, enthält die SAPLIP-Domäne darüber hinaus C-terminal vom sechsten Cystein gelegen ein weiteres, siebtes Cystein, das für die intermolekulare Disulfidbrückenbindung zwischen der größeren und der kleineren Untereinheit vorgeschlagen wird (Hagen *et al.*, 1991). Andererseits besteht die Meinung, dass die kleinere Untereinheit nach der Abtrennung nur noch vier bis fünf Cysteine enthält, wobei hiervon wiederum eins oder mehrere an der intermolekularen Disulfidbrückenbindung beteiligt sein sollen (Staab *et al.*, 1994).

Die humane saure Sphingomyelinase (ASM, "acid sphingomyelinase") ist ein lysosomales Enzym, das für die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin verantwortlich ist. Es ist ein membran-assoziiertes Glykoprotein mit einem pH-Optimum von 4,5. Es wird vermutet, dass es als Vorläuferprotein mit einer molekularen Masse von 75 kDa synthetisiert wird und es zu verschiedenen Untereinheiten (72, 67 oder 57 kDa) prozessiert werden kann, wobei eine Größe von ~ 70 kDa innerhalb saurer Organellen wohl vorherrschend ist (Ferlinz *et al.*, 1994). Die SAPLIP-Domäne liegt im N-terminalen Bereich und ist bei zwei weiteren cDNAs, deren Genprodukte inaktiv sind, nur teilweise oder gar nicht enthalten (Ponting, 1994; Schuchman *et al.*, 1991). Ein Defekt der enzymatischen Aktivität führt zu der Typ A und Typ B Form der Niemann-Pick Krankheit. Typ A ist eine neuronopathische Erkrankung, die zum Tode im Alter von maximal 3 Jahren führt, während Patienten mit der Typ B Form wenig oder keine neurologische Beteiligung haben und bis ins Jugend- oder Erwachsenenalter überleben können.

Die Alveolaroberflächenspannung der Lunge wird durch den sog. Oberflächenfaktor, einem Film aus einem Gemisch von Phospholipiden, neutralen Lipiden und assoziierten Proteinen, auch "Surfactant" genannt, kontrolliert. Eines dieser Proteine ist das "Surfactant" Protein B, das ein Homodimer mit einer molekularen Masse von ~ 18 kDa und ein hydrophobes Protein ist. Die muren Monomere werden durch N- und C-terminale Prozessierung eines Vorläuferproteins freigesetzt und bestehen aus einer SAPLIP-Domäne. Ein zusätzliches, siebtes Cystein zwischen dem vierten und fünften Cystein der SAPLIP-Domäne dient zur Verknüpfung zweier Monomere zum aktiven Homodimer über eine Disulfidbrücke (Hawgood, 2004). Die Aktivitäten des "Surfactant" Protein B umfassen die Bindung, Lyse und Fusion von Membranen, die Beteiligung an der Lipidadsorption an Grenzflächen

zwischen Gas und Flüssigkeit, Stabilisierung von monomolekularen Oberflächenfilmen sowie den Neuaufbau von Filmen aus kollabierten Phasen (Hawgood, 2004). Außerdem soll es eine wichtige Rolle bei dem Schutz gegen Lungenentzündung verursacht durch bakterielle Infektionen spielen (Epaud *et al.*, 2003).

Das zunächst inaktiv exprimierte 15 kDa große Granulysin, ein humanes antimikrobielles Effektorprotein, bildet eine Ausnahme in der SAPLIP-Familie, da es in seiner Primärstruktur nur fünf Cysteinreste aufweist. Das erste Cystein der SAPLIP-Domäne ist durch ein Tyrosin, die Folge eines einzigen Basenaustausches im kodierenden Triplet, ersetzt. Bei der proteolytischen Prozessierung zur aktiven, 9 kDa großen Form wird außerdem ein Cysteinrest am C-Terminus abgespalten, so dass das resultierende Protein nur durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert wird (Peña und Krensky, 1997). Kürzlich wurde die Kristallstruktur des Granulysin-Moleküls vorgestellt, nach der das Protein trotz der fehlenden Disulfidbrücke die typischen 5 α -Helices aufweist (Anderson *et al.*, 2003). Die stark positiv geladene Oberfläche des Proteins wird für die Wechselwirkungen mit LPS oder den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide von Bakterienmembranen verantwortlich gemacht, was in einer Störung der hochgeordneten Lipidanordnung resultieren soll. Obwohl es nicht in der Lage zu sein scheint, eine klassische Pore zu bilden (Krensky, 2000), kann es zu einem Austreten eines in Liposomen eingeschlossenen Farbstoffes führen und schließlich zur Lyse von bakteriellen wie auch eukaryotischen Zellen führen, was auf eine derartige Störung der Membranintegrität zurückzuführen ist. Der Zelltod von eukaryotischen Zellen durch Granulysin wird letztendlich durch den Mechanismus der Apoptose ausgelöst (Clayberger und Krensky, 2003). Das Wirkungsspektrum sowie der Wirkungsmechanismus von Granulysin ist unter Verwendung eines rekombinant exprimierten Granulysin ausführlich *in vitro* untersucht worden (Stenger *et al.*, 1998). Neben vielen anderen Zielzellen zeigt das Granulysin auch Aktivität gegenüber dem humanpathogenen *Mycobacterium tuberculosis*. Es ist in der Lage den extrazellulären, nicht aber den in Monozyten vorkommenden Erreger der Tuberkulose zu töten. Erst im Zusammenwirken mit dem ebenfalls in den cytotoxischen T-Lymphozyten vorkommenden und alleine gegen *M. tuberculosis* unwirksamen Perforin, einem porenbildenden Protein, ist Granulysin jedoch in der Lage dazu. Nachdem das Perforin die Membran der Wirtszelle für das Granulysin durchlässig gemacht hat, kann es die intrazellulären Bakterien lysieren (Stenger *et al.*, 1999).

Erstaunlicherweise gibt es kein entsprechendes, homologes Protein in der Maus, dafür aber im Schwein, nämlich das bereits erwähnte NK-lysin. Das NK-lysin besteht aus 78 Aminosäuren

mit einem molekularen Gewicht von 8 kDa. Es war das erste SAPLIP, dessen Tertiärstruktur aufgeklärt wurde (Liepinsh *et al.*, 1997) und diese Strukturinformationen dienten lange Zeit als Grundlage für computergestützte, theoretische Modellierungen der Struktur anderer SAPLIPs, um diese zu vergleichen und Rückschlüsse auf Wirkungsmechanismen und Funktionen zu ziehen (Bruhn und Leippe, 1999).

Auch das NK-lysin weist viele, lokal angehäufte positiv geladene Aminosäuren auf, die für die Interaktion mit negativ geladenen Phospholipidköpfen von Membranen verantwortlich gemacht wird.

Neben den vorgestellten Vertretern der SAPLIPs von Säugetieren, konnten auch bei mehreren Wirbellosen, wie *Caenorhabditis elegans* (Banyai und Patthy, 1998), *Fasciola hepatica* (Reed *et al.*, 2000) und *Clonorchis sinensis* (Lee *et al.*, 2002) Gene kodierend für SAPLIPs identifiziert werden. In der Datenbank des Genomprojektes von *C. elegans* findet man inzwischen noch weitere Sequenzen von putativen SAPLIPs. Durch rekombinante Expression eines dieser Genprodukte, das dem NK-lysin und Granulysin am ähnlichsten ist, konnte antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden (Banyai und Patthy, 1998). Für eines der zwei rekombinant exprimierten SAPLIPs aus *F. hepatica* sowie für das rekombinant exprimierte SAPLIP, Clonorin, aus *C. sinensis* wurde hämolytische Aktivität bestimmt (Espino und Hillyer, 2003; Lee *et al.*, 2002).

Sogar im Pflanzenreich stößt man auf SAPLIP-Domänen und zwar als zusätzliche Proteindomäne von pflanzlichen Aspartat-Proteinasen, die als pflanzenspezifischer Einschub (PSI, "plant-specific insert") bezeichnet werden. Diese Domäne besteht aus ~ 100 Aminosäureresten, kommt weder in Aspartat-Proteinasen von Tieren noch von Bakterien vor und wird während der Prozessierung des Enzyms zur maturen Form normalerweise ganz oder zumindest teilweise entfernt (Simões und Faro, 2004). Sie besteht aus den typischen fünf α -Helices mit drei Disulfidbrücken, wie durch die Aufklärung der Tertiärstruktur der Aspartat-Proteinase Cardosin A von *Cynara cardunculus* (Frazao *et al.*, 1999) und Prophythepsin der Gerste *Hordeum vulgare* (Kervinen *et al.*, 1999) gezeigt werden konnte. Trotzdem handelt es sich nicht um ein wirkliches SAPLIP, sondern um eine Abwandlung, ein sog. Swaposin. Die N-terminale und die C-terminale Hälfte der SAPLIP-Domäne sind vertauscht, wobei der im SAPLIP C-terminale Abschnitt zum N-terminalen des Swaposins wird und über eine Zwischensequenz von ~ 20 Aminosäureresten mit dem im SAPLIP N-terminalen Abschnitt zum C-Terminus des Swaposins verbunden ist.

Es wird vermutet, dass dem Swaposin eine wichtige Rolle bei der vakuolären Sortierung und Lokalisierung der Proform der Aspartat-Proteinase zukommt, indem es das Vorläuferprotein in den Kontakt mit Membranen oder Membranrezeptoren bringt, die die Sortierung und den Transport vermitteln (Kervinen *et al.*, 1999). Durch die Fähigkeit des rekombinant exprimierten Swaposin von Cardosin A den Austritt von in Liposomen eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffes zu bewirken, ist aber auch eine Aufgabe bei der Abwehr von Pathogenen oder als Effektormolekül des Zelltods denkbar (Egas *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird sogar vorgeschlagen, dass Swaposine von fleischfressenden Pflanzen zur Verdauung der Beute beitragen, indem sie die Zellmembranen der Beutetiere zerstören (An *et al.*, 2002).

Anhand der vorgestellten Beispiele wird deutlich, um was für eine vielseitige Proteinfamilie es sich handelt. SAPLIPs sind in vielen Organismen an lebenswichtigen Funktionen, wie z. B. der unspezifischen Abwehr oder dem Lipidkatabolismus beteiligt und wie bei höheren Organismen beobachtet werden konnte, führt ihr Fehlen aufgrund von genetischen Defekten zu schwerwiegenden, oft tödlichen Krankheiten.

E. histolytica steht ganz an der Basis des phylogenetischen Stammbaumes der Eukaryoten. Wie eine erste Analyse der Datenbanken des Genomsequenzierungsprojekts enthüllte, besitzt dieser primitive Einzeller eine sehr viel höhere Anzahl an Genen, die für putative SAPLIPs kodieren, als bis dahin angenommen (Bruhn und Leippe, 2001). Diese hohe Anzahl an SAPLIPs verbunden mit ihrer Diversität, die an die Vielfalt der gesamten SAPLIP-Familie erinnert, lässt vermuten, dass diese Proteine wichtige und verschiedene Aufgaben in der Amöbe übernehmen und dass es sich teilweise um urtümliche Archetypen handeln könnte, die zur Entwicklung der bestehenden Diversität der SAPLIPs höherer Organismen führte.

1.6 Zielsetzung

Die Analyse der veröffentlichten genomischen Sequenzen von *E. histolytica* in einem frühen Stadium der Genomsequenzierung führte zu der Identifikation von 12 Genen, die für bis dahin unbekannte putative SAPLIPs kodieren und deren Transkription nachgewiesen werden konnte (Bruhn und Leippe, 2001). Zu diesem Zeitpunkt konnte zwar festgestellt werden, dass diese putativen SAPLIPs eine große Sequenzvariabilität abgesehen vom Cysteinmotiv aufweisen, doch die N-terminalen Bereiche der Sequenzen waren nicht eindeutig.

Die Analyse der Aktivitäten der einzelnen SAPLIP-Domänen sollten Informationen über die biologische Funktion der einzelnen Proteine in der Amöbe hervorbringen, die sowohl ähnliche Funktionen wie die Amoebapores als auch weitere Funktionen, wie von den SAPLIPs anderer Organismen bekannt, ausüben könnten.

Durch weitere Datenbankanalysen während der fortschreitenden Genomsequenzierung sollte daher die Anzahl der putativen SAPLIPs sowie deren Sequenzen verifiziert werden. Ausführliche computergestützte Analysen dieser Sequenzen sollten einer Klassifizierung dieser Proteine in den strukturellen und funktionellen Zusammenhang, der von bekannten Mitgliedern dieser Proteinfamilie zur Verfügung steht, dienen.

Viele Proteine aus solch umfangreichen Genfamilien werden in *E. histolytica* nicht oder nur unter besonderen Bedingungen exprimiert. Daher sollte die Genexpression aller SAPLIPs in axenisch kultivierten Trophozoiten bestätigt werden. Zusätzlich sollten vergleichende Genexpressionsanalysen nach Inkubation von Trophozoiten mit einer menschlichen Kolonzelllinie durchgeführt werden, um erste Hinweise auf mögliche Funktionen der Proteine zu liefern und damit zur Identifikation von weiteren Genprodukten, die in die Interaktion mit Wirtszellen und dadurch möglicherweise in die Pathogenität des Parasiten involviert sind, zu führen. Diese Analysen sollten mittels Mikroarray durchgeführt werden, um die parallele Betrachtung der SAPLIP-Gene zu ermöglichen.

Aktivitätsanalysen erfordern eine ausreichende Menge an reinem Protein, die durch rekombinante Expression erreicht werden kann. Die rekombinante Expression der Amoebapores scheiterte bisher. Es sollte daher eine Strategie zur Expression von Amoebapore-ähnlichen Proteinen entwickelt werden, die die gleichzeitige Expression einer Vielzahl von Proteinen verfolgen lässt. Diese Strategie bestand in einem "Expressionscreening" in *E. coli* mit dem grün fluoreszierenden Protein als Reporterprotein, das angewendet und optimiert werden sollte. Voraussetzung zur Expression war die Klonierung der Gensequenzen ausgehend von der natürlichen Quelle *E. histolytica*. Für die

Reinigung der rekombinanten Proteine sollte ein möglichst einfaches und universell anwendbares Reinigungsschema etabliert werden.

Die funktionellen Analysen sollten durch die von den Amoebapores bekannten Aktivitätstests und darüber hinaus durch die Etablierung und Anwendung von Aktivitätstests anderer bekannter Vertreter dieser Proteinfamilie verfolgt werden.

Letztendlich sollten die Ergebnisse, beruhend auf der sich hier bietenden Vielzahl an natürlichen Varianten innerhalb eines Organismus, den Weg bahnen für weitergehende Struktur-Funktionsanalysen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in p.A.-Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder VWR (Darmstadt) bezogen.

2.1.1 Elektrophorese-Reagenzien

Eine 30%ige Acrylamid 2K-Lösung (Verhältnis 32,33:1) und eine 30%ige Acrylamid 2K-Lösung (Verhältnis 49:1) für die SDS-Polyacrylamidgele wurden von AppliChem (Darmstadt) bezogen. Für die Agarosegelelektrophorese wurde einerseits die peqGold Universal Agarose von PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) und andererseits die NuSieve[®]GTG[®]agarose mit niedrigem Schmelzpunkt von FMC[®]BioProducts (Rockland, USA) verwendet.

2.1.2 Molekulargewichtsstandards

Für die SDS-Polyacrylamidgele wurde der MultiMark[™] Multi-Colored-Standard und der SeeBlue[®] Pre-Stained Standard von Invitrogen (Groningen, Niederlande) eingesetzt.

Als DNA-Längenstandard für die Agarose-Gele wurde der Gene Ruler[™] 100 bp DNA Ladder Plus von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) verwendet. Als Längenstandard für die RNA-Gelelektrophorese diente der 1 kb Smart Ladder von Eurogentec (Köln).

2.1.3 Immunreagenzien

Gereinigte monoklonale Penta-His-Antikörper aus der Maus wurden von Qiagen (Düsseldorf) bezogen, während mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Maus-IgG (whole molecule) aus dem Kaninchen von Sigma (Taufkirchen) stammten. Die Substrate für die alkalische Phosphatase BCIP und NBT stammten von Promega (Madison, USA). Monoklonale Anti-GFP-Antikörper aus der Maus wurden von Herrn Prof. Dr. M. Leippe zur Verfügung gestellt.

2.1.4 Fluoreszenzreagenzien

Für die direkte Markierung komplementärer DNA für die Mikroarrays wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markierte 5-Amino-propargyl-2'-deoxycytidin 5'-triphosphate (Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP) der Firma Amersham Biosciences, Freiburg verwendet. Zur Färbung der präparativen Agarosegele wurde Sybr[®] Gold Nucleic Acid Stain (S-11494) der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) eingesetzt. Für den Test auf lytische, antibakterielle Aktivität wurde Sytox[®] Green Nucleic Acid Stain (S-7020) der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) und für den Test auf porenbildende Aktivität an Liposomen wurde Calcein, free acid (Sigma, Taufkirchen) benutzt. Für den Test zur Fusion von Liposomen wurde das Octadecyl Rhodamine B (R18) der Firma Fluka, Seelze verwendet.

2.1.5 Enzyme und Inhibitoren

Die Restriktionsendonuklease Eco52I, die T4 DNA Polymerase, die T4 Polynukleotidkinase, die T4 DNA Ligase, sowie die Taq-Polymerase stammten von MBI Fermentas (St.Leon-Rot), die Reverse Transkriptase Superskript II von Invitrogen (Groningen, Niederlande) und die Benzonase von Merck (Darmstadt). Von PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) wurde die PWO-Polymerase und von MoBiTec (Göttingen) die Endoproteinase Pro-Pro-Y-Pro (Igase) eingesetzt. Als Schutz gegen die Degradierung durch Proteasen wurden "Protease Inhibitor cocktail tablets complete[™] EDTA-free" von Boehringer (Mannheim) verwendet.

2.2 Medien und Kulturplatten

LB-Medium: 20 g LB-Medium (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
ad 1l ddH₂O, autoklavieren

LB-Kulturplatten: 32 g LB-Agar (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
ad 1l ddH₂O, autoklavieren

Für die Herstellung von LB-Ampicillin-Medium bzw. LB-Ampicillin-Kulturplatten wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml steril filtriertes Ampicillin von Boehringer (Mannheim) zugesetzt. Entsprechend wurden für LB-Ampicillin-Kanamycin-Medium bzw. -Kulturplatten nach dem Autoklavieren 100 µg/ml sterilfiltriertes Ampicillin und 30 µg/ml sterilfiltriertes Kanamycin (AppliChem, Darmstadt) zugesetzt bzw. für Ampicillin-Kanamycin-

Chloramphenicol-Tetracyclin-Medium oder -Kulturplatten 100 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol und 12,5 µg/ml Tetracyclin zugesetzt.

Für die axenische Kultivierung von *Entamoeba histolytica* wurde das TY1-S33 Medium (Diamond *et al.*, 1978) verwendet:

20 g Trypticase peptone (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, USA)
10 g Hefeextrakt (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, USA)
10 g Glukose
2 g NaCl
1 g K₂HPO₄
0,6 g KH₂PO₄
0,2 g Ascorbinsäure
22,8 mg Eisenammoniumcitrat
1 g L-Cysteine
ad 800 ml ddH₂O, pH auf 6,8 mit 5N NaOH eingestellt

150 ml adultes Rinderserum (Sigma, Taufkirchen),
(2x 30-40 Minuten bei 57°C inaktiviert)
30 ml Diamond Vitamin Tween 80 Lösung (AMIMED, Allschwil, Schweiz)
20 ml Penicillin (10 000 U/ml)-Streptomycin (10 000 µg/ml)-Lösung
(GibcoBRL, Paisley, Schottland)

Das Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37°C in Kulturschalen von Nunc (Wiesbaden).

Für die Kultivierung der humanen Zelllinie HT-29 wurde RPMI-Medium verwendet:

16 g/l RPMI 1640 mit 25 mM Hepes und L-Glutamin, ohne NaHCO₃
(GibcoBRL, Paisley, Schottland)
10 % Fötale Rinderserum (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
(30-60 Minuten bei 56°C inaktiviert)
0,85 g/l NaHCO₃
1 % Penicillin (10 000 U/ml)-Streptomycin (10 000 µg/ml)-Lösung
(GibcoBRL, Paisley, Schottland)

Das Medium wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Für die Kultivierung der humanen Prosaposin-defizienten Fibroblasten wurde DMEM Medium verwendet:

	DMEM Medium mit L-Glutamin und Glukose (4,5 g/l) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
1 mM	Natriumpyruvat (GibcoBRL, Paisley, Schottland)
50 µg / ml	Gentamycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
10 %	Fötales Rinderserum (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) (30-60 Minuten bei 56°C inaktiviert)

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturschalen von Nunc (Wiesbaden). Das Ablösen der adhärent wachsenden Zellen erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 5 Minuten in einer Trypsin-EDTA Lösung (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA x 4 Na) von GibcoBRL (Paisley, Schottland).

2.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 9,2 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Für den verwendeten MES-Puffer wurde 4-Morpholinethansulfonsäure und für den HEPES-Puffer wurde N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure der Firma Roth (Karlsruhe) eingesetzt.

DEPC-Wasser: ddH₂O, 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)
über Nacht bei 37°C inkubieren, 2 x autoklavieren

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei Invitrogen (Groningen, Niederlande) hergestellt, entsalzt und in gefriergetrockneter Form verschickt. Sie wurden als Stocklösungen zu 100 pmol/µl in 10 mM Tris 7,4 gelöst. Daraus wurden Gebrauchslösungen von 10 pmol/µl in 10 mM Tris 7,4 hergestellt.

Die Sequenzen für die genspezifischen Oligonukleotide zur Klonierung der SAPLIP-Fragmente sowie die Sequenzen für die genspezifischen Oligonukleotide für die Mikroarrays befinden sich im Anhang.

T7 For	5'-TA ATA CGA CTC ACT ATA GGG
T7 Rev	5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG
M13 for	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC
CFBI	5'-GAG AGA ACG CGT GAC GAG AGA CTG ACA rGrGrG
Oligo dT	5'-GAG GAA TTC CTT TTT TTT TTT TTT TTT
pTAEx3s	5'-GGC CGT CCG CCG GCT CCG
pTAEx3as	5'-GGC CCG GAG CCG GCG GAC
GFP-as300	5'- ACA AGT GTT GGC CAC GGA AC

(for: forward, rev: reverse, s: sense, as: antisense)

2.5 Lipide

Folgende Lipide von Sigma, Taufkirchen wurden eingesetzt:

L- α -Phosphatidylcholin (PC) Type XI-E aus Eigelb, L- α -Phosphatidyl-L-serine (PS) aus Rinderhirn, Cholesterol Sigma Qualität (Chol), Galaktosylceramid (GC) aus Rinderhirn und ein an Phosphatidylcholin angereicherter Lipidextrakt (Typ II-S) aus Sojabohnen (PCIIS). Sphingomyelin aus Eigelb, Cardiolipin Dinatriumsalz aus Rinderhirn, Phosphatidylethanolamin aus Rinderhirn, Phosphatidylglycerin aus Eigelb und Phosphatidylinositol Ammoniumsalm aus Rinderleber stammten von Fluka, Seelze.

2.6 Bakterien

Für die Transformation der Bakterien zum Sequenzieren wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* XL1Blue von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) verwendet. Für die Transformation zur Überprüfung der Expression durch Fluoreszenzanregung der Transformationskolonien wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21(DE3) von Novagen (Madison, USA) verwendet. Zur Expression der SAPLIP/GFP-Fusionsproteine wurden *Escherichia coli* BL21(DE3) [pAPlacI^Q] (eine freundliche Gabe von PD Dr. J. Clos, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg) oder *Escherichia coli* Rosetta-gamiB(DE3) von Novagen (Madison, USA) eingesetzt.

Die antibakterielle Aktivität wurde anhand folgender Bakterien getestet:

Escherichia coli K-12 (ATCC 23716), *Bacillus subtilis* (Stamm 60015) und *Bacillus megaterium* ATCC 14581 aus dem Botanischen Institut der Universität Hamburg, *Escherichia coli* K-12 D31 (Boman *et al.*, 1974) aus dem Institut für Zoologie, Freie Universität Berlin und *Serratia plymuthica* aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg.

2.7 Eukaryotische Organismen und Zellen

Für die RNA-Gewinnung wurden Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* des Stamms HM1:IMSS, eine freundliche Gabe von Frau PD Dr. I. Bruchhaus (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg), verwendet. Für die Kokultivierung von *E. histolytica* mit eukaryotischen Zellen wurde die humane Kolontumorzelllinie HT29, eine freundliche Gabe von Herrn PD Dr. C. Hauck (Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg), eingesetzt. Prosaposin-defiziente, humane Hautfibroblasten für den Versuch zur Wiederherstellung von Prosaposin-Defekten wurden freundlicher Weise von Professor M. Elleder (Institut für erbliche Stoffwechselkrankheiten, Karl Universität, Prag) zur Verfügung gestellt. Sie stammen von einem Patienten mit Prosaposin-Defekt kurz vor seinem Tode und wurden immortalisiert durch Transformation mit SV-40 (Hulkova *et al.*, 2001).

2.8 Proteine

Für die antibakteriellen Tests wurden als Vergleichspeptide Melittin und Cecropin B beide von Sigma, Taufkirchen eingesetzt.

Außerdem wurde reines Amoebapore A eingesetzt, das freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Leippe zur Verfügung gestellt wurde.

2.9 Sequenzanalysen und Homologievergleiche

Homologiesuchen für die Identifikation der SAPLIP-Sequenzen wurden bei den *Entamoeba histolytica* Genomdatenbanken der Institute "The Institute of Genome Research" (TIGR) unter (<http://www.tigr.org>) und "The Wellcome Trust Sanger Institute" unter (<http://www.sanger.ac.uk/>) mit der Matrix BLOSUM 62 ausgeführt. Folgende Sequenzen von bekannten Mitgliedern der SAPLIP Proteinfamilie wurden als Suchmatrizen verwendet: "Accession" Nummer AAA29111, CAA54225, CAA54226, AAK21658, AAL01158, AAB06759, AAD49964, BAA32237, GI:2392473, Q29075, P22749, AAA60212, AAH07612, BAA23126, AAB02579, AAF88069, AAA81417, AAA81416, B89567, S41017, AAC48055, AAC48054 und AAB81008. Zusätzlich wurden auch alle auf diese Weise neu identifizierten SAPLIP-Sequenzen wiederum als Suchmatrize eingesetzt: ENTBD24TF (AZ529784), Ent465e12.p1c (keine Acc.), ENTGG73TR (AZ544462), ENTPL91TR (BH146568), ENTCX07TF (AZ530711), ENTdq84 (AZ546992), ENTFF25TF (AZ546503), Ent396f12.q1c (keine Acc.), ENTNQ83TF (BH131027), ENTJV93TF (AZ687176), ENTKI17TF (AZ692153), ENTKI17TF (AZ692153), ENTKI17TF (AZ692153), ENTEG61TF (AZ550036), ENTID70TF (AZ685704), ENTID70TF (AZ685704), ENTJB84TF (AZ690015), ENTNW48TR (BH132588), ENTEW34TF (AZ546519).

Homologe Proteine zu den identifizierten SAPLIPs wurden mit Hilfe des Programms Blast 2.2.6 (Altschul *et al.*, 1997) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> mit der Matrix BLOSUM 62 gesucht. Die Analyse wurde ausführlich im September 2003 durchgeführt und im August 2005 überprüft. Vorhersagen für Signalpeptide und ihre Spaltstellen wurden mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) getroffen (Nielsen *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1997). Die Proteine wurden auf die Anwesenheit von funktionellen und strukturellen Domänen mit Hilfe der Interpro-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) untersucht. Die Sequenzvergleiche und Sequenzübersetzungen wurden mit dem Programm DNAsis von Hitachi Software Engineering Europe, Olivet Cedex, Frankreich erstellt.

Der Ähnlichkeitsvergleich mehrerer Sequenzen wurde mit dem Programm ClustalW unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> durchgeführt (Thompson *et al.*, 1994), wobei zur Farbgebung MACBOXSHADE (K. Hofmann, M.D. Baron, <http://www.isrec.isb-sib.ch/ftp-server/boxshade/>) verwendet wurde. Zur graphischen Darstellung des "unrooted" Stammbaumes wurde das Programm Treeview verwendet (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) (Page, 1996).

2.10 Molekulare Modellierung

Die Modellierungen der Proteinstrukturen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Bruhn, Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg durchgeführt. Die Modellierung der Struktur von SAPLIP 3 wurde auf der Basis der Saposin C Struktur (Protein Datenbank Accession Nummer: 1M12) und die für die SAPLIP-Domäne 12 auf der Basis der Amoebapore A Struktur (Protein Datenbank Accession Nummer: 1OF9) durchgeführt. Für die Modellierung sowie für die Berechnung der molekularen Oberflächen und der elektrostatischen Potentiale wurde das Programm SwissPdb Viewer verwendet (Guex und Peitsch, 1997).

2.11 Genexpressionsanalyse

2.11.1 Kokultivierung von humanen HT29-Zellen mit Trophozoiten von *E. histolytica*

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden während der logarithmischen Wachstumsphase durch Inkubation für 5-10 min auf Eis vom Kulturschalenboden abgelöst und mit 300 x g für 5 min bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde 2 x mit serum-freiem TY1-S33-Medium gewaschen.

Ein konfluenter Zellrasen einer 25 cm²-Kulturflasche von HT29-Zellen wurde 2 x mit serumfreiem RPMI-Medium gewaschen. Pro Versuchsansatz wurden 2,6 x 10⁶ Trophozoiten zu einem solchen HT29-Zellrasen gegeben, wobei eine Mischung von serumfreiem RPMI und TY1-S33-Medium im Verhältnis 5:3 als Inkubationsmedium diente. Die Inkubation erfolgte unter anaeroben Bedingungen für 6 Stunden bei 37°C.

Zur Kontrolle wurden parallel 2,6 x 10⁶ Trophozoiten aus der jeweils geernteten Charge ohne HT29-Zellen unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

2.11.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Trophozoiten von *E. histolytica*

Nach 6 Stunden wurden die Trophozoiten geerntet und zentrifugiert. Das Sediment einer Kulturflasche wurde in 1ml TRIZOL[®]-Reagenz (Invitrogen, Groningen, Niederlande) aufgenommen und die Isolierung nach Angaben des Herstellers einschließlich der RNA-Präzipitation durchgeführt. Anschließend wurde die RNA in diesem Zustand bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die eingefrorenen Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann für 10 Minuten bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert, der

1%iges, denaturierendes Agarosegel: 1 % Agarose

1 x MOPS-Puffer

kochen, abkühlen lassen auf 50-60°C

0,4 mM Guanidinthiocyanat

0,75 µg/ml Ethidiumbromid

Zur Analyse der RNA-Proben wurden Aliquots 1:1 mit dem Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gebracht. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einem 1%igem, denaturierenden Agarosegel in 1x MOPS-Puffer. Als Längenstandard diente der 1 kb Smart Ladder von Eurogentec (Köln). Anschließend erfolgte die Dokumentation der RNA-Banden durch Fotografieren im UV Licht bei einer Anregung von 254 nm (Maniatis, 1989).

2.11.6 Herstellung markierter, komplementärer DNA (cDNA) mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter dCTPs

Das Farbstoff-spezifische Standard-RNA-Gemisch aus 4 rekombinant exprimierten Genfragmenten von *Saccharomyces cerevisiae* sowie die Luciferase-Kontroll-RNA (Promega GmbH, Mannheim) wurden freundlicher Weise von Frau Dr. S. Theiß (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Zu 20, 15 oder 13,5 µg RNA wurden 2 bzw. 4,5 µg Random Nonamere Oligonukleotide (Sigma, Taufkirchen), 4 µl bzw. 2 µl OligodT₁₅-Oligonukleotide (0,5 µg/µl, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 2 µl eines Farbstoff-spezifischen Standard-RNA-Gemischs, 1 µl Luciferase-Kontroll-RNA (10 ng/µl) ad 18 µl RNase-freies Wasser gegeben. Es wurde 5 min bei 70°C zum Lösen von Sekundärstrukturen der RNA und anschließend sofort auf Eis inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden eine zuvor hergestellte Mischung von 0,8 µl dCTP (10 mM), je 1µl dATP, dGTP, dTTP (je 20 mM), 1 µl DTT (0,1 M), 8 µl 5x First Strand buffer (Invitrogen, Groningen, Niederlande), 1 µl RNase Out (40 U/µl, Invitrogen, Groningen, Niederlande) und 1µl Superskript II™ Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ad 20 µl RNase-freies H₂O gegeben. Alle folgenden Inkubationen wurden im Dunkeln ausgeführt, da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind. Der Ansatz wurde mit 2 µl des mit dem gewünschten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten dCTP versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Anlagerung der Oligonukleotide inkubiert. Es folgte eine Inkubation von 2 Stunden bei 42°C für das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA durch die Reverse Transkriptase und anschließend eine Inkubation von

15 Minuten bei 70°C zur Inaktivierung des Enzyms und Auflockerung der Sekundärstruktur des RNA/cDNA Doppelstrangs. Nach kurzem Abkühlen wurde der RNA Strang durch den Zusatz von 2 µl DNase-freier RNase (Qiagen, Hilden) in einer Inkubation bei 37°C für 45 Minuten abgebaut. Um freies Cy3- oder Cy5-dCTP zu entfernen, wurden die Reaktionsansätze mittels MicroSpin™ G-50-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Wenn das Genexpressionsmuster zweier Kulturen verglichen werden sollte, wurden die entsprechend zueinandergehörenden, mit den gegensätzlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten cDNA-Ansätze vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac SC110, Savant Instruments Inc., Holbrook, USA) getrocknet.

2.11.7 Hybridisierung von cDNA an genspezifische Oligonukleotide

20 x SSC: 3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat pH 7 (mit 1 M NaOH eingestellt)

Die Sequenzen der *E. histolytica*-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) für jedes Gen speziell ausgewählt, mit dem Ziel gleiche Bedingungen für die Hybridisierung zu erhalten. Die Oligonukleotide besaßen eine zusätzliche Aminogruppe, die für die Immobilisierung genutzt wurde. Die Oligonukleotide für die Luciferase-Kontrolle und die *S. cerevisiae*-Kontrollen wurden freundlicherweise von Frau Dr. S. Theiß (Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide für die SAPLIP-Gene befinden sich im Anhang. Die Immobilisierung der Oligonukleotide auf QMT EPOXY Glasträger (Quantifoil, Jena) wurde von Frau A. Schramm im Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg durchgeführt.

Vor der Hybridisierung wurden die QMT EPOXY Glasträger entsprechend den Angaben des Herstellers gewaschen und freie Bindungsstellen blockiert. Die cDNA-Proben wurden in 22,5 µl ddH₂O, 4,5 µl 20x SSC und 3 µl 1% SDS aufgenommen und 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe kurz auf Eis, dann luftblasenfrei auf die Glasfläche mit den immobilisierten Oligonukleotiden gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Hybridisierung wurde in einer feuchten Hybridisierungskammer bei 50°C über Nacht durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger nach Angaben des Herstellers gewaschen und getrocknet.

2.11.8 Datenerfassung und Auswertung

Die getrockneten Objektträger wurden mittels des GMS 418 Array-Scanners (Genetic Micro Systems, Woburn, USA) zur Dokumentation und Auswertung zum einem bei 532 nm (Cy3) und dann bei 635 nm (Cy5) gescannt. Die Visualisierung der Genexpressionsdaten von den Array-Bildern, sowie die Messung und Quantifizierung erfolgte mittels der ImaGene Software Version 5.6 (Bio Discovery, El Segundo, USA). Das lokale Hintergrundsignal wurde von jedem Signalwert abgezogen. Für die Normalisierung wurden die Daten durch die Software Genesight-lite Version 4.1 (Bio Discovery, El Segundo, USA) importiert und zusammengestellt. Es wurde eine Normalisierung nach der Lowess-Methode durchgeführt. Die Verhältnisse der Signalwerte von dem Experimentalsignal und dem Kontrollsignal und deren Logarithmus zur Basis 2 wurden anhand der normalisierten Werte berechnet. In die Analyse wurden lediglich Signale einbezogen, deren normalisierter und logarithmierter Wert über 9 lag, was einer Signalintensität von 512 entspricht. Durch die Logarithmierung zur Basis 2 gilt ein Gen, dessen Quotient aus dem Medianwert der Experimentalsignale durch den der Kontrollsignale einen Wert von + 1 ergibt als zweifach hochreguliert, mit einem Wert von -1 als zweifach herunterreguliert und mit einem Wert von 0 als nicht reguliert.

2.11.9 mRNA Isolierung mittels OligodT-gekoppelter "Avidin-Polystyrene Beads"

2x Biotin-Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl
2x mRNA-Bindungspuffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 1 M KCl
mRNA-Waschpuffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,15 M KCl
cDNA-Waschpuffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA

Zur Kopplung von "Avidin-Polystyrene Beads" mit biotinylierten OligodT-Oligonukleotiden wurden 400 pmol (40 µl) "Avidin-Polystyrene Beads" (0,7-0,9/10ml; 5,0 % w/v) von Kisker (Mühlhausen) 2x in TE-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 16 000 x g für 3 Minuten). Anschließend wurden sie in 50 µl 2x Biotin-Bindungs-Puffer aufgenommen und 50 µl biotinylierten OligodT-Oligonukleotiden (10 pmol/µl) hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 37°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend wurde wieder 2x mit TE-Puffer gewaschen. Die gekoppelten "Beads" wurden in 100 µl 2x mRNA-Bindungspuffer aufgenommen. Für die mRNA Isolierung wurde die polyadenylierte mRNA mit den OligodT-gekoppelten "Beads" hybridisiert. 1 oder 10 µg Gesamt-RNA (Gewinnung siehe 2.11.2) wurden in einem

Volumen von 50 µl ddH₂O für 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Pro Ansatz wurden zu 5 µl der gekoppelten "Beads" 45 µl 2x mRNA Bindungspuffer und der jeweilige RNA-Ansatz (50 µl) gegeben. Anschließend wurde 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die "Beads" wurden dann 3 Minuten bei 16 000 x g und 4°C sedimentiert, 2x mit eiskaltem mRNA-Waschpuffer und 1x mit eiskaltem cDNA-Waschpuffer gewaschen. Die Lösungen der cDNA Synthese wurden direkt auf die "Beads" mit der isolierten mRNA gegeben.

2.11.10 Herstellung komplementärer DNA (cDNA) mit anschließender Polymerase-Ketten-Reaktion

Zu den sedimentierten "Beads" mit der gekoppelten mRNA wurden 4 µl 5x First-strand Puffer (Invitrogen, Groningen, Niederland), 8 µl eines Gemischs der vier dNTPs (je 2,5 mM), 0,5 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml), 0,5 µl des CFBI-Oligonukleotids (50 pmol/µl), 0,5 µl Superskript™ II Reverse Transkriptase (200 U/µl) von Invitrogen (Groningen, Niederlande), 0,5 µl Ribonuklease Inhibitor (4 U/µl) (Invitrogen, Groningen, Niederland), 2 µl DTT (0,1 M), 2,5 µl ddH₂O und als letztes 0,5 µl MnCl₂ (40 mM).

Dieser Ansatz wurde 45 Minuten bei 42°C und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 2x mit TE-Puffer gewaschen und die Beads mit der cDNA in 50 µl TE-Puffer bei 4°C gelagert. Die cDNA wurde in einer PCR mit den spezifischen SAPLIP-Oligonukleotiden eingesetzt.

Es wurde die PCR-Methode nach (Saiki *et al.*, 1988) angewendet. Als Matrize diente pro Ansatz 1 µl der cDNA aus der reversen Transkription. Es wurden in einem 50 µl Ansatz je 5 pmol der genspezifischen SAPLIP-sense und SAPLIP-antisense Oligonukleotide eingesetzt. Nach Zugabe von 0,5 µl Taq-Polymerase (5u/µl) der Firma Eppendorf (Hamburg), 5 µl des dazugehörigen 10x Puffers und eines Gemisches der 4 dNTPs (je 2,5 mM) wurde in 30 Zyklen im Mastercycler gradient von Eppendorf das Fragment amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus der Denaturierung der DNA (30 sec 95°C), der Hybridisierung der Oligonukleotide mit der DNA (30 sec 45°C oder 50°C) und der Neustrangsynthese (1 min 72°C). Vor Beginn der Zyklen wurde eine einmalige Denaturierung der DNA für 2 Minuten bei 95°C und abschließend eine Neustrangsynthese für 7 Minuten bei 72°C durchgeführt.

2.11.11 Analyse der PCR-DNA-Fragmente auf einem 2%igem Agarose-TBE-Gel

6x Probenpuffer: 0,25% Bromphenolblau (w/v)
30% Glycerin (v/v) (97%)

TBE-Puffer: 90 mM Tris/Borat, 2mM EDTA, pH 8

Zur Analyse der DNA-Fragmente wurden diese in einem 2%igem Agarosegel in TBE-Puffer bei einer Spannung von 74 V elektrophoretisch getrennt. Als DNA-Längenstandard diente der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus von MBI Fermentas (St.Leon-Rot). Anschließend wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 15 Minuten inkubiert und die Dokumentation der DNA-Banden erfolgte durch Fotografieren mit der Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000 (BioRad, München) im UV Licht bei einer Anregung von 254 nm (Maniatis, 1989).

2.11.12 Fällung von DNA

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt. Nach dem Mischen wurde 20 Minuten bei 16 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei 16 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, während das Sediment bei 50°C getrocknet und anschließend in 10 mM Tris 7,4 gelöst wurde.

2.11.13 Klonierung der SAPLIP-DNA-Fragmente in den "pDrive Cloning Vector" oder den "pCR®-2.1-TOPO-Vektor"

Es wurde das "TA-Cloning Kit" von Invitrogen (Groningen, Niederlande) oder das "QIAGEN PCR Cloning Kit" von Qiagen (Hilden) verwendet. Zu 50 ng "pDrive Cloning Vector" oder 10 ng "pCR®-2.1-TOPO-Vektor" wurden in einem Volumen von 10 µl ein 5-10 facher molarer Überschuss an DNA-Fragment, 5 µl 2x Ligationsmix und gegebenenfalls die entsprechende Menge ddH₂O gegeben und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

2.11.14 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

TFB I: 30 mM Kaliumacetat
 100 mM Kaliumchlorid
 10 mM Calciumchlorid
 15 % (w/v) Glycerin
mit 0,2 N Essigsäure auf pH 6 einstellen
 50 mM Manganchlorid zusetzen und auf pH 5,8 einstellen

TFB II: 10 mM MOPS
 75 mM Calciumchlorid
 10 mM Kaliumchlorid
 15 % (w/v) Glycerin
mit Natronlauge auf pH 7 einstellen

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

3 ml LB-Medium (Zusatz von Tetracyclin bei XL1-Blue Zellen bzw. Kanamycin bei BL21(DE3)-[pAPlacIQ]-Zellen) wurden aus einem Glycerinstock mit den entsprechenden *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde 1:50 mit LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 weiter bei 37°C kultiviert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und 5 Minuten bei 1 500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/3 Volumen kaltem TFB I gelöst und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 1 500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml pro 50 ml Ausgangsvolumen kaltem TFB II aufgenommen und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden je 200 µl in vorgekühlte Gefäße gefüllt und bei -80°C gelagert.

2.11.15 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

50-300 ng Plasmid-DNA wurden mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen versetzt, 2 Minuten auf Eis inkubiert und auf angewärmte LB-Ampicillin- (oder zusätzlich Kanamycin-) Kulturplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Für die Transformation der pDrive-Konstrukte enthielten die Platten zusätzlich X-Gal (32 µg/ml LB-Agar) und IPTG (160 µM) für das Blau/Weiß "Screening". Anschließend wurden die Platten

für einige Stunden bei 4°C inkubiert, um die Entwicklung der blauen Färbung zu beschleunigen und damit die Unterscheidung zwischen blauen und weißen Kolonien zu erleichtern.

2.11.16 Kontrolle der Transformation durch PCR mit vektor-internen Oligonukleotiden

Als Matrize dienten die transformierten, weißen Bakterienkolonien. Es wurden je 2 pmol der M13 For- und M13 Rev-Oligonukleotide, sowie 0,5 U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), 2 µl des dazugehörigen 10x PCR-Puffers und 2 µl eines Gemischs der vier dNTPs (je 2 mM) hinzugefügt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Es wurden 25 Zyklen, wie unter 2.11.10 beschrieben, mit einer Hybridisierungstemperatur von 50°C durchgeführt.

Die Analyse der PCR-DNA erfolgte auf einem 1%igem Agarose-TBE-Gel (siehe 2.11.11).

2.11.17 DNA-Isolierung mittels hydrophober Interaktionschromatographie

Es wurde das "Nucleo-Spin-Kit" der Firma Machery und Nagel (Düren) mit den dazugehörigen Lösungen verwendet.

10 ml LB-Ampicillin-Medium wurden mit einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden 5 Minuten bei 3550 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit dem Sediment wurde weiter nach Angaben des Herstellers verfahren. Abweichend wurde zum Eluieren der DNA die Säule mit 70µl AE-Puffer beladen und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde 1 Minute bei 16 000 x g zentrifugiert und im Eluat eine Bestimmung der DNA-Konzentration durchgeführt.

2.11.18 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm photometrisch in dem Ultraspec 3100 pro Spectrophotometer der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) gemessen. Die DNA-Konzentration wurde nach folgendem Zusammenhang bestimmt:

$$C_{\text{DNA}} = \Delta\text{OD}_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnungsfaktor} = [\text{mg/ml doppelsträngige DNA}]$$

2.11.19 Analyse der Nukleotidsequenz

"ABI Prism[®] BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit" der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1980).

0,5 µg DNA, 2 µl "Big-Dye"-Enzymlösung, 2 µl 5x Sequencing-Puffer und 10 pmol des entsprechenden Oligonukleotides wurden mit ddH₂O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Es wurden entweder T7 For- oder GFP-as300-Oligonukleotide für die Sequenzierung von Fragmenten im Expressionsvektor bzw. M13 for- oder M13 rev-Oligonukleotide für die Sequenzierung von Fragmenten im pDrive-Vektor verwendet.

Die Sequenzreaktion wurde mit dem "Mastercycler gradient" der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus der Denaturierung der DNA (30 Sekunden bei 96°C), der Hybridisierung des Oligonukleotids (15 Sekunden bei 51°C) und der Kettenverlängerung bis zum Einbau eines markierten ddNTPs (4 Minuten bei 60°C), woraus der Abbruch der Verlängerung resultierte. Vor Beginn der Zyklen wurde eine einmalige Denaturierung der DNA für 2 Minuten bei 96°C durchgeführt und anschließend in insgesamt 25 Zyklen amplifiziert.

Zu den 10 µl Sequenzierungsansatz wurden 90 µl ddH₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 250 µl Ethanol absolut gegeben, durchmischt und 15 Minuten bei 16 000 x g und 15°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 250 µl 70% Ethanol versetzt. Nochmals wurde 15 Minuten bei 16 000 x g und 15°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde bei 50°C getrocknet, in 25 µl "Template Supression Reagent" (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen, 2 Minuten bei 90°C inkubiert und dann einer Service-Einheit des Instituts für Molekulare Infektionsforschung übergeben. Die Auswertung wurde mit Hilfe des "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" von Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt.

2.12 Klonierung zur Expression der SAPLIP/GFP-Fusionsproteine

Der Expressionsvektor pTAEx2 wurde von Frau Dr. H. Bruhn auf der Basis des pRSet 5d-Vektors (Invitrogen, Groningen, Niederlande) konstruiert und zur Verfügung gestellt.

2.12.1 Einfügen der Schnittstelle für die Endoproteinase Igase

Der vorgegebene Vektor wurde um eine Igase-Schnittstelle zur Trennung des exprimierten Proteins von dem Fusionspartner, dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), durch Einfügen eines doppelsträngigen Oligonukleotids erweitert. Hierzu wurden 400 ng Vektor in einem Volumen von 10 µl mit 10 U der Restriktionsendonuklease Eco52I in dem dazugehörigen 1x Puffer für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Auftragen von 0,5 µl des Ansatzes auf ein 1%iges TBE-Agarosegel (2.11.11) überprüft. Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Restriktionsendonuklease 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Dann wurden zur Dephosphorylierung der überhängenden Vektorenden 5u "Calf Intestine Alkaline Phosphatase" zu dem Ansatz gegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit dem "Concert Rapid PCR Purification System" (Invitrogen, Groningen, Niederlande) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Zur Phosphorylierung der Oligonukleotide wurden je 10 pmol TAEx3-sense-Oligonukleotid und TAEx3-antisense-Oligonukleotid in einem Volumen von 10 µl mit 10 U der T4 Polynukleotidkinase (MBI Fermentas, St.Leon-Roth) in dem 1x Reaktionspuffer A und mit 10 nmol ATP für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide wurde der Ansatz für 2 Minuten bei 95°C, für 10 Minuten bei 47°C und bis zum Einsatz für die Ligation auf Eis inkubiert. Zu 100 ng des gereinigten, geschnittenen Vektors wurden in einem Volumen von 20 µl 2 µl des Oligonukleotidansatzes, 10 U der T4-DNA Ligase und 2 µl des 10x Ligationspuffers gegeben und 3,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Anteil von 5 µl wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und für die Transformation von chemisch kompetenten XL1-Blue-*E. coli*-Zellen wie unter 2.11.15 beschrieben eingesetzt. Die Kolonien dienten als Matrize für eine Kontroll-PCR mit dem spezifischen TAEx3-sense-Oligonukleotid und einem vektorinternen Oligonukleotid (GFP-as) wie unter 2.11.16 beschrieben. Aus den positiven Kolonien wurde wie unter 2.11.17 beschrieben die DNA isoliert und die DNA Sequenz wie unter 2.11.19 beschrieben analysiert. Der so um die IgA-Protease Schnittstelle ergänzte Vektor wird im Folgenden als pTAEx bezeichnet.

2.12.2 Anreicherung der SAPLIP-DNA-Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für die Klonierung in den Expressionsvektor pTAEx

Es wurde eine PCR wie unter 2.11.10 beschrieben durchgeführt, doch wurden 1,5 U PWO-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) und des dazugehörigen Puffers statt der Taq-Polymerase eingesetzt, um DNA-Stränge mit glatten Enden zu synthetisieren. Außerdem wurde die Zyklenzahl auf 30-35 erhöht und die Neustrangsynthese für 2 Minuten durchgeführt. Als Matrize dienten die SAPLIP/pDrive- oder SAPLIP/pCR2.1Topo-Konstrukte.

2.12.3 Spaltung des Expressionsvektors pTAEx durch die Restriktionsendonuklease Eco52I

2,5 µg Vektor-DNA wurden in einem Volumen von 10 µl mit 10 U Eco52I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in dem dazugehörigen 1x Puffer für 1,5-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde wie unter 2.11.11 beschrieben auf einem 1%igem TBE-Agarosegel kontrolliert und anschließend das Enzym durch eine Inkubation des Ansatzes für 10 Minuten bei 70°C inaktiviert.

2.12.4 Auffüllen der überhängenden DNA-Enden des gespaltenen Expressionsvektors pTAEx und anschließende Dephosphorylierung

Der Restriktionsansatz von 2.12.3 wurde mit 0,5 µl eines Gemischs der 4 dNTPs (je 2mM) und 0,5 U der T4 DNA-Polymerase zum Auffüllen der überhängenden Enden mit den entsprechenden dNTPs und damit Herstellung von glatten Enden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 5 U "Calf Intestine Alkaline Phosphatase" gegeben und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 70°C inkubiert oder der Ansatz bei -20°C gelagert.

2.12.5 Reinigung des pTAEx-Vektors mittels hydrophober Interaktionschromatographie

Es wurde das "JETQUICK PCR Purification Spin Kit" der Firma Genomed (Löhne) verwendet. Der Reaktionsansatz von 2.12.4 wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und weiter nach Angaben des Herstellers verfahren.

2.12.6 Analyse und Gewinnung der SAPLIP-Fragmente mittels eines 1%igen LMP-Agarosegels

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8

Zur Gewinnung der SAPLIP-DNA-Fragmente wurden diese auf einem 1%igem LMP-Agarosegel in TAE-Puffer bei einer Spannung von 42 Volt getrennt. Anschließend wurde das Gel in einer SYBR Gold Färbelösung (1:10 000 Verdünnung der "SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain" Stocklösung (MoBiTec, Göttingen) in TAE-Puffer) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und die entsprechenden DNA-Banden auf dem "Dark Reader Transilluminator" (MoBiTec, Göttingen) ausgeschnitten. Die SAPLIP-Banden wurden in ein Quick-Spin-Basket-Gefäß der Firma Ambion (Austin, USA) überführt und kurz bei -20°C eingefroren. Zum Eluieren der DNA aus der Agarose wurde 5 Minuten bei 16 000 x g und 4°C zentrifugiert. Die DNA im Zentrifugat wurde gefällt (siehe 2.11.12) und das Sediment in 10 μl 10 mM Tris-Puffer pH 7,4 aufgenommen.

2.12.7 Ligation der SAPLIP-Fragmente in den Expressionsvektor

Zu je 40 ng des Vektors wurde der 3-fache molare Überschuß in einem Volumen von 10 μl des entsprechenden SAPLIP-Fragments, 1 μl 10 x Ligationspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und 5 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gegeben. Diese Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend kurz bei -20°C eingefroren oder für 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

2.12.8 Herstellung elektroporationskompetenter *E.coli*-Zellen

10 ml LB-Medium wurden aus einem Glycerinstock mit dem entsprechenden *E.coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde 1:100 mit 1 Liter LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,4 weiter bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und 10 Minuten bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 Liter kaltem, autoklaviertem ddH₂O gelöst und erneut 10 Minuten bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in 500 ml kaltem, autoklaviertem ddH₂O aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in 20 ml kaltem, autoklaviertem ddH₂O aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieses

Sediment wurde in dem gleichen Volumen sterilfiltriertem 10% Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots in vorgekühlte Gefäße gefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.12.9 Elektroporation von elektroporationskompetenten *E.coli*-Zellen

1 µl Ligationsansatz wurden mit 50 µl elektroporationskompetenten *E.coli*-Zellen (auf Eis aufgetaut) versetzt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegeben. Mit dem Elektroporationsgerät Easyject Prima EQUIBIO von Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) erfolgte die Elektroporation bei 180 V/cm. Anschließend wurde sofort 1 ml warmes LB-Medium zu den Zellen gegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 100 – 1000 µl wurden auf angewärmte LB-Kulturplatten (versetzt mit den entsprechenden Antibiotika) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht oder 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.12.10 Analyse der Transformation durch Anregung der Bakterienkolonien mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm

Nach 1-2 Tagen Lagerung der Transformationsplatten bei 4°C wurden diese unter UV-Licht bei einer Anregung von 366 nm betrachtet und fluoreszierende Kolonien für die anschließende Kontroll-PCR eingesetzt (siehe 2.12.11).

2.12.11 Kontrolle der fluoreszierenden Transformationskolonien durch PCR mit vektor-internen Oligonukleotiden

Als Matrize dienen die transformierten, fluoreszierenden Bakterienkolonien, von denen je ein kleiner Anteil mit einer sterilen Pipettenspitze in ein PCR-Gefäß mit ddH₂O überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert wurde. Es wurden je 2 pmol der T7 For- und der GFPas-Oligonukleotide, sowie 0,5 U Taq-Polymerase (Eppendorf, Hamburg), 2 µl des dazugehörigen 10x PCR-Puffers, und 2 µl eines Gemischs der vier dNTPs (je 2 mM) hinzugefügt. Es wurden 25 Zyklen, wie unter 2.11.10 beschrieben, durchgeführt mit einer Hybridisierungstemperatur von 50°C .

Die Analyse der PCR-DNA erfolgte auf einem 1 oder 2%igem Agarose-TBE-Gel (siehe 2.11.11).

2.12.12 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Lösung 1: 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5

Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Lösung 3: 3 M Kaliumacetat pH 5,5, 2 M Essigsäure

Die Schnellpräparation der Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Ish-Horowicz und Burke durchgeführt (Ish-Horowicz und Burke, 1981).

Es wurden 2,5 ml einer über Nacht kultivierten Bakterienkultur 2 Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert und das Sediment in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 und Mischen wurde 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml absolutem Ethanol gemischt und erneut für 15 Minuten bei 16 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 50°C getrocknet und abschließend in 30 µl 10 mM Tris 7,4 gelöst.

2.13 Proteinanalyse

2.13.1 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung der Proteine im Bereich von 1 bis 200 kDa, wurde das Tricinegelsystem verwendet (Schägger und von Jagow, 1987). Das Gelsystem setzte sich zusammen aus einem 13%igen Trenngel und einem 4%igem Sammelgel.

Acrylamid/Bisacrylamid 30:2: 30% Acrylamid 2 K-Lösung (Verhältnis 49:1)
(29,4% Acrylamid 2K, 0,6% Bisacrylamid)

Acrylamid/Bisacrylamid 30:3: 30% Acrylamid 2 K-Lösung (Verhältnis 32, 33:1)
(29,1% Acrylamid 2K, 0,9% Bisacrylamid)

Ammoniumpersulfat (APS) 40%: 400 mg in 1 ml ddH₂O gelöst

Gelpuffer pH 8,45 (3x): 36,3 g Tris
0,3 g SDS
mit ddH₂O auf 80 ml auffüllen
pH 8,45 mit 12,5 N HCl einstellen
ad 100ml ddH₂O

5x Probenpuffer: zu 40 ml ddH₂O
3,8 g Tris base
50 ml Glycerin (87 %)
5 g SDS
1 mg Bromphenol Blau
auf pH 6,8 mit 1 N HCl einstellen
ad 100 ml ddH₂O

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Trenngel (13%): 2,167 ml Acrylamid 30:2
(AA:BIS = 49:1) 1 ml Glycerin (87%)
1,667 ml Gelpuffer (3x)
0,166 ml ddH₂O
2,5 µl TEMED
5 µl APS (40%)

Sammelgel (4%): 0,433 ml Acrylamid 30:3
(AA:BIS=32,33:1) 0,766 ml Gelpuffer (3x)
1,091 ml ddH₂O
3,3 µl TEMED
6 µl APS (40%)

Anodenpuffer: 0,2 M Tris base
mit HCl auf pH 8,9 einstellen

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris base
0,1 M Tricine
0,1% SDS (w/v)
mit HCl auf pH 8,25 einstellen

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (5x) versetzt, wenn nicht anders angegeben 5 Minuten auf 95°C erhitzt und im Polyacrylamidgel mit dem Penguin Vertical Electrophoresis Systems P8DS von OWL, Portsmouth, USA getrennt. In der Einlaufphase

wurde eine Stromstärke von 25 mA/Gel angelegt, die später auf 50 mA/Gel erhöht wurde. Die Größe der Gele betrug 10 cm x 10 cm x 0,5 mm.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden Standardproteine (MultiMark™ Multi-Colored-Standard oder SeeBlue® Pre-Stained Standard) der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) eingesetzt.

2.13.2 Silbernitratfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Lösung 0: 3% Glutardialdehyd (v/v), 160 mM Borsäure (w/v), pH 8,2

Lösung 1: 30% Ethanol (v/v); 10% Eisessig (v/v)

Lösung 2: 30% Ethanol (v/v); 0,5 M Natriumacetat; 0,5% Glutardialdehyd (v/v); 0,2% Natriumthiosulfat (w/v)

Lösung 3: ddH₂O

Lösung 4: 0,1% Silbernitrat (w/v); 0,02% Formaldehyd (v/v)

Lösung 5: 2,5% Natriumcarbonat (w/v); 0,01% Formaldehyd (v/v), pH 11,5

Lösung 6: 0,05 M EDTA-Na₂

Im Anschluß an die Elektrophorese folgte zur Quervernetzung der Proteine eine Inkubation in Lösung 0 für 10 Minuten. Anschließend zur Fixierung eine Inkubation in Lösung 1 für 10 Minuten und eine Inkubation in Lösung 2 für 10 Minuten. Nach fünfmaligem Waschen für 5 Minuten in ddH₂O, wurde das Gel 15 Minuten in Lösung 4 inkubiert und in Lösung 5 entwickelt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Mit Lösung 6 wurde die Entwicklung gestoppt. Bei jedem Wechseln der Lösung wurde die vorherige Lösung vollständig entfernt (Heukeshoven und Dernick, 1986).

2.13.3 Markierung von Cysteinen mit Monobromobimane

Reduktionspuffer: 200 mM Tris pH 8, 1 % SDS, 3 mM EDTA,
3 mM DTT (frisch zugegeben)

Mit dieser Methode wurden die reduzierten Cysteinreste eines Proteins mittels Alkylierung durch den Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane (MBr) der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) markiert (O'Keefe, 1994). Hierzu wurden getrocknete Proteine in 10 µl Reduktionspuffer gelöst und für 20 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Markierung der Cysteinreste durch Zugabe von 6 mM MBr

und Inkubation für 2 Minuten im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Cystein gestoppt. Dem Reaktionsansatz wurde 1/5 Volumen 5 x Probenpuffer (siehe 2.13.1) zugegeben und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde er mit 50 mM (Endkonzentration) DTT pH 7,8 versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine zunächst für 10 Minuten in Lösung 0 (siehe 2.13.2) inkubiert und dann für 1-2 Stunden in 50 %igem Methanol gewaschen und unter UV-Licht analysiert. Markierte Proteine waren als fluoreszierende Banden erkennbar, die durch Fotografieren mit der Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000 (Biorad, München) im UV Licht bei einer Anregung von 254 nm dokumentiert wurden. Anschließend wurde das Gel, wie unter 2.13.2 beschrieben, silbergefärbt.

2.13.4 Western-Blot

Blotting-Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,3
 0,1 % (w/v) SDS
 0,192 M Glycin
 10% Methanol

TBS-Tween-Puffer: TBS inklusive 0,05% Tween 20 (v/v)

Puffer für die alkalische Phosphatase (AP-Puffer):
 100mM Tris-HCl pH 9,5
 100 mM NaCl
 10 mM MgCl₂

Substratlösung für die alkalische Phosphatase (frisch angesetzt):
 33 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (50 mg/ml in DMF)
 66 µl 4-Nitroblautetrazolium (50 mg/ml in DMF)
 in 10 ml AP-Puffer

Im Anschluß an die Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran nach dem "semidry Blotverfahren".

Die PVDF-Membran (porablot von Macherey-Nagel, Düren) wurde zunächst mit Methanol benetzt und anschließend wie auch die Filterpapiere und das PA-Gel in Blotting-Puffer getränkt. Auf die anodische Platte der Blotkammer wurden dann 3 Lagen Filterpapier, die

PVDF-Membran, das PA-Gel und darauf 3 Lagen Filterpapier übereinander gelegt. Mit der kathodischen Platte wurde abgedeckt und der Transfer bei konstanter Stromstärke von 2 mA/cm² für 45 Minuten durchgeführt. Zum Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran wurde sie für 45 Minuten in einer 3%igen BSA-Lösung oder einer 5%igen Magermilchpulver-Lösung in TBS bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Membran wurde mit dem primären Antikörper (verdünnt in TBS-Tween-Puffer) über Nacht bei 4°C oder mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Gewaschen wurde 3 x 5 Minuten mit TBS-Tween-Puffer. Es folgte eine Inkubation mit dem sekundären, alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper (verdünnt in TBS-Tween-Puffer) für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es wurde 3 x 5 Minuten mit TBS-Tween-Puffer gewaschen, die Membran kurz in AP-Puffer äquilibriert und anschließend die frisch hergestellte Substratlösung auf die Membran gegeben. In dieser Lösung wurde die Membran inkubiert, bis Banden zu erkennen waren. Gestoppt wurde die Reaktion durch zweimaliges Spülen mit ddH₂O. Zur Dokumentation wurde die Membran getrocknet und eingescannt.

2.13.5 Absorption von primären Antikörpern mit *E. coli*-Proteinen

Um das Hintergrundsignal von primären Antikörpern, verursacht durch einen Anteil der Immunglobuline, der gegen bakterielle Antigene gerichtet ist, zu unterdrücken, wurden diese vor Einsatz im Western-Blot mit einem entsprechenden *E. coli*-Extrakt inkubiert.

Es wurden 400 ml LB-Medium aus dem entsprechenden *E. coli*-Glycerinstock angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zum Abtöten und Lysieren der Zellen wurden 200 ml dieser Übernachtskultur autoklaviert, während die anderen 200 ml mit 0,5 % Formaldehyd (Endkonzentration) versetzt und weitere 2 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurden. Beide Kulturen wurden dann gemischt, 10 Minuten bei 5 000 x g zentrifugiert und zweimal mit TBS gewaschen. Im letzten Waschschrift wurde die Bakteriensuspension gleichmäßig auf 8 Zentrifugengefäße (Greiner, Mannheim) verteilt und die Sedimente bei -20°C gelagert.

Für die Absorption wurde ein bakterielles Sediment in 10 ml einer Antikörperverdünnung in TBS-Tween und 0,1% BSA suspendiert und unter Bewegung für 1-2 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 3550 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand auf ein neues Sediment gegeben. Diese Schritte wurden drei- bis viermal wiederholt. Abschließend wurde der Überstand als primäre Antikörperlösung für den Western-Blot eingesetzt.

2.13.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand des spezifischen Extinktionskoeffizienten durch Messung der Absorption einer Proteinlösung bei 214 nm in dem Ultrospec 3100 pro Spektrophotometer der Firma Amersham Biosciences (Freiburg).

Nach dem Gesetz von Lambert-Beer gilt:

$$A = \varepsilon_{214} \times c \times d$$

mit: ε = molarer Extinktionskoeffizient der Probe [$M^{-1}cm^{-1}$]

c = Konzentration der Probe [mol/l] d = Schichtdicke der Küvette [1 cm]

Der spezifische Extinktionskoeffizient wurde für jedes Protein nach folgendem Zusammenhang bestimmt (Buck *et al.*, 1989):

$$\varepsilon_{214} = (n - 1 + n_{Asn} + n_{Gln}) \times \varepsilon_{Pep} + n_{Trp} \times \varepsilon_{Trp} + n_{Phe} \times \varepsilon_{Phe} + n_{His} \times \varepsilon_{His} + n_{Tyr} \times \varepsilon_{Tyr}$$

mit: n = Anzahl aller Aminosäuren

n_x = Anzahl der Aminosäure X in der Proteinsequenz

$$\varepsilon_{Pep} = 2846 [M^{-1}cm^{-1}]$$

$$\varepsilon_{Trp} = 22735 [M^{-1}cm^{-1}]$$

$$\varepsilon_{Phe} = 7209 [M^{-1}cm^{-1}]$$

$$\varepsilon_{His} = 6309 [M^{-1}cm^{-1}]$$

$$\varepsilon_{Tyr} = 5755 [M^{-1}cm^{-1}]$$

Das Molekulargewicht wurde anhand der Aminosäuresequenz mittels des folgenden Servers <http://expasy.ch/tools/protparam.html> bestimmt.

Durch entsprechende Umformung der Gleichung konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.13.7 Gefriertrocknung

Vor der Gefriertrocknung wurden die Proben bei $-80^{\circ}C$ eingefroren und dann mit der Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2-E (Steris, Mentor, USA) bei einem Vakuum von 1×10^{-2} mbar bis zur Trockenheit lyophilisiert.

2.13.8 Zirkulardichroismus Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde freundlicherweise von Frau T. Gronauer (Institut für organische Chemie, Universität Würzburg) durchgeführt. Das Spektrum wurde in einer Quarzküvette mit 0,01 cm Breite bei Raumtemperatur mit einem Jasco Modell J-715 Spektropolarimeter erstellt. Die Proteinkonzentration betrug 110 μM in 0,01 % TFA. Es wurde ein Spektrum zwischen 190 und 250 nm mit 20 nm/min und einer "Response"-Zeit von 8 Sekunden aufgenommen.

2.13.9 Massenspektrometrie

Die FT-ICR-Massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. W. Schmitz (Physiologische Chemie II, Universität Würzburg) durchgeführt. Es wurde eine 5 μM Proteinlösung in Methanol/Wasser/Essigsäure 49:49:1 (v/v/v) eingesetzt.

2.14 Expression der SAPLIP/GFP-Fusionsproteine

2.14.1 Synthese der rekombinanten SAPLIP/GFP-Fusionsproteine für die Expressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot

5 ml LB-Ampicillin-Kanamycin-Medium wurden mit einer frisch transformierten *E. coli* BL21(DE3)[pAPlacI^Q]-Bakterienkolonie (siehe 2.11.15) von einer LB-Ampicillin-Kanamycin-Kulturplatte beimpft und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden je 20 ml LB-Ampicillin-Kanamycin-Medium mit 1 ml dieser Kulturen versetzt und 3 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die OD₆₀₀ wurde von jeder Kultur ermittelt und mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Jede Kultur wurde weitere 2 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut die OD₆₀₀ für jede Kultur bestimmt, um für das Gel und den Western-Blot gleiche Zellzahlen bestimmen und aufragen zu können. Je 1 ml von der Bakteriensuspension wurde abgenommen und 1 Minute bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert. Die restlichen Kulturen wurden 10 Minuten bei 3550 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände verworfen und die Sedimente bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.14.2 Überprüfung der Löslichkeit der rekombinanten SAPLIP/GFP-Fusionsproteine im Zellextrakt

Um festzustellen, ob die Fusionsproteine in löslicher Form oder unlöslich, in Form von "Inclusionbodies", synthetisiert werden, wurden die Sedimente in 0,5 ml kaltem 10 mM Tris-Puffer pH 7,4, der mit 1/25 Volumen einer 25x Stocklösung von Protease Inhibitor cocktail tablets complete™ EDTA-free von Roche (Mannheim) und 2,7 U Benzonase (25 U/μl von Merck, Darmstadt) versetzt worden war, aufgenommen. Diese wurde mit dem gleichen Volumen Glasperlen (0,25-0,50 mm von Roth, Karlsruhe) versetzt und die Zellen 10 Minuten bei 4°C durch starkes Schütteln auf dem Vortex-Mixer Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA) mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurde die Suspension inklusive der Glasperlen 5 Minuten bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand ohne Glasperlen abgenommen und das Sediment mit dem gleichen Volumen Puffer gewaschen (5 Minuten, 10 000 x g, 4°C). Die Sedimente wurden in 0,5 ml 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für jedes Fusionsprotein die gleiche Menge von Überstand und Sediment für den Vergleich des Verhältnisses von unlöslich zu löslich synthetisiertem Fusionsprotein, sowie die gleiche Zellzahl entsprechend der Bestimmung der optischen Dichte für den Vergleich der Expressionseffizienz der einzelnen Fusionsproteine auf einem SDS-PA-Gel und im Western-Blot analysiert.

2.14.3 Synthese der GFP-Fusionsproteine von SAPLIP 3, SAPLIP 6 und der SAPLIP-Domäne von SAPLIP 12

100 ml LB-Ampicillin-Kanamycin-Medium wurden mit einer frisch transformierten Bakterienkolonie (siehe 2.11.15) angeimpft und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 4-5 Liter LB-Ampicillin-Kanamycin-Medium mit dieser Übernachtskultur und 2 Tropfen Antifoam O-30 (Sigma, Taufkirchen) versetzt und bei 20°C inkubiert. Um die Sauerstoffversorgung der Kultur zu gewährleisten, wurde ein Schlauch mit kleinen Perforationen auf dem Boden des Inkubationsgefäß fixiert und ein stetiger Luftstrom durch Druckluftzufuhr eingestellt. Der pH-Wert wurde auf pH 7 eingestellt und gegebenenfalls durch Zugabe von einer 10 %igen Ammoniaklösung reguliert. Um eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen, wurden 10g/l Glukose, 2 mM MgSO₄, 0,2 mM CaCl₂, 40 mM K₂HPO₄ und 15 mM KH₂PO₄ gelöst in ddH₂O und sterilfiltriert 1-2 x während der Kultivierung zugegeben

Die Bakterienkultur mit dem SAPLIP3/pTAEx-Konstrukt konnte auf diese Weise innerhalb von 54 Stunden auf eine OD_{600} : 12 gebracht werden, die Bakterienkultur mit dem SAPLIP6/pTAEx-Konstrukt und dem SAPLIP-Domäne 12/pTAEx-Konstrukt jeweils auf eine OD_{600} : 6. Dann wurde mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und zusätzlich 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zugegeben.

Es wurde 2-3 weitere Stunden bei 20°C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 8670 x g und 4°C zentrifugiert. Die Sedimente wurden mit TBS gewaschen und anschließend bis zum Aufschluss bei -20°C gelagert.

2.15 Reinigung der GFP-Fusionsproteine mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

2.15.1 Zellaufschluß

Um proteolytische Spaltungen zu verhindern, wurden die Sedimente in kaltem Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl), der mit "Protease Inhibitor cocktail tablets complete™ EDTA-free" von Boehringer (Mannheim) nach Herstellerangaben (1 Tablette auf 50 ml Zellextrakt) versetzt worden war, aufgenommen, so dass eine 30-50%ige Zellsuspension entstand. Es wurde während der ganzen Reinigung möglichst kalt gearbeitet. Für die GFP-Fusionsproteine von SAPLIP 6 und der SAPLIP-Domäne 12 erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von 1/3 Volumen Glasperlen (0,25-0,50 mm von Roth, Karlsruhe) und starkes Schütteln auf einem Mixer Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA) für 15 Minuten bei 4°C. Die Zellsuspension vom SAPLIP 3/GFP-Fusionsprotein wurde dagegen zunächst durch dreimalige Passage der SLM Aminco French Presse (SLM Aminco, Urbana, USA) unter einem Druck von 1200 psi aufgeschlossen. Zusätzlich wurde die mechanische Lyse durch Glasperlen, wie für die anderen GFP-Fusionsproteine geschildert, angeschlossen. Die Suspension wurde inklusive der Glasperlen 10 Minuten bei 4200 x g und 4°C zentrifugiert und die Sedimente inklusive der Glasperlen erneut mit Puffer gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und mit Benzonase (0,3 U/ml Endkonzentration) versetzt. Anschließend wurde 10-20 Minuten bei 20 000 x g und 4°C, der resultierende Überstand bei sichtbarer Trübung 20 Minuten bei 47 000 x g und 4°C zentrifugiert. Dieser Überstand diente als Auftrag für die Nickelionen-Affinitätschromatographie.

2.15.2 Reinigung mittels Nickelionen-Affinitätschromatographie

Matrix: NTA-Agarose (Novagen, Madison, USA)

Nickel-Beladungspuffer: 50 mM NiSO₄ in ddH₂O

Laufpuffer A: 5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9

Laufpuffer B: 1 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9

Für die Nickelionen-Affinitätschromatographie wurde die Gradi Frac Chromatographie-Anlage der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bei 10 °C verwendet.

Der Ansatz wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Pericor, Hereaus Instruments, Langenselbold) auf Säulen mit NTA-Agarose (Säulenvolumen von 1 ml (SAPLIP6 und SAPLIP-Domäne 12) bzw. Säulenvolumen von 6 ml (SAPLIP 3)) mit einer Flussrate von 1 ml/min gebracht, nachdem die Säulen zuvor mit 5 Säulenvolumen Nickel-Beladungspuffer und 3 Säulenvolumen Laufpuffer A beschickt worden waren. Das Eluat während der Probenaufgabe wurde gesammelt und auf eine weitere Säule gebracht. Auch hierbei wurde das Eluat während der Probenaufgabe gesammelt und anschließend unter UV-Licht (366 nm) auf Fluoreszenz geprüft. Als keine Fluoreszenz mehr erkennbar war, wurden die Säulen 2x mit 5 Säulenvolumen Laufpuffer A gespült.

Anschließend wurden die Säulen in der Gradi Frac Chromatographie-Anlage der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) angeschlossen und mit 2% Laufpuffer B (50 ml) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Imidazol-Gradienten (200 ml) von 20-750 mM in Laufpuffer. Es wurden 0,5 - 4 ml Fraktionen gesammelt und die Flussrate betrug 0,5 ml/min.

Die Analyse erfolgte anhand der Fluoreszenz durch Anregung der Fraktionen mit UV-Licht und anschließende SDS-PAGE und Western Blot mit Anti-His- oder Anti-GFP-Antikörpern.

2.15.3 Inkubation mit oxidiertem und reduziertem Glutathion für die Ausbildung von Disulphidbrücken und Einengen der Probe mittels PEG 35000

Die ausgewählten Fraktionen wurden vereinigt, mit 1 mM oxidiertem Glutathion sowie 10 mM reduziertem Glutathion (Stocklösungen in Laufpuffer B) versetzt und für 3,5 Stunden bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 20 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Fall des SAPLIP 3/GFP-Fusionsproteins gegen das 125-fache Volumen 10 mM Tris-HCl 7,7 bei 4°C über Nacht dialysiert. Das Ausschlussmolekulargewicht betrug 12-14 kDa (Spectra/Por, Spectrum Medical Industries Inc., Houston, USA). Der Dialyseschlauch mit dem Dialysat wurde auf eine Schicht aus dem Feststoff Polyethylenglykol (PEG) 35000 (Fluka, Seelze) gelegt und in einer Schale auf Eis für 4 Stunden mit dreimaligem Wechsel der PEG-Schicht inkubiert. Reste von PEG wurden vom Dialyseschlauch entfernt und erneut 2,5 Stunden in dem selben Puffer und unter den gleichen Bedingungen dialysiert.

Für alle Fusionsproteine wurde gegen das 400-fache Volumen 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA bei 4°C über Nacht dialysiert.

2.15.4 Trennung des SAPLIPs oder der SAPLIP-Domäne von dem GFP mittels der Endoproteinase Pro-Pro-Y-Pro (Igase)

Das Dialysat aus (2.15.3) wurde für das SAPLIP 3/GFP-Fusionsproteine in Glasgefäße überführt und mit 87%igem Glycerin versetzt, so dass eine Endkonzentration an Glycerin von 20 % vorlag. Für alle SAPLIP/GFP-Fusionsproteine wurden insgesamt über viele Tage hinweg sukzessive insgesamt 10 - 40 µg von der Igase zu dem Ansatz gegeben und unter ständiger Bewegung zunächst bei 25°C und später bei 37°C inkubiert. Zwischendurch wurde mehrmals bei 20 000 x g zentrifugiert und die Überstände anschließend weiter inkubiert. Der Fortschritt der Abtrennung wurde durch Analyse von Aliquots mittels Bimane-Markierung und SDS-Gelelektrophorese kontrolliert.

2.16 Reinigung des rekombinanten SAPLIP 3, SAPLIP 6 und der rekombinanten SAPLIP-Domäne 12 mittels hydrophober Interaktionschromatographie

2.16.1 Konzentrierung und Reinigung des SAPLIPs oder der SAPLIP-Domäne an einer hydrophoben Matrix

Hydrophobe Matrix: Sep Pak Cartridge tC18, 100 mg (Waters, Milford, USA)

Der Ansatz aus 2.15.3 wurde erneut mit 1 mM oxidiertem und 10 mM reduziertem Glutathion versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die entsprechenden Mengen an konzentrierten Säuren zu dem Ansatz gegeben, so dass die finalen Konzentrationen 1 N Salzsäure, 1 % Trifluoressigsäure (TFA) und 5 % Ameisensäure betragen. Anschließend wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert und 10 Minuten bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die hydrophobe Matrix gegeben, die zuvor mit 100 % Acetonitril angefeuchtet und mit 0,1 % TFA äquilibriert worden war. Es wurde mit 20 % Acetonitril, 0,1% TFA (1 ml) gewaschen und schließlich für SAPLIP 3 und SAPLIP-Domäne 12 mit 40 % Acetonitril, 0,1 % TFA (1 ml) bzw. für SAPLIP 6 mit 50 % Acetonitril, 0,1 % TFA eluiert.

2.16.2 Reinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie an Umkehrphasen

Säule: PRP-3 Säule (150 x 2,1 mm) der Firma Hamilton Deutschland GmbH, Martinsried

Laufpuffer A: 0,1 % TFA

Laufpuffer B: 84 % Acetonitril, 0,1 % TFA

Die hydrophobe Interaktionschromatographie wurde an der HPLC-Anlage von Waters (Milford, USA), Modell 625 LC mit der PRP-3 Säule durchgeführt. Die Säule wurde in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert. Die Beladung der Säule mit der Proteinlösung fand bei einer Flussrate von 250 µl/min und über eine 500µl-Probenschleife statt. Es wurde mit 750 µl 0,1 % TFA und anschließend mit 1250 µl 25 % Acetonitril, 0,1% TFA gewaschen. Die Proteine wurden mittels eines linearen Gradienten von 25 – 38 % Acetonitril bei einer Flussrate von 250 µl/min in 30 Minuten von der Säule eluiert.

2.17 Test auf Assoziation mit Liposomen

2.17.1 Herstellung multilamellarer Liposomen

Küvettenpuffer: 50 mM Tris-Maleat
 50 mM Na₂SO₄
 0,5 mM EDTA-Na₂
 pH 4,45
 mit NaOH auf pH 5,2 bzw. 7,0 eingestellt

2,5 mg Phospho- oder Glykolipide (in Methanol oder Methanol/Chloroform zu 5-10 mg/ml gelöst) wurden ad 180 µl mit Chloroform in je einem Glasfläschchen aufgefüllt. Die Zusammensetzung betrug stets 3 Teile Phosphatidylcholin (1,875 mg) und 1 Teil des gewünschten Lipids (0,625 mg), mit Ausnahme reiner Phosphatidylcholin- und PCIIS Liposomen. Das Lösungsmittel wurde anschließend mit einem konstanten Stickstoff-Strom unter Drehbewegung wieder entfernt und der gebildete Lipidfilm über Nacht im Vakuum getrocknet. Nach der Zugabe von Glasperlen (2,85-3,3 mm von Roth, Karlsruhe) und 250 µl Küvettenpuffer, pH 5,2 wurde kräftig geschüttelt und für mindestens 2 Stunden rotierend bei Raumtemperatur inkubiert, um die Lipide zu resuspendieren. Für Lipide mit einer hohen Übergangstemperatur wurde dieser Schritt bei 55°C durchgeführt. Anschließend wurde die Liposomensuspension bis zum Einsatz bei 4°C gelagert.

2.17.2 Inkubation der Liposomen mit Protein

SAPLIP 3 und die SAPLIP-Domäne 12 sowie Amoebapore A (je 200 ng) wurden mit 5 µl multilamellaren PCIIS Liposomen (10 mg/ml) ad 100 µl Gesamtvolumen mit Küvettenpuffer pH 5,2 versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur in Glasfläschchen unter Bewegung inkubiert. Außerdem wurde je ein Ansatz ohne Liposomensuspension hergestellt.

In weiteren Ansätzen wurden die PCIIS Liposomen durch ein Gemisch aus gleichen Anteilen von Liposomen verschiedenster Zusammensetzungen (stets 10 mg/ml) ersetzt und die Inkubationen wie oben aber in Küvettenpuffer bei pH 4,5, pH 5,2 und pH 7,0 durchgeführt. Diese Liposomen bestanden bis auf reine PCIIS und reine PC Liposomen stets aus PC:X im Verhältnis 3:1, wobei X = Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Sphingomyelin, Cardiolipin und Galaktosylceramid war. SAPLIP 3 in

einer Konzentration von 1 μM wurde außerdem mit GC/PC und PS/PC Liposomen in Küvettenpuffer pH 4,5, pH 5,2 und pH 7,0 wie oben beschrieben inkubiert.

Nach der Inkubation wurden alle Ansätze in der Optima™ TLX Ultrazentrifuge (Beckmann, Unterschleissheim-Lohhof) für 30 Minuten bei 100 000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac SC110, Savant Instruments Inc., Holbrook, USA) konzentriert und mit Probenpuffer versetzt. Die Sedimente wurden ebenfalls in Probenpuffer aufgenommen und beides mittels SDS-PAGE analysiert.

2.18 Test auf porenbildende Aktivität

2.18.1 Herstellung kleiner, unilamellarer Calcein-Liposomen

Es wurde ein Lipidfilm wie unter 2.17.1 beschrieben hergestellt, getrocknet und resuspendiert. Auch hierbei wurden für Lipide mit einer hohen Übergangstemperatur diese Schritte bei 55°C durchgeführt. Die Resuspension erfolgte allerdings in Anwesenheit von 50 mM Calcein in Küvettenpuffer, um diesen Fluoreszenzfarbstoff in die Liposomen einzuschließen. Diese wurden 15 Minuten in einem Ultraschallbad sonifiziert (gegebenenfalls mit angewärmten Wasser), dreimal auf mit Methanol versetztem Trockeneis eingefroren und bei 37°C aufgetaut und erneut für 20 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert. Die Liposomensuspension wurde bis zum Einsatz bei 4°C gelagert.

2.18.2 Aktivitätsmessung

Um vor dem Test freies Calcein aus der Suspension zu entfernen, wurden 50 μl auf eine zuvor mit Küvettenpuffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule (NAP-5, Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben und mit (gegebenenfalls 55°C warmen) 450 μl Küvettenpuffer auf die Säule gespült. Bei der Zugabe von weiteren 500 μl (gegebenenfalls 55°C warmen) Küvettenpuffer wurde der Durchlauf in einem Volumen von je 2-3 Tropfen gesammelt. Die Eluate, bei denen eine leichte bis mittelstarke Gelb-Orangefärbung zu erkennen war, wurden in einem Vorversuch getestet und diejenigen ausgewählt, bei denen sich die Fluoreszenzdifferenz ohne (0% Lyse) und mit Triton-X 100 (100% Lyse) bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von 485 nm bzw. 538 nm um ca. Faktor 2 unterscheidet.

Die Liposomensuspension wurde 1:1000 mit Küvettenpuffer des gewünschten pH Wertes verdünnt. In die Vertiefungen einer Polystyrene-96-Loch-Platte mit Flachboden (Greiner, Mannheim) wurden 10 µl Puffer (0% Lyse, Negativkontrolle), 10 µl Probe (Verdünnung des Testproteins in Küvettenpuffer mit gewünschtem pH-Wert) oder 8 µl Puffer und 2 µl einer 1 %igen Triton-X 100 Lösung (100 % Lyse, Positivkontrolle) vorgelegt und mit 100 µl der Liposomensuspension versetzt. Alle Kontrollen und Proben wurden als Dreifachbestimmungen vermessen. Die Messung erfolgte mit dem Fluoroskan II (Labsystems, Frankfurt) bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von 485 nm bzw. 538 nm sofort nach Zugabe der Liposomen alle 2 Sekunden über 2 oder 4 Minuten.

Berechnung der lysierten Liposomen:

$$\% \text{ Lyse} = 100 \times (F_{\text{Probe}} - F_{\text{negativ}}) / (F_{\text{positiv}} - F_{\text{negativ}})$$

mit: F_{Probe} : Fluoreszenz von 10µl Probe und 100µl Liposomensuspension

F_{negativ} : 0 % Lyse, Fluoreszenz von 10µl Puffer und 100µl Bakteriensuspension

F_{positiv} : 100% Lyse, Fluoreszenz von 10µl Puffer, 2 µl 1%ige Triton-X 100 Lösung und 100 µl Liposomensuspension

2.19 Test auf antibakterielle Aktivität

2.19.1 Mikrosuszeptibilitätstest

10 ml LB-Medium wurden aus einem Glycerinstock mit *Bacillus subtilis* oder *Escherichia coli* K12 angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 100 µl dieser Übernachtskultur wurden in 30 ml LB-Medium suspendiert und weiter bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis die Absorption bei 600 nm einen Wert von OD_{600} : 0,1 - 0,2 hatte.

Die Bakterienzahl wurde nach folgendem Zusammenhang bestimmt:

eine OD_{600} von 0,1 entspricht $2,5 \times 10^7$ CFU/ml (*E. coli*) bzw. $2,2 \times 10^6$ CFU/ml (*B. subtilis*).

Alle Lösungen wurden vor dem Einsatz unter der Sterilbank sterilfiltriert und der Test ebenfalls unter der Sterilbank angesetzt. Zum Blockieren von Proteinbindungsstellen wurde eine Polystyrene-96-Loch-Platte mit Rundboden (Greiner, Mannheim) mit 100 µl einer 0,1% BSA-Lösung für 10 Minuten inkubiert und die Flüssigkeit anschließend abgesogen.

Als Proben wurden je 11 µM Stocklösungen in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,2 von SAPLIP 3 und Melittin verwendet und seriell 1:2 mit Puffer verdünnt. Für den Test wurden zu 90 µl Probe 10 µl Bakteriensuspension (1×10^2 CFU) in LB-Medium gegeben und bei 37°C

in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit 90 μl Natriumphosphatpuffer pH 5,2 und 10 μl Bakteriensuspension (1×10^2 CFU) in LB-Medium und als Sterilkontrolle Ansätze nur mit Puffer ohne Bakterien.

Der Trübungsgrad der Vertiefung diente als Maß für das Wachstum der Bakterien und wurde nach 20 und 40 Stunden kontrolliert. Keine Trübung bedeutet, dass keine Bakterien gewachsen sind. Die Probenkonzentration, bei der gerade keine Bakterien mehr wachsen, wird als minimale, inhibitorische Konzentration (MIC, "minimal inhibitory concentration") bezeichnet.

Anschließend wurden je 20 μl einer 1:100 und einer 1:1000 Verdünnung auf LB-Platten ausplattiert und die Koloniezahl verglichen. Die Probenkonzentration, bei der gerade keine Koloniebildung mehr festgestellt wird, wird als minimale, bakterizide Konzentration (MBC, "minimal bactericidal concentration") bezeichnet.

2.19.2 Fluoreszenzgestützter Membranpermeabilisierungstest

Je 100 ml LB-Medium wurden aus Glycerinstocks mit *E. coli* K-12, *E. coli* K-12 D31, *B. subtilis*, *Bacillus megaterium* und *Serratia plymuthica* angeimpft und über Nacht bei 30°C oder Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde direkt für den Test eingesetzt, wenn die Extinktion bei 600 nm zwischen 0,1-0,4 lag oder verdünnt und bis zu der gewünschten Dichte von 0,1-0,4 bei 37°C weiterkultiviert. Die Kulturen wurden 10 Minuten bei 1500-2500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 20 mM Mes-Puffer pH 5,5, 25 mM NaCl oder 20 mM Hepes-Puffer pH 7,4, 25 mM NaCl resuspendiert. Die Extinktion bei 600 nm gegen Puffer wurde gemessen.

Die Bakterienzahl wurde nach folgendem Zusammenhang bestimmt:

eine OD_{600} von 0,1 entspricht $2,5 \times 10^7$ CFU/ml (*E.coli*) bzw. $2,2 \times 10^6$ CFU/ml (*B.subtilis*) bzw. $3,3 \times 10^6$ CFU/ml (*B.megaterium*) bzw. $2,5 \times 10^7$ CFU/ml (*S. plymuthica*)

Die *E. coli*-Sedimente wurden zu einer Dichte von 4×10^7 CFU/ml, das *B. subtilis*-Sediment zu einer Dichte von 4×10^6 CFU/ml, das *B. megaterium*-Sediment zu einer Dichte von 6×10^6 CFU/ml und das *S. plymuthica*-Sediment zu einer Dichte von $2,4 \times 10^7$ CFU/ml mit dem gewünschten Puffer verdünnt. Für die Tot-Kontrolle wurden zunächst eine 1:4 Verdünnung mit Ethanol absolut hergestellt, 10 min inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Zellzahl mit Puffer verdünnt. Das Blockieren von Proteinbindungsstellen wurde wie unter 2.19.1 beschrieben durchgeführt.

Als Proben wurden je eine 8 μM Stocklösung des SAPLIP 3, Melittin und Cecropin B bzw. eine 2 μM Stocklösung der SAPLIP Domäne 12 in dem entsprechenden Puffer verwendet.

Die Sytox[®] Green Nucleic Acid Stain-Stocklösung (5 mM) wurde mit dem entsprechenden Puffer auf eine 2 µM Lösung verdünnt.

Für den Test wurden 25µl Probe mit 25µl Bakteriensuspension versetzt und je 50µl 2 µM "Sytox[®] Green Nucleic Acid Stain"-Lösung (Molecular Probes, Eugene, USA) hinzugegeben und die Fluoreszenz mit dem Fluoroskan II (Labsystems, Frankfurt) bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von 485 nm bzw. 538 nm zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C oder Raumtemperatur.

Berechnung der lysierten Bakterien: $\%Lyse = 100 \times (F_{Probe} - F_{lebend}) / (F_{tot} - F_{lebend})$

mit: F_{Probe} : Fluoreszenz von 25µl Probe und 25µl Bakteriensuspension

F_{lebend} : Fluoreszenz von 25µl Puffer und 25µl Bakteriensuspension

F_{tot} : 100% Lyse, Fluoreszenz von 25µl Puffer und 25 µl durch Ethanol getöter Bakteriensuspension

Um zu testen, ob SAPLIP 3 synergistisch auf die antibakterielle Aktivität von Amöbapore A gegen *E.coli* K12-Zellen wirkt, wurden die Proteine zusammen in einer maximalen finalen Konzentration von je 1 µM bei pH 5,5 und pH 7,4 seriell verdünnt und wie oben beschrieben mit den *E.coli* K12-Zellen inkubiert. Parallel wurden die beiden Proteine alleine eingesetzt.

2.20 Test auf hämolytische Aktivität

100 µl einer 50%igen Schaferythrozytenlösung (Virion-Serion, Würzburg) wurden mit 1,4 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung gewaschen und 3 Minuten bei 340 x g sedimentiert. Anschließend wurde so mit der 0,9%igen NaCl-Lösung verdünnt, dass eine 2%ige Erythrozyten-Lösung entstand.

In die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte mit Rundboden wurden 25 µl einer Proteinverdünnung in 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl oder 20 mM MES pH 5,5, 150 mM NaCl gegeben und mit 25 µl der Erythrozytensuspension versetzt. Als hämolytisch aktiv wurden diejenigen Ansätze bezeichnet, die eine Klärung der Flüssigkeit in der Vertiefung der Mikrotiterplatte zeigten.

2.21 Liposomeninteraktionen von SAPLIP 3

2.21.1 Darstellung mittels Gelfiltration

Es wurde ein Lipidfilm wie unter 2.17.1 beschrieben hergestellt, getrocknet und in 50 mM Calcein, 50 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, 2 mM Tes, 2 mM L-Histidin, 1 mM EDTA, pH 7,4 resuspendiert (finale Lipidkonzentration: 10 mg/ml). Es wurden 10 Zyklen Einfrieren und Auftauen durchgeführt und abschließend 3-5 Minuten mittels eines Vortex Mixer gemischt. Die Zusammensetzung bestand aus 65% Phosphatidylcholin, 10% Phosphatidylserin und 25% Cholesterol. Die Vesikel wurden bei 100 000 x g für 30 min zentrifugiert und mit 50 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, 2 mM Tes, 2 mM L-Histidin, 1 mM EDTA, pH 7,4 gewaschen.

SAPLIP 3 (15 µg) und Calcein-haltige Liposomen (18,6 µg) wurden in 10 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4,5 bei 37°C für 2 h inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein gleichbehandelter Ansatz ohne Protein. Das Gemisch wurde auf eine Sepharose CL-4B Säule (1 x 23 cm, Amersham Biosciences, Freiburg) geladen und mit dem gleichen Puffer bei Raumtemperatur und einer Flussrate von 0,3 ml/min eluiert. Hierfür wurde die Gradi Frac Chromatographie-Anlage der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet. Der Trennbereich der Säule beträgt $6 \times 10^4 - 2 \times 10^7$ Da. Fraktionen von 0,4 ml wurden gesammelt und $\frac{1}{4}$ des Volumens mittels SDS-PAGE analysiert und bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von 485 nm bzw. 538 nm auf Fluoreszenz untersucht. Die Reihenfolge der Applikation von Probe und Kontrolle auf die Säule nach der Inkubation wurde gewechselt, ohne dass dieses einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

2.21.2 Darstellung mittels konfokaler Lasermikroskopie

Multilamellare Vesikel wurden wie unter 2.21.1 beschrieben hergestellt, allerdings erfolgte die Resuspension ohne Calcein. Die multilamellaren Vesikel (2,475 µg) aus 55% PC, 20% PS und 25% Cholesterol wurden mit SAPLIP 3 (2 µg) in 10 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4,5 in der Anwesenheit von 2,5 mM Calcein bei 37°C unter leichter Bewegung für 2 h inkubiert. Um die Fluoreszenz des nicht eingeschlossenen Calceins auszulöschen ("quenchen") wurde anschließend Co (II) Nitrat hinzugegeben (finale Konzentration 100 mM). Als Kontrolle wurde nur Puffer mit den Liposomen inkubiert. Die Suspensionen wurden mit 87 % Glycerin versetzt (finale Konzentration: 30 %) und mittels konfokaler Fluoreszenz-Lasermikroskopie bei einer Anregung von 488 nm betrachtet. Fluoreszierende Vesikel von drei Experimenten wurden in jeweils 16 Ausschnitten gezählt

und dargestellt als die durchschnittliche Anzahl pro Ausschnitt, um das Verhältnis zwischen den Ansätzen mit SAPLIP 3 und den Kontrollansätzen zu vergleichen.

2.21.3 Membranfusionstest

Multilamellare Vesikel entweder aus 55% Phosphatidylcholin, 20% Phosphatidylserin und 25% Cholesterol oder aus 75% Phosphatidylcholin und 25% Cholesterol wurden wie unter 2.21.1 beschrieben hergestellt. Die Markierung mit Octadecyl Rhodamin B (R18) von Fluka (Seelze) erfolgte durch Einspritzen einer 8 mM Lösung von R18 in Ethanol in eine Liposomensuspension (0,15625 mg/ml) unter kräftiger Bewegung (finale Konzentration an R18: 80 μ M), gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Dabei betrug die finale Konzentration an Ethanol maximal 1 %. Nicht eingebautes R18 wurde durch Gelfiltration mittels eines NAP-5 Säulchens (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Nicht markierte Liposomen wurden auf die gleiche Weise parallel (Ethanolzugabe ohne R18) behandelt. R18 zeigt eine Eigenauslöschung ("self-quenching") der Fluoreszenz, wenn es in der eingesetzten Konzentration in Liposomen eingebaut ist. Fusion von markierten und unmarkierten Liposomen verursacht eine Verteilung des R18, deren Ergebnis ein Fluoreszenzanstieg ist (Hoekstra *et al.*, 1984). Der Anstieg der Fluoreszenz aufgrund der Fusion von Liposomen bei Zugabe von Protein (100 oder 500 nM SAPLIP 3) zu einer 1:100 Verdünnung von markierten und unmarkierten Liposomen in 10 mM Natriumacetat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4,5 wurde bei einer Exzitations- und Emissionswellenlänge von jeweils 544 nm und 590 nm über mehrere Minuten verfolgt. Als Negativkontrolle wurde spontane Fusion nur in Puffer ohne Protein stets parallel gemessen. Als eine Kontrolle für Liposomenfusion wurde die PS-haltigen Liposomen zuerst mit 5 mM CaCl₂ versetzt und nach 1-2 min wurde 15 mM EDTA hinzugegeben. Für die Messung der Abhängigkeit vom pH Wert und der Aktivitäten der SAPLIP-Domäne 12 (500 nM) wurde eine 1:200 Verdünnung der Liposomen eingesetzt und der Puffer wurde auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

2.22 Rekonstitutionsexperiment mit Prosaposin-defizienten Fibroblasten

Humane Prosaposin (PSAP)-defiziente Hautfibroblasten wurden in DMEM unter Zusatz von 10% fötalem Rinderserum und 50 µg/ml Gentamycin kultiviert. Für das Rekonstitutionsexperiment wurden die Zellen in 24 Loch-Platten (Falcon/Beckton-Dickinson, Heidelberg) bis zu einem konfluenten Monolayer pro Vertiefung kultiviert. Dann wurden die Zellen mit DMEM mit 0,1 % fötalem Rinderserum gewaschen und SAPLIP 3 (10 µg/ml) in dem gleichen Medium hinzugefügt. Parallel wurden PSAP-defiziente Zellen ohne Zugabe von SAPLIP 3 kultiviert. Nach 6 und 30 Stunden wurden jeweils 2 Vertiefungen von den PSAP-defizienten Zellen mit und ohne SAPLIP 3 mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden geerntet und durch Zentrifugation bei 380 x g für 10 Minuten sedimentiert. Zur Resuspension wurden 60 µl H₂O hinzugefügt. Die Extraktion der Lipide erfolgte in Glasfläschchen durch die Zugabe von 200 µl Chloroform und 100 µl Methanol und einer Inkubation bei 37 °C für 30 – 60 Minuten unter Bewegung. Nach dem Zentrifugieren bei 1000 x g und 10 Minuten wurden die Gemische durch Gefriertrocknung eingedampft und anschließend 25 µl Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) hinzugegeben. Für die Dünnschichtchromatographie wurden vorbeschichtete Plastikplatten (Polygram sil G) der Firma Macherey und Nagel (Düren) eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese Platten einmal in Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5 (v/v/v) entwickelt und anschließend bei 100°C für 10 Minuten aktiviert. Die Proben wurden unter einem konstanten Stickstoffstrom punktförmig auf die Platten getropft und diese in Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5 (v/v/v) entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die Platten mit 0,1 % 5-Hydroxy-1-Tetralon in 80 % H₂SO₄ (Watanabe und Mizuta, 1995) besprüht und anschließend bei 100° C für 10 Minuten erhitzt. Die fluoreszierenden Signale der Glykosphingolipide wurden bei einer Exzitationswellenlänge von 532 nm und einem Emissionsfilter von 555 nm durch Scannen mit dem Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht.

Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen der SAPLIP-Domänen (siehe Abb. 1) wurde eine Ähnlichkeitshierarchie zu Amoebapore A aufgestellt, die die Grundlage für die Nummerierung der neuen SAPLIPs 1-16 bildet.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Datenbankanalyse zusammengefasst.

Ehemaliger Name (Accession-Nr.)	Name	Genort innerhalb eines Scaffold			Größe, Nt M - * ²	Proteingröße, AS			SAPLIP-Domäne Position (AS-Reste)
		Scaffold ¹	Gen von M - * ² (Nt)/ Leseraster	SAPLIP-Domäne (Nt)		Gesamtprotein	(vorhergesagtes) ³ Signalpeptid	Proform / mature Form ⁵	
Amoebapore A (AAA29111)	Amoebapore A	scaff_11098_1 (1)	24107 - 24400 / +2	24173 - 24400	294	98	21 ⁴	77	22 - 98
ENTBD24TF (AZ529784)	SAPLIP 1	scaff_10355_1 (2)	1284 - 1559 / +3	1332 - 1559	276	92	15	77	16 - 92
Amoebapore B (CAA54226)	Amoebapore B	scaff_11218_1 (1)	61508 - 61795 / +2	61568 - 61795	288	96	19 ⁴	77	20 - 96
Amoebapore C (CAA54225)	Amoebapore C	scaff_11166_1 (1)	88869 - 89171 / +3	88944 - 89171	303	101	24 ⁴	77	25 - 101
Ent465e12.plc (keine NCBI Acc. Nr.)	SAPLIP 2	scaff_11166_1 (1)	73569 - 74027 / +3	73782 - 74027	459	153	15	138	71 - 153
ENTGG73TR (AZ544462)	SAPLIP 3	scaff_10605_1 (1)	27581 - 27862 / +2	27635 - 27862	282	94	16	78	18 - 94
ENTPL91TR (BH146568)	SAPLIP 4	scaff_13629_1 (2)	81990 - 82277 / +3	82044 - 82277	288	96	17	79	18 - 96
ENTCX07TF (AZ530711)	SAPLIP 5	scaff_12421_1 (2)	5205 - 8282 / +3	8043 - 8282	3078	1026	18	1008	946 - 1026
ENTDQ84 (AZ546992)	SAPLIP 6	scaff_12305_1 (2)	11665 - 11390 / -1	11623 - 11390	276	92	15	77	14 - 92
ENTFF25TF (AZ546503)	SAPLIP 7	scaff_9929_1 (1)	14406 - 17183 / +3	16971 - 17183	2778	926	17	909	855 - 926
Ent396f12.q1c (keine NCBI Acc. Nr.)	SAPLIP 8	scaff_11196_1 (1)	37429 - 40368 / +1	40135 - 40368	2940	980	15	965	902 - 980
ENTNQ83TF (BH131027)	SAPLIP 9	scaff_10562_1 (1)	19719 - 19300 / -3	19536 - 19300	420	140	15	125	61 - 140
ENTJV93TF (AZ687176)	SAPLIP 10	scaff_11152_1 (1)	18448 - 16478 / -1	16717 - 16478	1971	657	16	641	577 - 657
ENTK117TF (AZ692153)	SAPLIP 11	scaff_9910_1 (1)	73893 - 71815 / -2	72048 - 71815	2079	693	17	676	615 - 693 ⁶
ENTK117TF (AZ692153)	SAPLIP 11	scaff_10708_1 (2)	3563 - 1485 / -3	1718 - 1485	2079	693	17	676	615 - 693 ⁶
ENTK117TF (AZ692153)	SAPLIP 11	scaff_12303_1 (2)	18987 - 21065 / +3	20832 - 21065	2079	693	17	676	615 - 693 ⁶
ENTE661TF (AZ550036)	SAPLIP 12	scaff_13482_1 (1)	22834 - 25452 / +1	25213 - 25452	2619	873	16	857	793 - 873
ENTID70TF (AZ685704)	SAPLIP 13	scaff_9950_1 (1)	106397 - 109423 / +2	109202 - 109423	3027	1009	keine Signalpeptid- vorhersage	1009	931 - 1005
ENTID70TF (AZ685704)	SAPLIP 13	scaff_11735_1 (2)	4648 - 1622 / -1	1843 - 1622	3027	1009	keine Signalpeptid- vorhersage	1009	931 - 1005
ENTJB84TF (AZ690015)	SAPLIP 14	scaff_10597_1 (1)	37000 - 39744 / +1	39502 - 39744	2745	915	17	898	834 - 915
ENTNW48TR (BH132588)	SAPLIP 15	scaff_11094_1 (2)	15685 - 13274 / -3	13489 - 13274	2412	804	17	787	728 - 800
ENTEW34TF (AZ546519)	SAPLIP 16	scaff_11241_1 (2)	6941 - 4179 / -1	4415 - 4179	2763	921	15	906	842 - 921 ⁶

Tab. 1: Identifikation der SAPLIPs von *E. histolytica*

Durch Analyse der Genomdatenbank wurden 16 neue Gene zusätzlich zu den drei bereits bekannten Amoebapores identifiziert, die für SAPLIPs kodieren. Die Sequenz für SAPLIP 11 konnte an drei verschiedenen Genorten, diejenige für SAPLIP 13 an zwei verschiedenen Genorten identifiziert werden.

1: die Nummern in Klammern bezeichnen die 3 Datenbanken der TIGR-Genomanordnung:

(1): histo.scaffolds.fasta (2): histo.singleContigs.fasta (3): histo.singletons.fasta

2: M (Methionin) steht für ein Startkodon und * steht für ein Stopkodon

3: Signalpeptidvorhersagen wurden mit dem Programm SignalP erstellt und manuell korrigiert, wenn die Vorhersage innerhalb der SAPLIP-Domäne lag

4: belegt durch experimentelle Daten

5: mit Ausnahme der Amoebapores steht nicht fest, ob die Proteine weitergehend prozessiert werden

6: manuell bestimmt

Alle putativen Proteine besitzen eine einzige, C-terminal gelegene SAPLIP Domäne und weisen mit einer einzigen Ausnahme eine Sequenz auf, die laut Vorhersage als Signalpeptid dienen kann und auf eine extracytosolische Lokalisation der Proteine schließen lässt. Eine

Homologie zu der SAPOSIN B-Domäne der Interpro-Datenbank konnte mittels des Algorithmus für SAPLIP 11 und 16 nicht identifiziert werden. Sie weisen aber das strukturelle Hauptkriterium, nämlich die konservierten Positionen der Cysteine, auf und werden deshalb als manuell identifizierte SAPLIPs aufgeführt.

Die Sequenzidentitäten der neuen SAPLIP-Domänen untereinander sind fast immer kleiner als 30 %, teilweise sogar kleiner als 10%. Lediglich SAPLIP 7 zu SAPLIP 13 (39 %), SAPLIP 5 zu SAPLIP 12 (37 %) sowie zu SAPLIP 8 (32 %) und SAPLIP 8 wiederum zu SAPLIP 11 (31 %) zeigen höhere Identitäten (Abb. 2A).

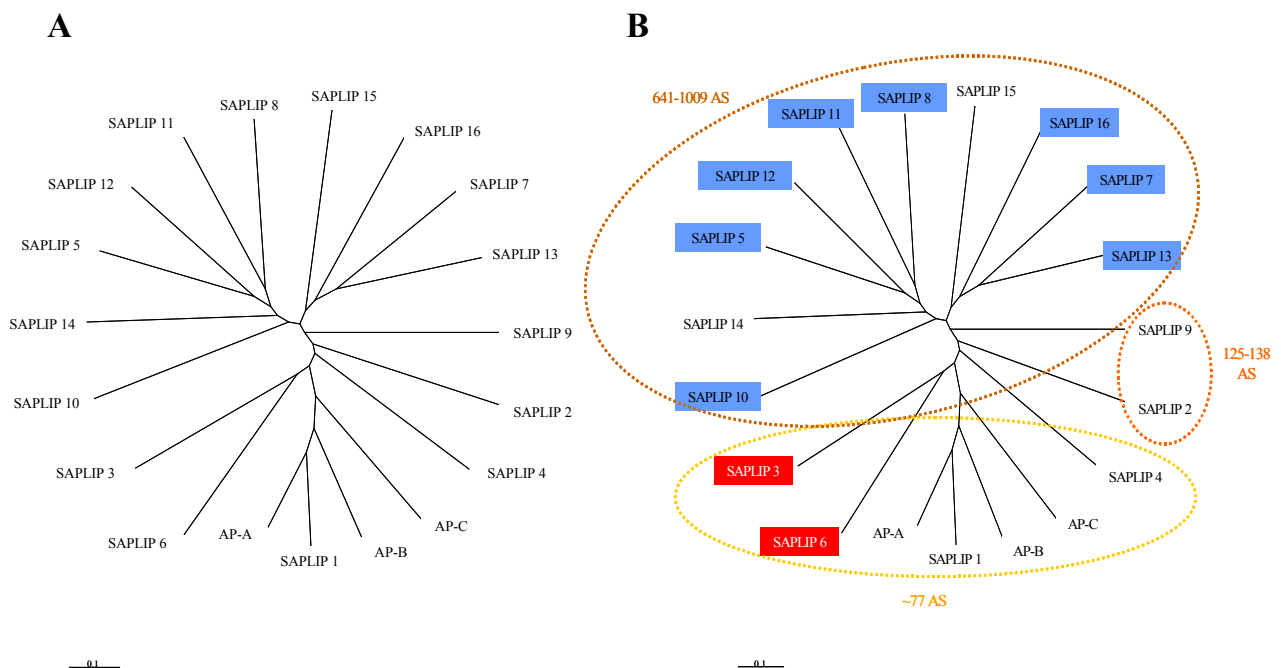


Abb. 2: Darstellung der Verwandtschaft der SAPLIP-Domänen anhand eines Stammbaumes

A: Die Aminosäuresequenzen der SAPLIP-Domänen wurden mit Hilfe des Programms "ClustalW" miteinander verglichen und mit dem Programm "Tree view" als "unrooted" Stammbaum dargestellt. Der Maßstab stellt die Distanz für die Frequenz der Aminosäureaustausche dar.

B: Rot unterlegt bedeutet negative Nettoladung mit einem Wert größer als -3 , blau unterlegt positive Nettoladung mit einem Wert größer als $+3$.

Vertreter mit ähnlicher Aminosäureanzahl bezogen auf die putativen Gesamtproteine sind durch gestrichelte Linien in Gruppen zusammengefasst.

Auch die Größe der putativen Proteine unterscheidet sich sehr (Abb. 2B). SAPLIP 1, 3, 4 und 6 ähneln in ihrer Größe (77-79 AS) und molekularen Architektur den Amöbapores. SAPLIP 2 und 9 nehmen mit 138 bzw. 125 Aminosäuren eine Zwischenstellung ein, während alle anderen SAPLIPs mit einer Aminosäureanzahl zwischen 641 bis 1009 wesentlich größer sind. Für die großen Proteine konnten keine weiteren funktionellen oder strukturellen Domänen außer der SAPLIP-Domäne identifiziert werden.

Nicht alle hier identifizierten SAPLIPs konnten den bisher (August 2005) durch das Genomprojekt annotierten Proteinen zugeordnet werden (Tab. 2). Dieser Annotationsprozess ist aber noch nicht abgeschlossen. Die Sequenzen der übrigen SAPLIP-Domänen können innerhalb der Sequenzen folgender "Accession" Nummern gefunden werden: AZ687176 (SAPLIP 10), AZ692153 (SAPLIP 13), AZ690015 (SAPLIP 14), BH132588 (SAPLIP 15) and AZ546519 (SAPLIP 16).

Name	Identisch zu (annotierte genomische Sequenzen)	Ähnlich zu (AS-Sequenzidentität, %) ¹	Orthologe Proteine (AS-Sequenzidentität, %)
Amoebapore A	Amoebapore A (88.t00015), partielle RNA (XM_648173.1)	Saposin-ähnliches Protein (22.t00008) Acc. EAL50450 (64%)	Disparpore A Acc.AAA18632 <i>E.dispar</i> (94%)
Amoebapore B	Amoebapore B; (X76904.1)	Amoebapore A Acc. AAA29111 (57%)	Disparpore B Acc.AAF04195 <i>E.dispar</i> (90%)
Amoebapore C	Amoebapore C; partielle RNA (XM_650937.1)	Amoebapore A Acc. AAA29111 (48%)	Disparpore C Acc.AAF04196 <i>E.dispar</i> (88%)
SAPLIP 1	Saposin-ähnliches Protein (22.t00008), partielle mRNA; (XM_650744.1)	Amoebapore A Acc. AAA29111 (64%)	Disparpore A Acc.AAA18632 <i>E.dispar</i> (68%)
SAPLIP 2	hypothet. Protein (18.t00035), partielle mRNA; (XM_650945.1)	-	-
SAPLIP 3	hypothet. Protein (9.t00058), partielle mRNA; (XM_651590.1)	Amoebapore A Acc. AAA29111 (30%)	Invapore X Acc.AAP80381 <i>E.invadens</i> (67%)
SAPLIP 4	hypothet. Protein (123.t00002), partielle mRNA; (XM_647211.1) und hypothet. Protein (129.t00002), partielle mRNA; (XM_647067.1)	Amoebapore C Acc. CAA54225 (27%)	Disparpore C Acc.AAF04196 <i>E.dispar</i> (30%)
SAPLIP 5	hypothet. Protein (22.t00025), partielle mRNA; (XM_650728.1)	-	-
SAPLIP 6	konserv. hypothet. Protein (12.t00062), partielle mRNA; (XM_651349.1)	-	-
SAPLIP 7	hypothet. Protein (6.t00033), partielle mRNA; (XM_651821.1)	-	-
SAPLIP 8	hypothet. Protein (223.t00004), partielle mRNA; (XM_645284.1)	-	-
SAPLIP 9	hypoth. Protein (223.t00004), partielle mRNA; (XM_645284.1)	-	-
SAPLIP 10	-	-	-
SAPLIP 11	-	-	-
SAPLIP 12	hypothet. Protein (107.t00005), partielle mRNA; (XM_647629.1)	-	-
SAPLIP 13	hypothet. Protein (36.t00042), partielle mRNA; (XM_649997.1)	-	-
SAPLIP 14	-	-	-
SAPLIP 15	-	-	-
SAPLIP 16	-	-	-

Tab. 2: Ähnlichkeiten der neuen SAPLIPs von *E. histolytica*

Identische und ähnliche Proteine zu den neuen SAPLIPs von *E. histolytica* sind aufgeführt.

1: wenn keine Ähnlichkeiten angegeben sind, bedeutet dieses, keine Proteine mit vergleichbarer Domänenzusammensetzung

Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aus *E. histolytica* konnten nur für SAPLIP 1, 3 und 4 gefunden werden, wobei SAPLIP 1 mit 64 % Sequenzidentität zu Amoebapore A am auffälligsten ist. SAPLIP 3 zeigt immerhin noch eine Sequenzidentität von 30% zu

Amoebapore A, während SAPLIP 4 mit 27% Identität Amoebapore C ähnlich ist und damit schon unterhalb des sogenannten Homogieschwellenwertes von 30% liegt. Alle anderen SAPLIPs weisen vernachlässigbar geringe Sequenzidentitäten zu anderen Proteinen aus *E. histolytica* auf.

Sequenzähnlichkeiten zu homologen Proteinen aus anderen Organismen konnten fast ausschließlich bei der sehr eng verwandten Art *E. dispar* gefunden werden (Tab. 2). Hierbei handelt es sich um die den Amoebapores entsprechenden orthologen Proteinen dieser Art. Auch *E. invadens* besitzt die zu den Amoebapores orthologen Proteine, außerdem jedoch ein Protein namens Invapore X, das eine auffällige Ähnlichkeit (Identität: 67%) zu SAPLIP 3 zeigt.

3.2 Analyse der Genexpression und ihrer Regulation durch humane Kolonzellen

3.2.1 Analyse mittels reverser Transkriptions-PCR

Alle SAPLIP-Gene werden exprimiert

Die Expression aller SAPLIP-Gene wurde mittels reverser Transkriptions-PCR unter Einsatz von genspezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen. Hierfür wurde die aus axenisch kultivierten Trophozoiten von *E. histolytica* gewonnene Gesamt-RNA mit dem Enzym DNaseI versetzt, um eventuelle DNA-Verunreinigungen auszuschließen und anschließend gereinigt. Die mRNA wurde mittels OligodT-gekoppelter "Avidin-Polystyrene Beads" isoliert, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und durch die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Einsatz von spezifischen Oligonukleotiden für die jeweiligen SAPLIP-Domänen die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert. Diese entstandenen Fragmente wurden kloniert und die isolierte Plasmid-DNA sequenziert.

Die konstitutive Transkription aller aus der Genomprojektdatenbank theoretisch identifizierten 16 SAPLIP-Sequenzen konnte auf diese Weise aus der mRNA von axenisch kultivierten Trophozoiten von *E. histolytica* bestätigt werden.

3.2.2 Analyse mittels Mikroarray

Nur das Amoebapore A Gen wird reguliert

Um zu überprüfen, ob die Expression der Gene durch eine Inkubation mit menschlichen Kolonzellen und deren Phagozytose reguliert wird, wurde eine vergleichende Transkriptionsanalyse mittels Mikroarrays durchgeführt. Hierfür wurden axenisch kultivierte Trophozoiten von *E. histolytica* für sechs Stunden mit HT29-Zellen, einer humanen Kolonzelllinie, unter anaeroben Bedingungen zusammen inkubiert. Als Vergleichsansatz dienten unter den gleichen Bedingungen parallel inkubierte Trophozoiten ohne HT29-Zellen. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass nach 3-4 Stunden die meisten HT29-Zellen durch die Trophozoiten lysiert worden waren. Im Gegensatz hierzu waren HT29-Zellen ohne Trophozoiten unter den gleichen Bedingungen intakt. Die Trophozoiten wurden nach insgesamt 6 Stunden geerntet und die Gesamt-RNA gewonnen und gereinigt.

Insgesamt wurden 4 Hybridisierungen durchgeführt, die auf 3 Vergleichsansätzen beruhen, wobei zwei der Hybridisierungen mit cDNA aus der identischen Gesamt-RNA erfolgte (siehe Abb. 3). Pro Hybridisierung wurde ein Glasträger, der je zwei Felder mit der identischen Anordnung der Amöben- sowie der Kontrolloligonukleotide enthielt, eingesetzt. Pro Feld waren je 3 Replikate der spezifischen Amöbenoligonukleotide immobilisiert worden.

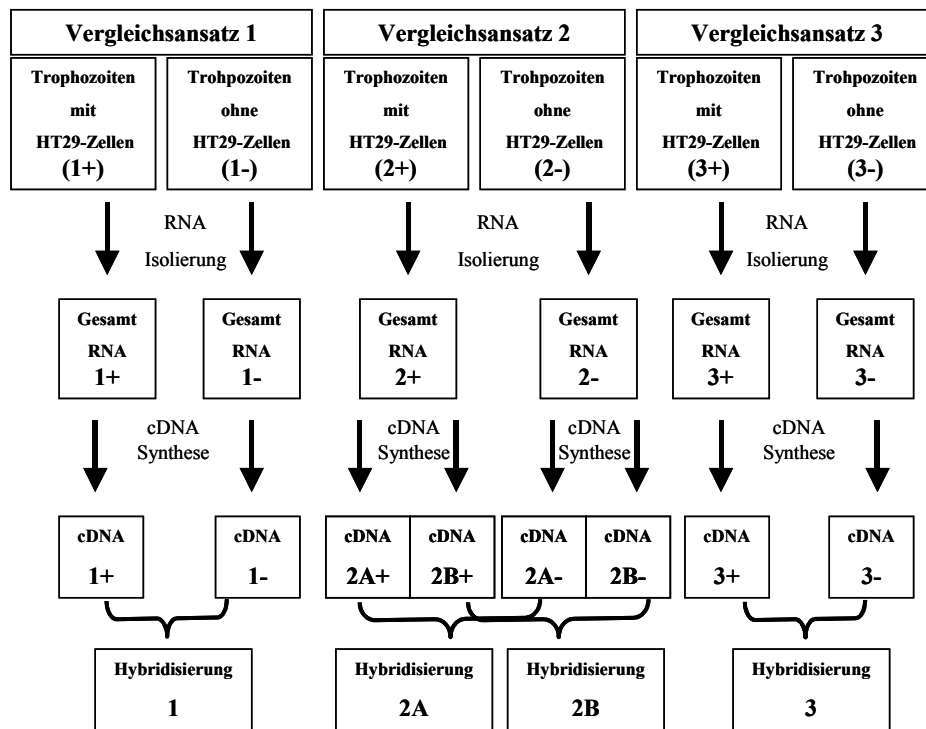


Abb. 3: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung für die Genexpressionsanalyse

Trophozoiten von *E. histolytica* wurden in drei vergleichenden Versuchsansätzen unter anaeroben Bedingungen für 6 Stunden bei 37°C mit oder ohne die humane Kolontumorzelllinie HT29 inkubiert. Daraus wurden die 6 resultierenden Gesamt-RNAs gewonnen und definierte Anteile anschließend in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde direkt durch mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder Cy5 gekoppelte dCTPs markiert. Die entgegengesetzt markierten cDNAs eines Vergleichsansatzes wurden vereinigt und für die Hybridisierung an immobilisierte Oligonukleotide eingesetzt (siehe 2.11.1-2.11.7).

Zur Datenerfassung wurden die Signale der Glasträger nach der Hybridisierung bei 532 nm (Cy3) and 635 nm (Cy5) angeregt und die Signalintensitäten eingelesen. Die Werte für die Signalintensitäten wurden nach der Lowess-Methode normalisiert und pro Oligonukleotidtriplett wurde der Medianwert der Signalintensitäten abzüglich der Hintergrundwerte gebildet. Diese Werte konnten nicht für die Oligonukleotidtripletts von jedem Feld erhoben werden, da die Signalintensitäten teilweise unter dem Mindestwert lagen und damit eine Unterscheidung vom Hintergrund zu gering war. Somit setzt sich der jeweilige Medianwert für die Gesamtauswertung aus einer unterschiedlichen Anzahl von Einzelmedianwerten (n) zusammen, die in der Tabelle in Abb. 4 angegeben ist. Dabei besteht das Minimum $n = 1$ aus dem Oligonukleotidtriplett eines Feldes eines

Hybridisierungsansatzes und das theoretische Maximum $n = 8$ aus dem Oligonukleotidtriplett je zweier Felder der vier Hybridisierungsansätzen. Da ein komplettes Feld eines Hybridisierungsansatzes ausgefallen ist, beträgt das Maximum nur $n = 7$.

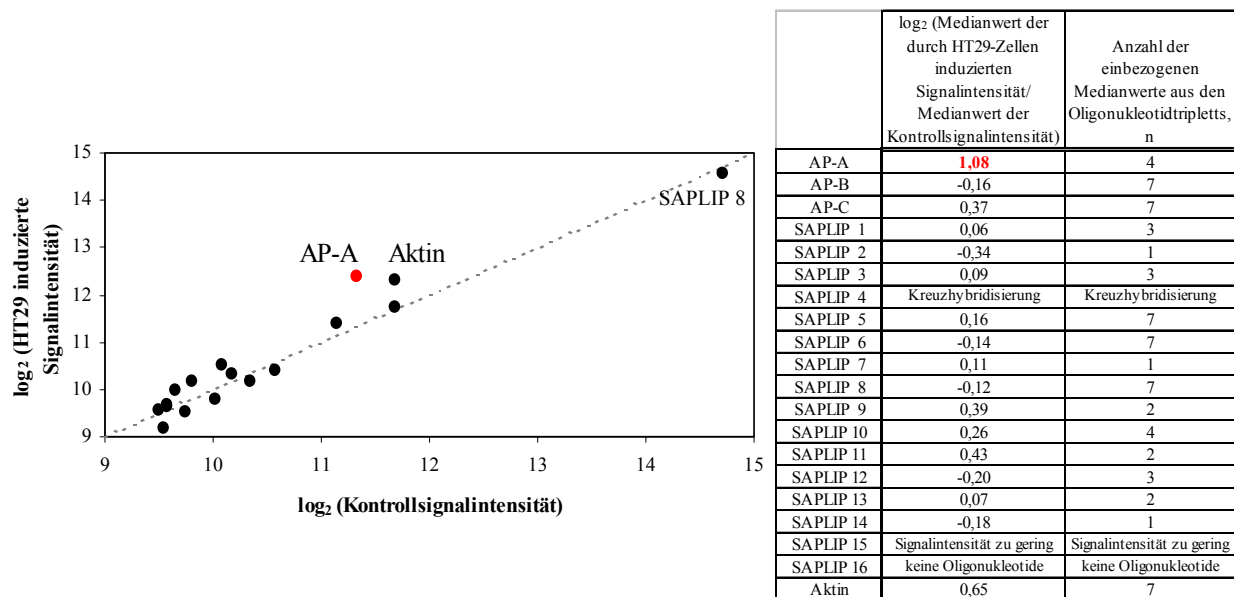


Abb. 4: Auswertung der Genexpressionsanalyse

Der Medianwert aus allen auswertbaren Medianwerten (n) der jeweiligen Oligonukleotidtripletts wurde gebildet. Für jedes Gen wurde der zur Basis 2 logarithmierte Quotient der Medianwerte der durch die HT29-Zellen induzierten Signalintensität und der nicht induzierten, Kontrollsignalintensität gebildet. Durch die Bildung des Logarithmus zur Basis 2 entspricht ein Ergebnis von 1 einer zweifachen Hochregulierung, ein Wert von 0 keiner Regulierung und ein Wert von -1 einer zweifachen Herunterregulierung.

Die Auswertung der Genexpressionsanalyse nach Induktion durch HT29-Kolonzellen im Vergleich zu einer nicht induzierten Kontrolle ergab, dass alle SAPLIP-Gene bis auf das Amoebapore A Gen konstitutiv exprimiert werden (Abb. 4). Das Amoebapore A Gen ist durch die Inkubation mit den HT29-Zellen zweifach hochreguliert. Das Aktin Gen zeigt die Tendenz durch die HT29-Zellen vermehrt exprimiert zu werden, erreicht aber keine zweifache Hochregulierung. Ein außergewöhnlich hohes Intensitätssignal im Gegensatz zu allen anderen SAPLIPs zeigt das Gen von SAPLIP 8, was auf eine starke Expression hindeuten könnte.

Das Gen von SAPLIP 16 ist nicht vertreten, da keine hierfür repräsentativen Oligonukleotide auf dem Glaträger immobilisiert worden waren. Die Oligonukleotide von SAPLIP 4 zeigten eine Kreuzhybridisierung mit den externen Kontroll-RNAs, so dass dieses Gen nicht ausgewertet werden konnte. Auch das Gen von SAPLIP 15 konnte nicht mit in die Auswertung einbezogen werden, da die Signalwerte zu gering waren. Die Expression dieses Gens konnte aus derselben RNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide nachgewiesen werden (siehe 3.2.1), so dass es

sich wohl um ein Gen mit sehr geringer Expression handelt oder die hier gewählten experimentellen Bedingungen nicht optimal gewesen sind.

Zur Kontrolle wurde eine Hybridisierung von cDNA aus reiner HT29-RNA unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Hierbei konnte keine Kreuzhybridisierung dieser humanen RNA (10 µg) mit den Amöbenoligonukleotiden festgestellt werden und damit eine Verfälschung der Signale durch eventuell noch vorhandene humane RNA ausgeschlossen werden.

Als externe Kontrollen wurden jedem cDNA Synthese Ansatz zusätzlich zu der Amöben-RNA jeweils noch Luciferase-Kontroll-RNA, die kommerziell erworben und daher unabhängig von der individuellen RNA-Präparation war, sowie ein farbstoffspezifisches Standard-RNA-Gemisch, das sich aus RNAs kodierend für vier verschiedene Gene von *Saccharomyces cerevisiae* in bestimmten Konzentrationen zusammensetzte, hinzugefügt. Auf jedem Glasträger waren zusätzlich entsprechende Oligonukleotide immobilisiert, wobei dieses für die Luciferase-Kontrolle in einer Verdünnungsreihe erfolgt war.

Einerseits zeigte die ähnliche Signalstärke bei der Auswertung der Luciferase-Oligonukleotide, dass die cDNA-Synthese der beiden Vergleichsansätze mit der gleichen Effizienz verlaufen ist, andererseits konnte eine Abnahme der Signalstärke mit sinkender Konzentration des Oligonukleotides festgestellt werden. Diese war allerdings nicht so deutlich wie erwartet, was auf eine Kreuzhybridisierung von Amöben-cDNA mit den Luciferase-Oligonukleotiden zurückgeführt werden kann.

Das Standard-RNA-Gemisch enthielt für den Cy3-cDNA Ansatz die dreifache Menge an Standard RNA 1 und nur ein Drittel der Standard RNA 5 gegenüber dem Gemisch für den Cy5-cDNA-Ansatz. Die Standard RNAs 2 und 3 lagen in beiden Ansätzen in gleichen Konzentrationen vor. Es wurde die Cy3 markierte cDNA als Experimentansatz und die Cy5 markierte cDNA als Kontrollansatz ausgewertet. Dabei ergab sich für das Standard-Gen 1 stets ein Wert, der einer dreifachen Hochregulierung entsprach, für das Standard-Gen 5 stets ein Wert, der einer dreifachen Herunterregulierung entsprach, während die jeweiligen Werte für die Standard-Gene 2 und 3 Genen ohne Regulation entsprachen. Dieses zeigte parallel zum eigentlichen Experiment, dass die cDNA-Synthese nur von der vorliegenden RNA-Menge abhängt und eine Regulation nachweisbar ist.

3.3 Molekulare Klonierung und rekombinante Expression der SAPLIP-Domänen

Die rekombinante Expression der Amoebapores scheiterte bisher. Um die Expression einer Vielzahl von Proteinen gleichzeitig verfolgen zu können und einen schnellen Überblick über die erfolgreich synthetisierten Proteine zu bekommen, wurde eine "Expressionscreening" in *E. coli* angewendet.

11 von den ursprünglich 12 identifizierten SAPLIP-Domänen (Bruhn und Leippe, 2001) sowie Amoebapore B wurden in den Expressionsvektor pTAEx kloniert. Die zwölfte SAPLIP-Domäne zeigte nur eine geringe Sequenzabweichung (Identität: ~ 90 %) von SAPLIP 7, was sich bei der fortschreitenden Genomsequenzierung als Sequenzierungsfehler herausstellte und entfiel somit.

Die Konstruktion des Vektors pTAEx erfolgte auf der Basis des pRSet-Expressionsvektors von Invitrogen (Groningen, Niederlande). Der Vektor besteht aus 3524 Basenpaaren und enthält das Gen kodierend für das grün fluoreszierende Protein aus *Aequorea victoria* mit einem C-terminalen His-Tag unter der Kontrolle des T7-Promotors (Abb. 5).

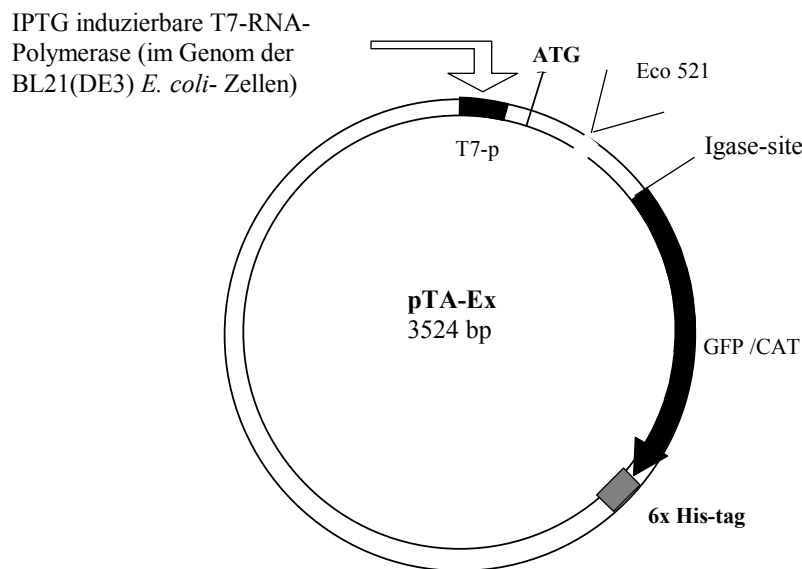


Abb. 5: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pTAEx

Der Expressionsvektor pTAEx besteht aus 3524 bp und enthält das Gen kodierend für das 27 kDa grün fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*, an das sich C-terminal ein His-tag anschließt. Das zu klonierende Gen wird zwischen ein Startcodon und das GFP über eine Eco52I-Schnittstelle eingefügt, was eine Leserasterverschiebung nach sich zieht, so dass es als Fusionsprotein mit GFP synthetisiert werden kann. Die Expression steht unter der Kontrolle des T7-Promotors (T7-p).

Der Klonierungsablauf für das "Expressionscreening" umfasst das Schneiden mit nur einer Restriktionsendonuklease, Eco52I, was zu überhängenden Enden des Vektors führt (Abb. 6

B). Diese werden mit dNTPs aufgefüllt und die auf diese Weise entstandenen glatten Enden dephosphoryliert. Für die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde die PWO-Polymerase verwendet, um Amplifikate mit glatten Enden zu erhalten. Die Fragmente wurden phosphoryliert. Auf diese Weise können Fragmente per "Blunt-end"-Ligation eingefügt werden.

Zur Freisetzung der SAPLIP-Domänen durch Abtrennung des C-terminal gelegenen Fusionspartners GFP einschließlich His-tag mittels Proteaseverdau wurde eine Sequenz kodierend für eine Igase-Schnittstelle eingefügt (siehe Abb. 5). Dieses wurde durch Klonierung eines Doppelstrangoligonukleotids mit der entsprechenden Sequenz zwischen das Startkodon und das Gen kodierend für das GFP über die Eco 52I-Schnittstelle erreicht. Nach der proteolytischen Spaltung durch die Endoprotease Igase befanden sich noch 4 zusätzliche Aminosäuren (GRPP) am C-Terminus der jeweiligen SAPLIP-Domäne. Am N-Terminus befanden sich bedingt durch die Klonierungsstrategie 3 zusätzliche Aminosäuren (MAA).

Die für die Expression verwendeten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen enthalten im Genom eine für die T7-RNA-Polymerase kodierende Sequenz. Durch IPTG wird die Synthese dieser T7-RNA-Polymerase induziert. Diese wiederum bewerkstelligt die sehr effiziente Transkription des klonierten Gens im Vektor von dem 5'-gelegenen T7-Promotor aus (siehe Abb. 5).

Diese Klonierungsstrategie ermöglicht ein "Expressionscreening" mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporterprotein, durch das die erfolgreiche Expression des klonierten Genprodukts aufgrund der Fluoreszenz der Bakterienkolonie bereits auf der Ebene der Transformation angezeigt wird. Grundlage hierfür stellt eine Leserasterverschiebung während der Klonierung dar, bei der das durch die Vektorsequenz kodierte Startmethionin in den korrekten Leserahmen mit dem zu klonierenden Fragment und dem ebenfalls durch die Vektorsequenz kodierten GFP rückt. Im ungeschnittenen Vektor ist das Startmethionin nicht im korrekten Leserahmen (Abb. 6 A). Erst das Auffüllen der überhängenden Vektorenden mit dNTPs nach der Restriktion zieht eine Leserasterverschiebung nach sich, durch die das GFP translatiert werden kann (Abb. 6 C).

Nach der Transformation von den *E. coli* BL21(DE3)-Zellen können die Bakterienkolonien der Transformationsplatte mit UV-Licht angeregt werden. Da es sich um eine Klonierung mit glatten Enden handelt, kann ein Fragment einerseits korrekt, "sense", als auch entgegengesetzt, "antisense", eingefügt werden. Meistens tritt dann aber ein Stopkodon auf, so dass keine Synthese des Fusionsproteins stattfinden kann.

Die Expression bei den Transformationskolonien wird nicht durch IPTG induziert, sondern es wird die Hintergrundexpression ausgenutzt. So ist es gerade bei schwach exprimierten

Genprodukten nötig, die Platten einige Tage bis zur Auswertung bei 4°C zu lagern. Bei Induktion durch IPTG verhindert die starke Expression das Wachstum vollständig. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit den grünfluoreszierenden Kolonien als Matrize und vektorinternen Oligonukleotiden durchgeführt und die gereinigte Plasmid-DNA sequenziert.

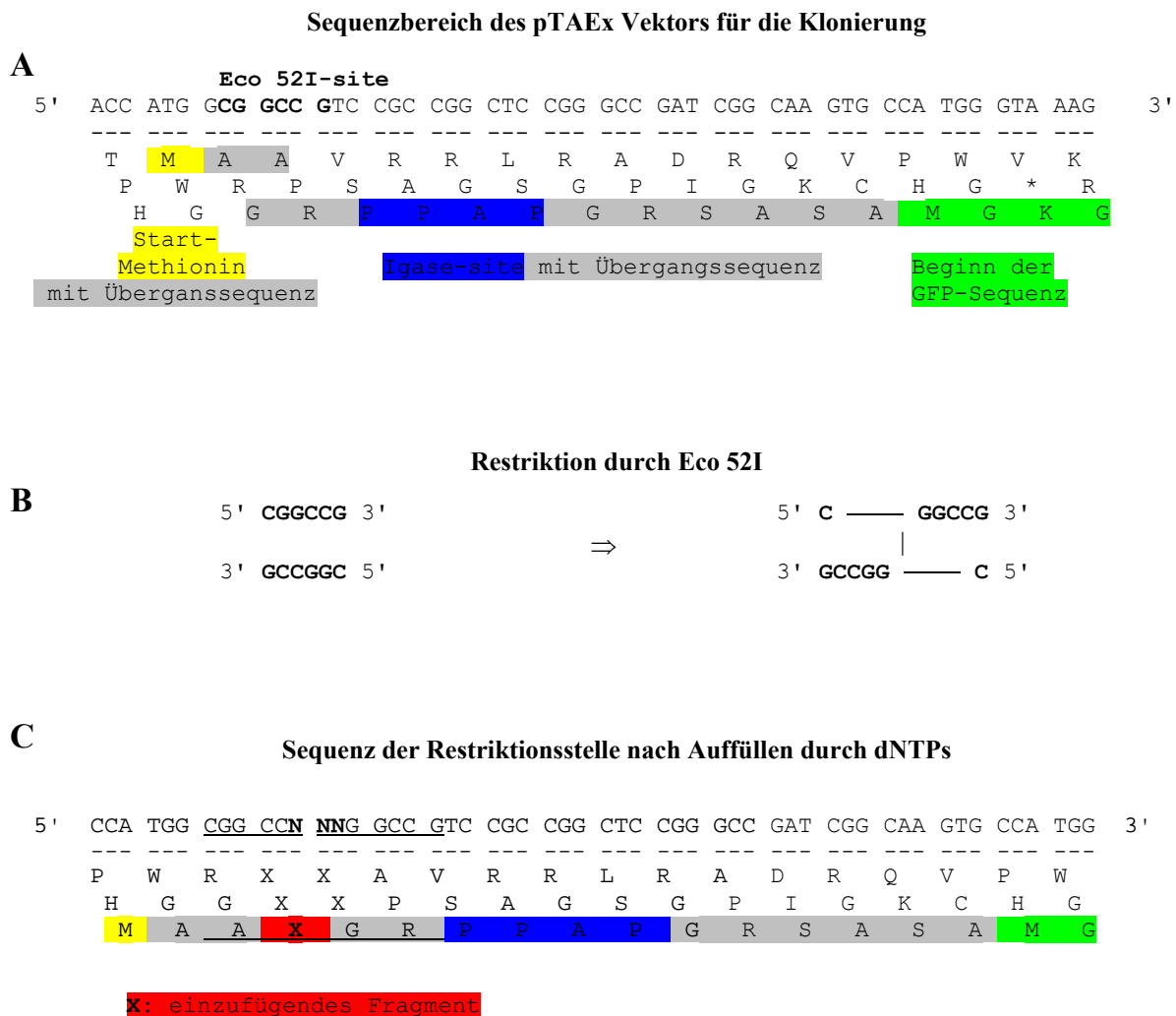


Abb. 6: Veränderung der Vektorsequenz während der Klonierung

Während der Klonierung für das "Expressionsscreening" tritt eine Leserasterverschiebung ein, bedingt durch das Auffüllen der überhängenden Vektorenden mit dNTPs nach der Restriktion durch Eco52I. Dadurch rückt ein vom Vektor kodiertes Startmethionin in den korrekten Leserahmen für die Translation einer eingefügten Gensequenz in Fusion mit GFP.

A: Ausschnitt aus der Vektorsequenz im Bereich der Klonierungsstelle vor der Restriktion durch Eco52I. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz in 5'-3' Richtung und die drei Leseraster der abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

B: Nukleotidsequenz der Restriktionsstelle von Eco52I und der einzelsträngigen, überhängenden Vektorenden nach der Restriktion.

C: Ausschnitt aus der Vektorsequenz im Bereich der Klonierungsstelle nach Restriktion durch Eco52I und Auffüllen der einzelsträngigen, überhängenden Vektorenden durch dNTPs. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz in 5'-3' Richtung und die drei Leseraster der abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die erfolgten Klonierungen und die Effizienz der Expressionen.

SAPLIP-Domäne von	Klonierung		Expression	
	Sequenzierungs- vektor	Expressionsvektor	löslich	unlöslich
SAPLIP 1	+	+	-	-
SAPLIP 2	+	-		
SAPLIP 3	+	+	+	++
SAPLIP 4	+	-		
SAPLIP 5	+	+	+	++
SAPLIP 6	+	+	+	++
SAPLIP 7	+	+	+	++
SAPLIP 8	+	-		
SAPLIP 9	+	-		
SAPLIP 10	+	+	(+)	++
SAPLIP 11	+	+		
SAPLIP 12	+	+	+	++
SAPLIP 13	+	+	(+)	+
SAPLIP 14	+	+	+	++
SAPLIP 15	+	-		
SAPLIP 16	+	+	+	++
Amoebapore A	+	-		
Amoebapore B	+	+	- (+ nur in Rosetta-gami B (DE3))	+
Amoebapore C	+	-		

Tab. 3: Tabellarische Übersicht der Klonierungs- und Expressionsergebnisse

Alle SAPLIP-Domänen konnten kloniert werden. Für die Expression konnten 11 SAPLIP-Domänen, sowie Amoebapore B in den Expressionsvektor pTAE_x kloniert werden. Davon werden fast alle unter Verwendung von BL21(DE3)[pAplacIQ]-*E.coli*-Zellen bei Raumtemperatur (Ausnahme SAPLIP 1) zu einem gewissen Anteil löslich synthetisiert. Für Amoebapore B ist dieser Anteil sehr gering und nur unter Verwendung von den Rosetta-gami B (DE3)-*E.coli*-Zellen zu erreichen, die die Ausbildung von cytoplasmatischen Disulfidbrücken erleichtern.

Fast alle SAPLIP-Domänen werden synthetisiert (mit Ausnahme von SAPLIP 1), allerdings variiert die Höhe der Ausbeute sowie das Verhältnis von löslich und unlöslich synthetisiertem GFP-Fusionsprotein (siehe Abb. 8 und Tab. 3)

Die Expressionsversuche wurden bei Raumtemperatur für 2 Stunden durchgeführt. Abb. 7 zeigt ein silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit den Gesamtextrakten des SAPLIP 3/GFP-Fusionsproteins im Vergleich zu den Kontrollen, wobei eine deutliche Bande in Höhe des errechneten Fusionsproteins ($\sim 37,5$ kDa) auftritt.

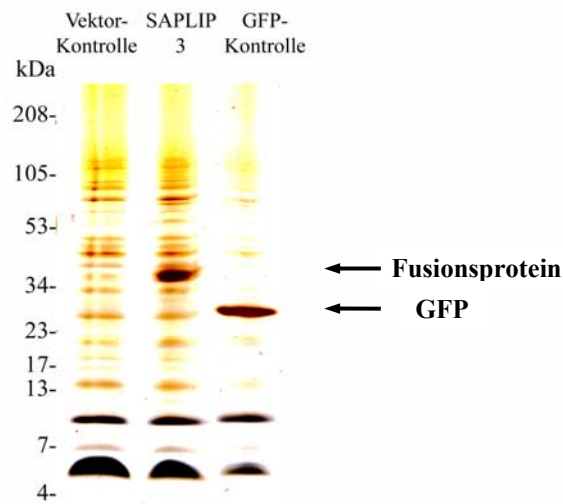


Abb. 7: SDS-PAGE Analyse der Synthese des SAPLIP 3/GFP-Fusionsprotein im Vergleich zu den Kontrollen

Gesamtextrakte mit dem SAPLIP 3/GFP-Fusionsprotein und den Kontrollen wurden durch Zugabe von 2% SDS zu den sedimentierten *E. coli*-Zellen und anschließende Inkubation bei 95°C hergestellt und gleiche Zellzahlen entsprechend der Bestimmung der optischen Dichte auf einem 13%igen SDS-PA-Gel getrennt. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung entwickelt.

Um das Verhältnis von löslich zu unlöslich synthetisiertem Fusionsprotein zu ermitteln, wurden *E. coli*-Extrakte mechanisch aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert, wodurch eine Trennung des Überstand mit den löslichen Proteinen von dem Sediment mit den unlöslichen Proteinen erfolgte. Diese Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 8).

Abbildung 8 zeigt beispielhaft den Western-Blot für einige SAPLIP/GFP-Fusionsproteine und die Kontrollen. Als Kontrollen wurden entsprechend behandelte *E. coli*-Extrakte verwendet, die entweder mit dem pTAEEx Vektor (Vektor-Kontrolle) oder dem pT7GFP-Vektor (GFP-Kontrolle) transformiert worden waren.

Die GFP-Kontrolle zeigt ein starkes Signal bei 28 kDa. Der pT7GFP-Vektor wurde auf der Basis des pRSET 5-d Vektors (Invitrogen, Groningen, Niederlande) konstruiert und enthält das Gen kodierend für das grün fluoreszierende Protein aus *Aequorea victoria* mit C-terminalem His-Tag unter der Kontrolle des T7-Promotors.

Die Vektor-Kontrolle zeigt kein Signal, da die Induktion zu keiner Translation des GFP führen kann (Abb. 6A). Nach der Datenbankanalyse bestehen SAPLIP 1, 3 und 6

entsprechend den murenen Amoebapore-Proteinen nur aus der SAPLIP-Domäne, während SAPLIP 10 und 13 größere Proteine sind und hier nur die SAPLIP-Domäne kloniert wurde. Die errechnete Größe der Fusionsproteine liegt zwischen 37,3 kDa (SAPLIP 1) und 38,5 kDa (SAPLIP 13).

Für das SAPLIP 1-Fusionsprotein zeigt sich auf dieser Höhe keine Bande, was bedeutet, dass kein Fusionsprotein synthetisiert wurde. Für die Fusionsproteine von SAPLIP 3 und 6 verteilen sich die Signale ungefähr 1:2 in löslich zu unlöslicher Fraktion auf, wobei es insgesamt aber prominente Signale sind. Bei dem SAPLIP 6 fällt ein etwa gleich starkes Signal auf der Höhe von 32 kDa in beiden Fraktionen auf. Die Fusionsproteine von SAPLIP 3 und SAPLIP 6 liegen also zu einem gewissen Anteil löslich vor, während diejenigen von SAPLIP 10 und 13 fast ausschließlich unlöslich synthetisiert werden. Dabei ist das Signal für das SAPLIP 13-Fusionsprotein auch im unlöslichen schwach.

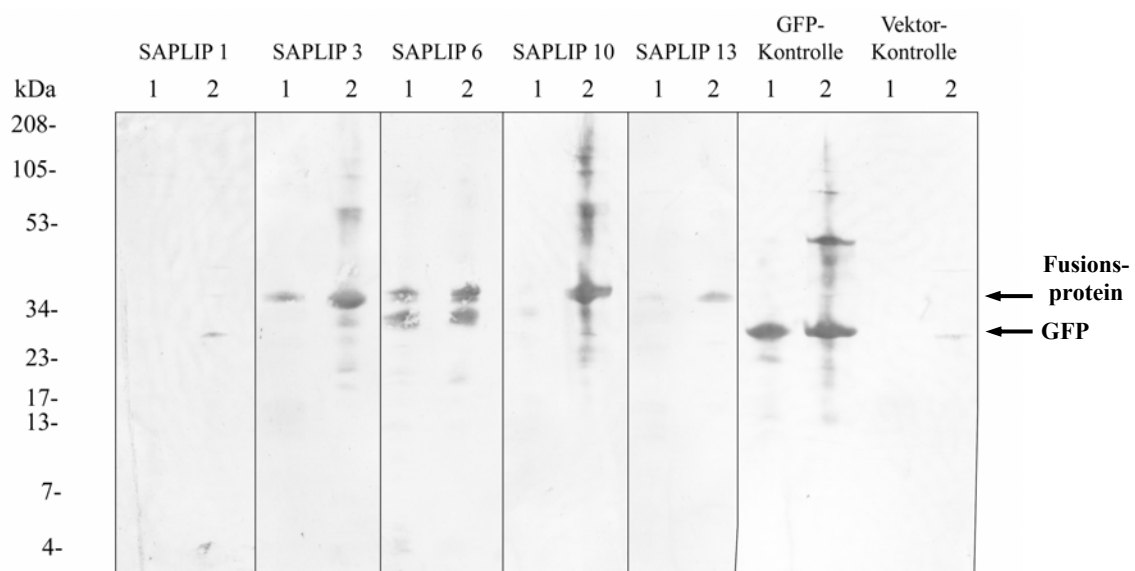


Abb. 8: Expressionsanalyse einiger Fusionsproteine und der Kontrollen im Western-Blot mittels Anti-GFP-Antikörper

Für jedes Fusionsprotein wurde die gleiche Zellzahl entsprechend der Bestimmung der optischen Dichte eingesetzt. Die gleiche Menge von Überstand (Spur 1) und Sediment (Spur 2) nach Aufschluss und Zentrifugation der entsprechenden Extrakte wurde auf einem 13%igen SDS-PA-Gel getrennt und auf eine PVDF Membran für die Analyse im Western-Blot transferiert. Die Anti-GFP-Antikörper wurden mit einem *E.coli* BL21(DE3)-Extrakt vorinkubiert und in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Der genaue Ablauf erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben.

Auf diese Weise wurden auch die Werte in Tabelle 3 für die anderen Fusionsproteine gewonnen.

3.4 Expression und Reinigung der rekombinanten SAPLIPs

Um für die nachfolgenden Aktivitätsstudien eine ausreichende Menge an reinem Protein zu Verfügung zu haben, wurden verschiedene Vertreter der SAPLIPs in größerem Maßstab rekombinant exprimiert und gereinigt.

Für die Expression des SAPLIP 3, SAPLIP 6 und der SAPLIP Domäne von SAPLIP 12 (SAPLIP-Domäne 12) wurden BL21(DE3)[pAPlacIQ]-*E.coli*-Zellen mit dem Expressionsvektor pTAEx, in den jeweils das 234 bp, 231 bp bzw. 237 bp große Gen kloniert worden war, transformiert. Diese BL21(DE3)-Zellen tragen ein zusätzliche Plasmid, das für die Kanamycinresistenz und das Repressorprotein des Laktoseoperons kodiert. Dieses Repressorprotein reguliert die Synthese der T7-RNA-Polymerase im Genom.

Die Synthese der SAPLIP/GFP-Fusionsproteine erfolgte bei Raumtemperatur für 2-3 Stunden. Nach dem Aufschluss des Zellextraktes wurden die rekombinanten SAPLIP/GFP-Fusionsproteine aus der Fraktion mit den löslichen Proteinen gereinigt.

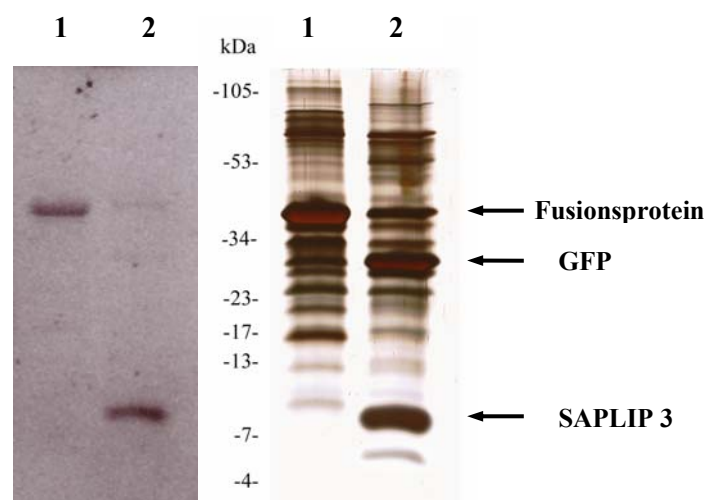


Abb. 9: Analyse der Trennung des SAPLIP 3 vom GFP durch die Endoproteinase Igase mittels spezifischer Cystein-Markierung und SDS-PAGE

Die Cysteine der Proteine wurden mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Monobromobimane nach 2.13.3 spezifisch markiert und anschließend auf einem 13%igen SDS-PA-Gel getrennt. Dieses Gel wurde zunächst mittels UV-Licht analysiert (linke Seite), wobei die Farben invers dargestellt sind. Anschließend wurden die Banden durch Silberfärbung entwickelt (rechte Seite). Es wurden gleiche Mengen der Fraktion der SAPLIP 3/GFP-Fusionsproteinreinigung vor dem Zusatz der Endoproteinase Igase (Spur 1) und nach Abtrennung des SAPLIP 3 vom GFP (Spur 2) aufgetragen.

Für die Reinigung der Fusionsproteine mittels Nickelionen-Affinitätschromatographie wurde der C-terminale His-tag des GFPs genutzt. Dieses Reinigungssystem beruht auf der Komplexbildung von Histidinresten und Nickelionen bei basischen pH-Werten. Die Elution erfolgte durch Konkurrenz der Histidinreste mit Imidazol. Die Konzentration des Imidazols

wurde in Form eines linearen Gradienten erhöht und die Elution konnte durch die Fluoreszenz, bedingt durch das GFP, verfolgt werden. Die genaue Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit Anti-His- oder Anti-GFP-Antikörpern.

Das auf diese Weise gewonnene Eluat wurde mit oxidiertem und reduziertem Glutathion zur Ausbildung von Disulfidbrücken versetzt. Für das SAPLIP 3/GFP-Fusionsprotein folgte eine Dialyse gegen Puffer mit geringem Salzgehalt, um anschließend durch Wasserentzug die Probe zu konzentrieren. Diese Fraktion oder für die anderen SAPLIP/GFP-Fusionsproteine direkt die Glutathion-Fractionen wurden dann gegen den Inkubationspuffer für das endoproteolytische Enzym Igase dialysiert. Durch dieses Enzym, dessen spezifische Erkennungssequenz zwischen den C-Terminus des SAPLIPs und den N-Terminus des GFPs kloniert worden war, wurde das entsprechende SAPLIP von seinem Fusionspartner GFP getrennt. Durch spezifische Markierung der Cysteine durch Monobromobimane und anschließende SDS-PAGE wurde der Fortschritt der Freisetzung der SAPLIPs kontrolliert (Abb. 9). Alternativ wurde die Abnahme des Signals auf Höhe des Fusionsproteins und die parallele Zunahme des Signals auf Höhe des GFPs im Western-Blot mit Anti-His-Antikörpern nachgewiesen.

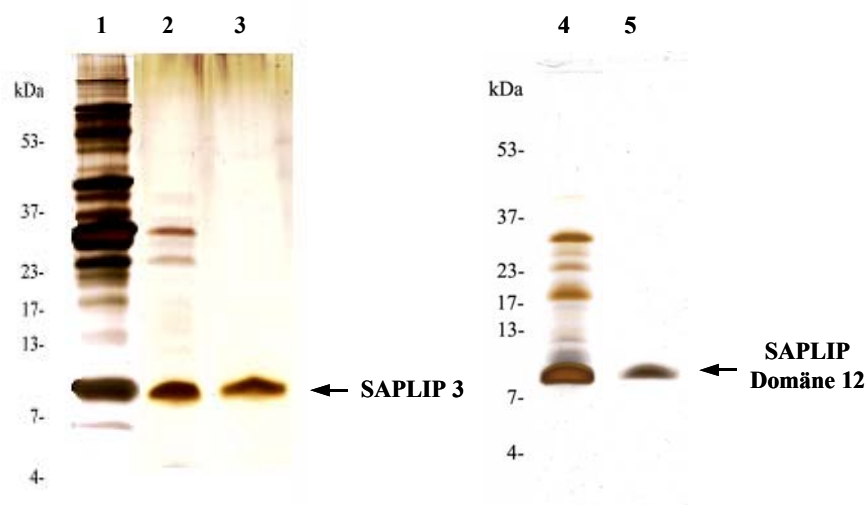


Abb. 10: SDS-PAGE Analyse verschiedener Reinigungsstufen des SAPLIP 3 und der SAPLIP-Domäne 12

Es wurden Aliquots der verschiedenen Reinigungsfractionen nach Abtrennung des SAPLIP 3 (Spur 1-3) bzw. der SAPLIP Domäne von SAPLIP 12 (Spur 4 + 5) vom GFP auf einem 13%igen SDS-PA Gel getrennt und die Banden durch Silberfärbung entwickelt.

Spur 1: Reinigungsfraction nach Abtrennung des SAPLIP 3 durch die Endoproteinase Igase.

Spur 2: Eluat (40 % Acetonitril, 0,1 % TFA) der SepPak-Säule

Spur 3: HPLC-reines SAPLIP 3

Spur 4: Eluat (40 % Acetonitril, 0,1 % TFA) der SepPak-Säule

Spur 5: HPLC-reine SAPLIP Domäne von SAPLIP 12

Der Ansatz wurde erneut mit oxidiertem und reduziertem Glutathion inkubiert, anschließend stark angesäuert und zur groben Fraktionierung und zur Konzentrierung der SAPLIPs auf eine hydrophobe Matrix (Sep Pak-Säule) geladen.

SAPLIP 3 und die SAPLIP-Domäne 12 wurden mit 40% Acetonitril, 0,1% TFA eluiert, während SAPLIP 6 mit 50 % Acetonitril, 0,1% TFA eluiert wurde. Als abschließender Reinigungsschritt wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Umkehrphasen mit Hilfe der HPLC mit einem linearen Acetonitrilgradienten durchgeführt.

Die SAPLIP-Domäne von SAPLIP 12 eluierte ab 32 %, das SAPLIP 3 ab 30 % und das SAPLIP 6 ab 38 % Acetonitril, 0,1% TFA. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE bestätigt (Abb. 10). Für SAPLIP 6 konnte allerdings keine reine, sondern lediglich eine an SAPLIP 6 angereicherte Proteinlösung auf diese Weise gewonnen werden, wobei der Anteil an SAPLIP 6 aufgrund der Bandenstärke im silbergefärbten Polyacrylamidgel auf ca. 30 % zu schätzen war.

Bestätigung der Struktur von SAPLIP 3

Die strukturelle Unversehrtheit von SAPLIP 3 wurde mittels Zirkulardichroismus (CD) - Spektroskopie kontrolliert (Abb. 11). Der Verlauf des CD-Spektrums des gereinigten SAPLIP 3 in 0,01 % TFA entspricht einem α -helikalen Protein ohne β -Faltblattstrukturen, wie für ein Protein mit Saposin-ähnlicher Faltung zu erwarten (Ahn *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2003; de Alba *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004; Kervinen *et al.*, 1999; Liepinsh *et al.*, 1997).

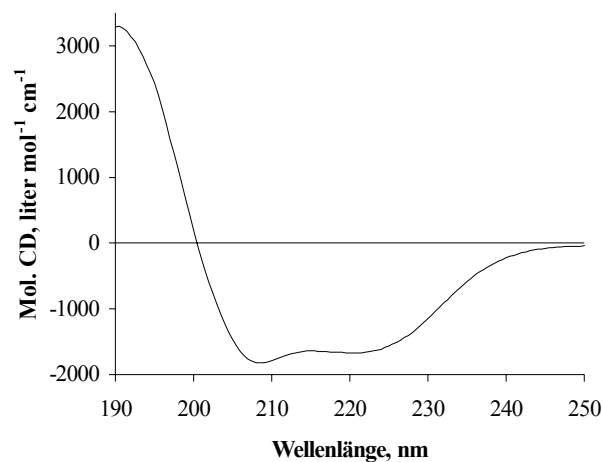


Abb. 11: CD-Spektrum von SAPLIP 3 im fernen UV-Bereich

Der molare Zirkulardichroismus einer 110 μ M Proteinlösung in 0,01 % TFA in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist dargestellt.

Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die Identität des SAPLIP 3 und das Vorhandensein der erwarteten drei Disulfidbrücken. Eine kovalente Dimerisierung in Lösung konnte aufgrund der Daten ausgeschlossen werden, so dass das zusätzliche siebte Cystein also nicht in eine intermolekulare Disulfid-Brücke involviert ist.

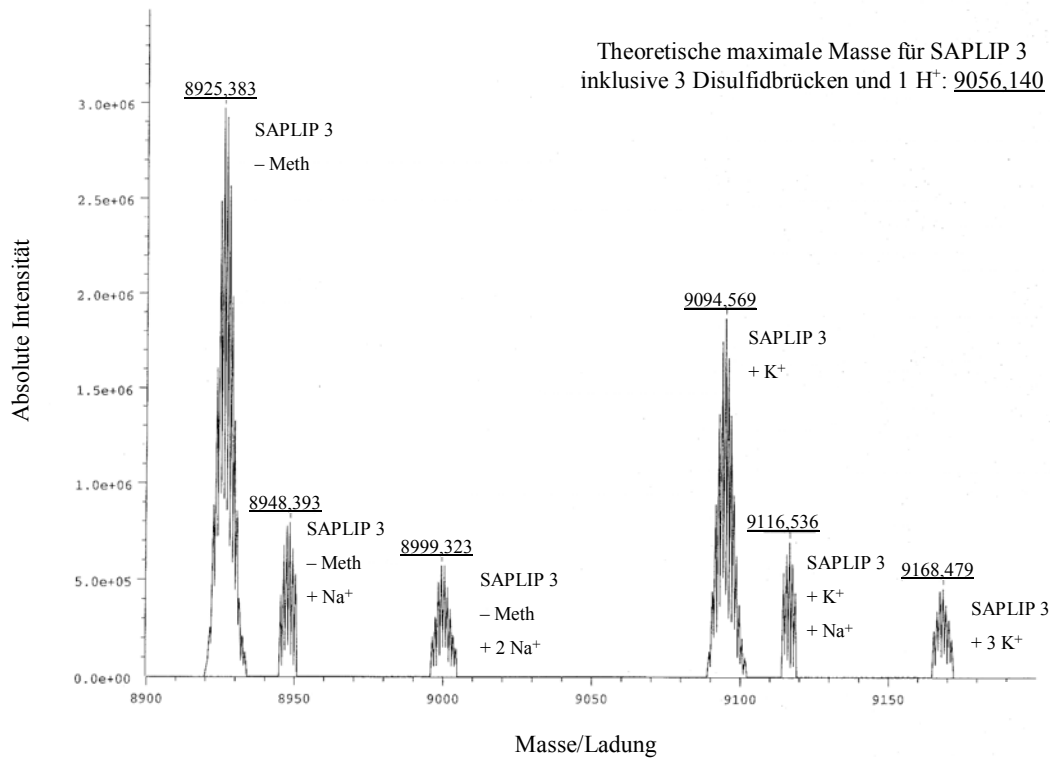


Abb. 12: Massenspektrometrische Analyse von SAPLIP 3

Das Massenspektrum von SAPLIP 3 nach Dekonvolution und die abgeleiteten SAPLIP 3 Formen sind dargestellt. K⁺ steht für Kaliumionen, Na⁺ für Natriumionen und Met für Methionin.

Es lag allerdings keine homogene Lösung vor, da Signale auftraten, die einem um das Startmethionin verkürztem Protein zuzuordnen waren (Abb. 12). Dieses ist wohl auf eine Abtrennung des N-terminalen Methionins durch die *E.coli* Zellen während der Expression zurückzuführen, ist aber für die Aktivität des Proteins vernachlässigbar. Außerdem konnten Proteinformen mit je einem oder mehr Kalium- und/oder Natriumion assoziiert identifiziert werden.

3.5 Aktivitätstests

3.5.1 Liposomenbindungstest

SAPLIP 3 und die SAPLIP-Domäne 12 sedimentieren nicht gebunden an Liposomen

Eine Gemeinsamkeit aller SAPLIPs ist, dass sie in der Lage sind, mit Lipiden zu interagieren. Hierzu wurde untersucht, ob sich SAPLIP 3 und die SAPLIP-Domäne 12, wie die Amoebapores, an Liposomen gebunden sedimentieren lassen. Es wurden multilamellare Liposomen mit den Proteinen inkubiert und anschließend zentrifugiert, um ungebundenes Protein von dem mit den Liposomen assoziierten Protein zu trennen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE.

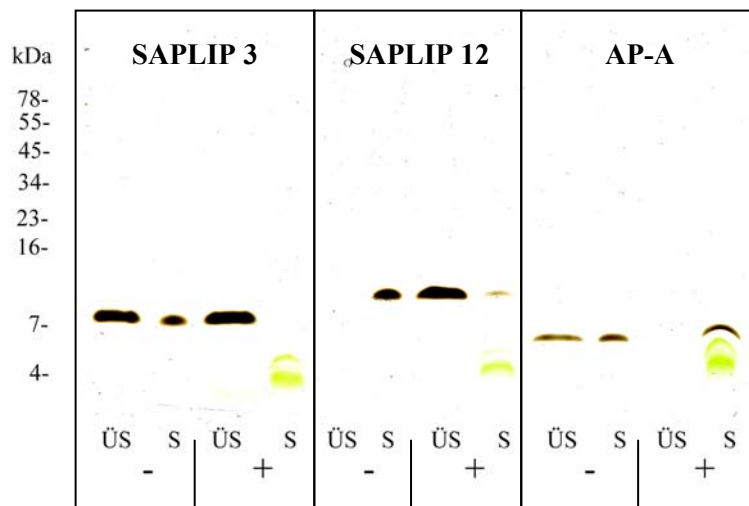


Abb. 13: SDS-PAGE Analyse der Liposomenbindungstests

200 ng SAPLIP 3, SAPLIP-Domäne 12 (SAPLIP 12) und Amoebapore A (AP-A) wurden entweder ohne (-) oder mit (+) je 5 µl PCIIS-Liposomen (10 mg/ml) für 1 h in Küvettenpuffer pH 5,2 inkubiert und anschließend 30 min bei 100 000 x g sedimentiert (siehe 2.17). Der Überstand (ÜS) wurde mittels einer Vakuumzentrifuge konzentriert und ebenso wie die Sedimente (S) mit Probenpuffer versetzt und vollständig auf ein 13%iges Tricine SDS-PA Gel aufgetragen. Die Banden wurden durch Silberfärbung entwickelt.

Wie die Banden in Abb. 13 zeigen, befand sich sowohl SAPLIP 3 als auch die SAPLIP-Domäne 12 in den Ansätzen mit Liposomen fast vollständig im Überstand, während Amoebapore A vollständig im Sediment vorlag. Im Gegensatz zu Amoebapore A lässt sich SAPLIP 3 gar nicht und die SAPLIP-Domäne 12 nur sehr schlecht gebunden an Liposomen sedimentieren. Beispielhaft ist dieses in Abb. 13 für eine Inkubation mit PCIIS Liposomen bei pH 5,2 dargestellt.

Erstaunlich ist, dass sich der größte Proteinanteil von SAPLIP 3 und der SAPLIP-Domäne 12 ohne Liposomen sedimentieren lässt, sich aber mit Liposomen im Überstand befindet. Dieses

könnte auf die Ausbildung von Proteinaggregaten in Lösung zurückgeführt werden, die sich durch die Lipide solubilisieren lassen. Diese Verteilung konnte für die beiden Proteine auch in weiteren Ansätzen detektiert werden, bei denen ein Gemisch aus gleichen Anteilen an Liposomen verschiedenster Zusammensetzungen (stets 10 mg/ml) verwendet wurde. Diese bestanden bis auf reine PCIIS und reine PC Liposomen stets aus PC:X im Verhältnis 3:1, wobei X = Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Sphingomyelin, Cardiolipin und Galaktosylceramid. Auch eine Inkubation bei einem pH-Wert von 4,5 oder 7,0 hatte keinen Einfluss auf die Verteilung. Für das SAPLIP 3 wurde zusätzlich eine Bindung an reine PC/PS und PC/GC Liposomen (im Verhältnis 3:1) bei drei pH-Werten (4,5; 5,2; 7,0) untersucht, aber auch hier ergab sich die gleiche Verteilung.

3.5.2 Porenbildende Aktivität

Eine weitere Eigenschaft der Amoebapores ist die Fähigkeit zur Porenbildung. Deshalb sollte anhand der Freisetzung des in unilamellare Liposomen eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs Calcein die porenbildende Aktivität von SAPLIP 3 und der SAPLIP-Domäne 12 untersucht werden. Eingeschlossen in den Liposomen zeigt dieser Farbstoff den Effekt der Auslöschung ("Quenchings") der Fluoreszenz aufgrund der lokal hohen Konzentration. Erst ihre Verdünnung in die umgebende Lösung durch die Poren bewirkt somit einen messbaren Anstieg der Fluoreszenz. Während der Freisetzung wird die Zunahme der Fluoreszenz in der umgebenden Lösung mittels eines Fluoreszenzspektrometers quantifiziert und kann somit als Maß für die porenbildende Aktivität eines Proteins dienen.

Für den Test wurden Liposomen aus einem an Phosphatidylcholin angereichertem Lipidextrakt aus der Sojabohne (PCIIS) eingesetzt und die Aktivität in Küvettenpuffer bei verschiedenen pH-Werten jeweils über einen Zeitraum von 2 oder 4 Minuten bestimmt (Abb. 14).

SAPLIP 3 ist nicht porenbildend

Für SAPLIP 3 konnte selbst bei einer Konzentration von 1 μM keinerlei porenbildende Aktivität auf diese Weise nachgewiesen werden (Abb. 14). Zusätzlich wurden unilamellare Liposomen der Zusammensetzung PC/PS und PC/GC (Verhältnis 3:1) oder PC/PS/Chol (Verhältnis: 65%/10%/25%) bei saurem bis neutralem pH (pH 4,5; pH 5,2; pH 6; pH 7) verwendet, doch konnte auch hierdurch keine porenbildende Aktivität detektiert werden.

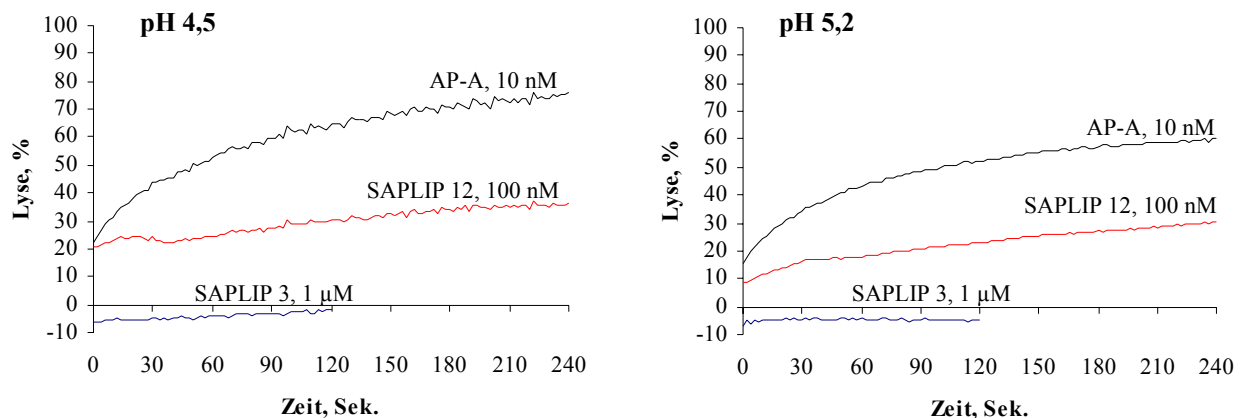


Abb. 14: Freisetzung des in PCIIS-Liposomen eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffs Calcein

Die Lyse von unilamellaren PCIIS-Liposomen durch SAPLIP 3 und die SAPLIP-Domäne 12 (SAPLIP 12) im Vergleich zu Amöbapore A (AP-A) wurde bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Fluoreszenzzunahme verursacht durch die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs nach Porenbildung wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm über 2 oder 4 Minuten alle 2 Sekunden gemessen. Die Berechnung des prozentualen Anteils an lysierten Liposomen erfolgte wie unter 2.18.2 beschrieben. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von experimentellen Dreifachbestimmungen.

Die SAPLIP-Domäne 12 zeigt eine pH-abhängige porenbildende Aktivität

Die SAPLIP-Domäne 12 verursacht bei einer Konzentration von 100 nM einen Anstieg der Fluoreszenz. Es führt also zu einer Freisetzung des in die PCIIS-Liposomen eingeschlossenen Fluoreszenzfarbstoffes. Die Konzentration der SAPLIP-Domäne 12 ist im Vergleich zu Amöbapore A zehnfach höher, aber erreicht nur etwa die Hälfte der Freisetzung (Abb. 14).

Diese Aktivität der SAPLIP-Domäne 12 ist konzentrationsabhängig und nimmt mit sinkendem pH-Wert zu (Abb. 15 A und B). Auch Amöbapore A zeigt eine derartige pH-Abhängigkeit. Im neutralen Bereich konnten für beide Proteine in den eingesetzten Konzentrationen kaum noch Fluoreszenzzunahmen gemessen werden.

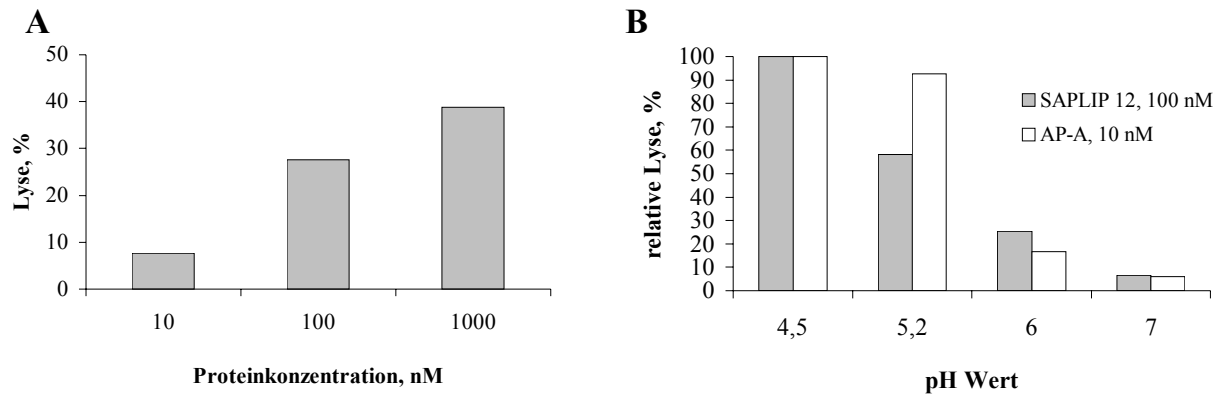


Abb. 15: Konzentrations- und pH-abhängige, porenbildende Aktivität der SAPLIP Domäne 12

Die SAPLIP-Domäne 12 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen bei pH 4,5 (A) oder bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich zu Amöbapore A (AP-A) mit PCIIS-Liposomen inkubiert (B). Die Fluoreszenzzunahme im Vergleich zu einer Negativ- und einer Positivkontrolle wurde jeweils bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm nach 4 Minuten bestimmt. Die Berechnung des prozentualen Anteils an lysierten PCIIS-Liposomen erfolgte wie unter 2.18.2 beschrieben.

Für die pH-Abhängigkeit wurde der prozentuale Lysewert bei pH 4,5 gleich 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der anderen Werte hierauf bezogen, um die relative Lyse zu ermitteln. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von experimentellen Dreifachbestimmungen, nur bei der höchsten Konzentration in (A) dem Mittelwert einer experimentellen Doppelbestimmung.

Das an SAPLIP 6 angereicherte Proteingemisch zeigt schwache porenbildende Aktivität

Das an SAPLIP 6 angereicherte Proteingemisch zeigte im Gegensatz zu einer Negativkontrolle einen leichten Anstieg der Fluoreszenz in Gegenwart von PCIIS Liposomen bei pH 4,5, doch wurde nach 4 Minuten nicht mehr als 10 % Lyse erreicht. Bei pH 5,2 konnte nur noch 6 % Lyse nach 4 Minuten detektiert werden. Dieses kann allerdings nur ein Hinweis darauf sein, dass SAPLIP 6 porenbildend ist, da aufgrund der bakteriellen Fremdproteine nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich darunter ein porenbildendes Protein befindet.

3.5.3 Antibakterielle Aktivität

Eine denkbare Funktion besonders der SAPLIPs mit Amoebapore-ähnlicher Größe ist es, die Amoebapores in ihrer antibakteriellen Aktivität *in vivo* zu unterstützen. Deshalb wurde die antibakterielle Aktivität für SAPLIP 3 ausführlich mittels zwei unterschiedlicher Methoden bestimmt.

3.5.3.1 Mikrosuszeptibilitätstest

SAPLIP 3 ist weder bakteriostatisch noch bakterizid

Für SAPLIP 3 wurde der Mikrosuszeptibilitätstest mit *B. subtilis* und *E. coli* K-12 bei pH 5,2 durchgeführt, um zu testen, ob SAPLIP 3 einen antibakteriellen oder zumindest bakteriostatischen Effekt ausübt. SAPLIP 3 und das Kontrollprotein Melittin wurde in einer maximalen Konzentration von 10 μM eingesetzt. Pro Ansatz wurden je 100 Zellen mit SAPLIP 3 und Melittin in einer Mikrotiterplatte bei 37°C inkubiert und nach 20 und 40 Stunden die Klärung der Vertiefungen bestimmt. Anschließend wurden Aliquots der Zellen auf Agarplatten kultiviert und ausgezählt. Im Gegensatz zu Melittin, für das MIC-Werte von $\text{MIC}_{B. subtilis}$: 0,3 μM bzw. $\text{MIC}_{E. coli}$: 0,6 μM bestimmt werden konnten, verursachte SAPLIP 3 in keinem Ansatz eine Klärung. Es konnte auch keine verminderte Bakterienanzahl auf den Agarplatten gegenüber einer Kontrolle ohne Protein bestimmt werden. SAPLIP 3 übt also weder einen bakteriostatischen noch einen bakteriziden Effekt aus.

3.5.3.2 Fluoreszenzgestützter Membranpermeabilisierungstest

SAPLIP 3 permeabilisiert keine Bakterienmembranen

Dieser Test ist sehr viel sensitiver und erlaubt eine Aussage über den antibakteriellen Mechanismus, nämlich dass Membranschädigung und Lyse zum Absterben der Zellen führen. Bei einer Anregung von 485 nm fluoresziert der eingesetzte Nukleinsäure-Farbstoff im grünen Bereich (Emission: 538 nm), wenn er in die DNA interkaliert. Voraussetzung hierfür ist, dass eine Schädigung der Zellmembran vorliegt und der Farbstoff in die Zelle eindringen kann, denn die Membran von lebenden Zellen kann er nicht passieren. Auf diese Weise wurde der lytische Einfluss des SAPLIP 3 und der SAPLIP-Domäne 12 auf verschiedene gram-negative und gram-positive Bakterien untersucht.

Als gram-negative Bakterien wurden für das SAPLIP 3 *E. coli* K-12, *E. coli* K-12 D31 und *Serratia plymuthica* und als gram-positive Bakterien *B. subtilis* und *B. megaterium* für diesen Test eingesetzt.

Weder für *B. subtilis* noch für *B. megaterium* noch für *E. coli* K-12 D31 konnte mittels dieses Tests antibakterielle Aktivität von SAPLIP 3 bei pH 5,5 nachgewiesen werden. Der Test für *B. subtilis* wurde zusätzlich bei pH 7,4 durchgeführt, jedoch zeigte SAPLIP 3 auch dabei keine Aktivität. Für alle Tests wurde SAPLIP 3 in einer maximalen Konzentration von 2 μM eingesetzt. Gegen *E. coli* K-12 und *S. plymuthica* wurde trotz dieser hohen Konzentration und langer Inkubationszeit nur ein sehr geringer Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Von den *S. plymuthica*-Zellen wurden bei einer Konzentration an SAPLIP 3 von 2 μM , einem pH-Wert von 5,5 und einer Inkubationszeit von 7 Stunden bei 37°C lediglich 6,5 % der Zellen lysiert. Von den *E. coli* K-12 Zellen waren nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37°C mit SAPLIP 3 (2 μM) nur 5 % der Zellen lysiert.

SAPLIP 3 wirkt nicht synergistisch auf die antibakterielle Aktivität von Amoebapore A gegen gram-negative Bakterien

Amoebapore A zeigt gegen gram-negative *E. coli*-Zellen eine geringere Aktivität als gegen gram-positive *B. subtilis* Zellen (Andrä *et al.*, 2003; Bruhn *et al.*, 2003). SAPLIP 3 wurde daher zusammen mit Amoebapore A mit *E. coli* K-12 Zellen inkubiert, um ein mögliches synergistisches Zusammenwirken und dadurch eine Steigerung der Effizienz von Amoebapore A gegen *E. coli* Zellen zu überprüfen. So war eine Konzentration von 1 μM Amoebapore A nötig, um bei pH 5,5 nach 2 Stunden 50 % der Zellen zu lysieren, während für SAPLIP 3 unter den gleichen Bedingungen keine Lyse nachgewiesen werden konnte. In den Ansätzen, die sowohl Amoebapore A als auch SAPLIP 3 (maximale Konzentration je 1 μM) enthielten, konnte keine gesteigerte Aktivität gemessen werden.

Die SAPLIP-Domäne 12 permeabilisiert Membranen von gram-positiven Bakterien

Die antibakterielle Aktivität der SAPLIP-Domäne 12 wurde anhand von *B. megaterium* und *E. coli* K-12 D31 bei pH 5,5 bestimmt. Als Positivkontrolle diente Cecropin B.

Gegen die gram-positiven *B. megaterium*-Zellen erwies sich die SAPLIP-Domäne 12 als antibakteriell, während keine Aktivität gegen die gram-negativen *E. coli* K-12 D31 gemessen werden konnte. Um nach 3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur 50% der *B. megaterium*-Zellen zu lysieren, musste die SAPLIP-Domäne 12 in einer Konzentration von 90 nM eingesetzt werden, während von Cecropin B dafür eine zehnfach höhere Konzentration nötig war (Abb. 16 A). Die SAPLIP-Domäne von SAPLIP 12 zeigt auch einen sehr viel schnelleren kinetischen Verlauf der Membranpermeabilisierung als Cecropin B (Abb. 16B).

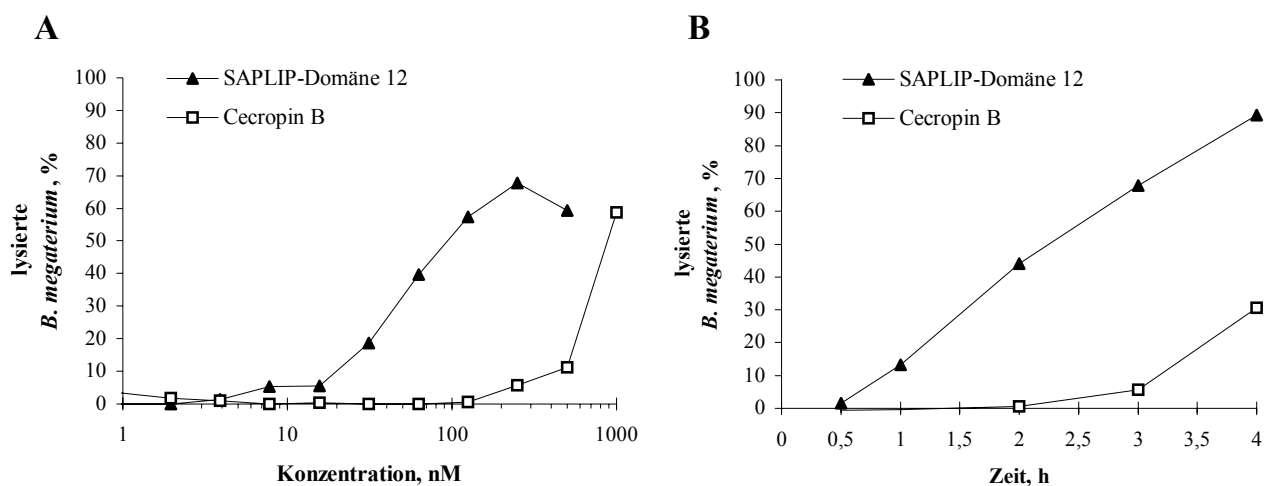


Abb. 16: Vergleich des lytischen Einflusses der SAPLIP-Domäne 12 und des Cecropin B auf die Zellen von *B. megaterium* in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit

A: Zellen von *B. megaterium* ($3,3 \times 10^6$ CFU/ml) wurden mit verschiedenen Konzentrationen der SAPLIP-Domäne 12 (max. 500 nM) und Cecropin B (max. 1 μ M) bei pH 5,5 in Anwesenheit des Sytox Green Nukleinsäure Farbstoffs bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert und die Fluoreszenz (Ex.:485nm / Em.: 538nm) gemessen.

B: Kinetik der durch die SAPLIP-Domäne 12 und Cecropin B (je 250 nM) verursachten Membranpermeabilisierung.

Die Berechnung des prozentualen Anteils der lysierten Zellen erfolgte wie unter 2.19.2 beschrieben. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von experimentellen Dreifachbestimmungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass SAPLIP 3 nicht in der Lage ist, effektiv die getesteten Bakterienmembranen zu schädigen und Bakterien zu töten, während die SAPLIP-Domäne 12 dagegen zur Lyse der gram-positiven Zellen von *B. megaterium*, aber nicht der gram-negativen *E. coli* K-12 D31 in der Lage ist.

3.5.4 Test auf hämolytische Aktivität

Weder SAPLIP 3 noch die SAPLIP-Domäne 12 ist hämolytisch

Um zu testen, ob die Membranen von Erythrozyten, die sich grundlegend von Bakterienmembranen unterscheiden, als Zielstrukturen für SAPLIP 3 oder die SAPLIP-Domäne 12 dienen, wurde zum Nachweis von hämolytischer Aktivität ein einfacher, qualitativer Mikrotiterplattentest durchgeführt. Die Klärung der Suspensionen in den Vertiefungen als Folge der Lyse der Erythrozyten wurde visuell bestimmt. Erythrozyten vom Schaf wurden mit den Proteinen (100 nM) bei Raumtemperatur und pH 5,5 oder pH 7,4 inkubiert, doch konnte auch nach 6 Stunden keine Klärung und damit keine hämolytische Aktivität detektiert werden. Das Hinzufügen von Erythrozyten zu einer Amöbenkultur zeigte, dass sie durchaus auch in der Lage sind, Schafserythrozyten zu phagozytieren.

3.5.5 Liposomeninteraktionen von SAPLIP 3

3.5.5.1 Darstellung mittels Gelfiltration

SAPLIP 3 interagiert mit multilamellaren PS-haltigen Liposomen, bindet aber nicht mit hoher Affinität an diese

Für SAPLIP 3 konnten soweit keine Aktivitäten oder Liposomeninteraktionen, die von den Amöbapores bekannt sind, nachgewiesen werden. Die meisten SAPLIPs weisen in ihren Aktivitäten eine Präferenz für negativ geladene Lipide auf. Um die Interaktion und Assoziation von SAPLIP 3 mit PS-haltigen Lipidmembranen zu untersuchen, wurde das Protein mit Calcein-beladenen, multilamellaren Liposomen (PS/Chol/PC) bei pH 4,5 inkubiert und diese anschließend einer Gelfiltration unterzogen, um sie entsprechend der Größe zu trennen.

In dem Kontrollansatz ohne Protein eluierten die calcein-haltigen Liposomen im Ausschlussvolumen der Säule und das Signal für das freie Calcein trat an der Position des Totalvolumens auf (Abb. 17). Im Gegenteil dazu verschwand das Signal im Ausschlussvolumen nach einer Inkubation der Liposomen mit SAPLIP 3 fast vollständig. Das bedeutet, dass das zuvor in den Liposomen eingeschlossene Calcein durch den Einfluss von SAPLIP 3 fast vollständig freigesetzt wird. Es konnte keine Fluoreszenz in denjenigen

Fraktionen festgestellt werden, die kleineren Vesikeln zuzuordnen sind. SAPLIP 3 konnte mittels SDS-PAGE Analyse nur im Totalvolumen gefunden werden (eingefügtes Bild Abb. 17). Dieses entspricht Molekülen, die nicht an Vesikel gebunden sind.

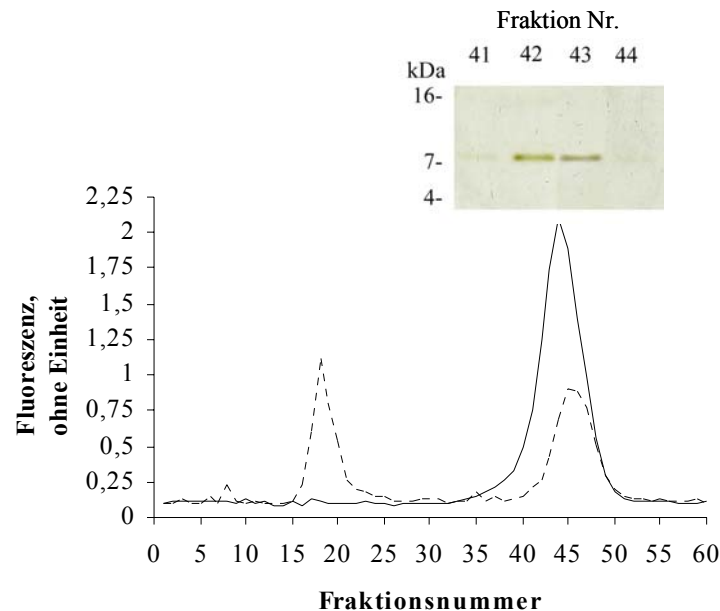


Abb. 17: Graphische Darstellung der fluorometrischen Analyse und SDS-PAGE Analyse der Gelfiltrationsfraktionen

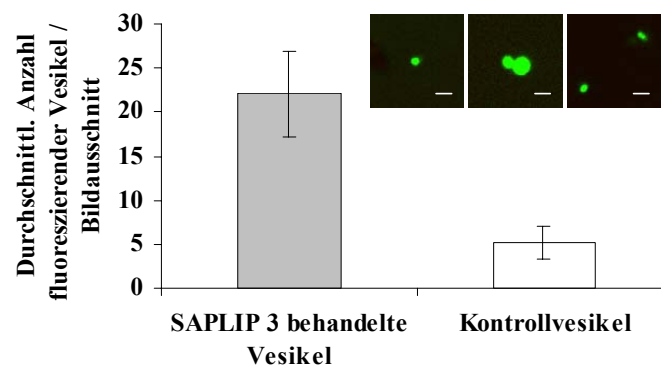
18,6 µg Calcein-beladene, multilamellare Liposomen (10% PS/25% Chol/65% PC) wurden mit oder ohne SAPLIP 3 (15 µg) bei pH 4,5 und 37°C für 2 h inkubiert und anschließend durch Gelfiltration getrennt. Fraktionen von 0,4 ml wurden gesammelt. Die Fluoreszenz von SAPLIP 3-behandelten Liposomenfraktionen (durchgezogene Linie) und Kontrollfraktionen (gestrichelte Linie) ist dargestellt. Pro Fraktion wurde 1/4 des Ausgangsvolumen mittels einer Vakuumzentrifuge konzentriert und auf einem 13%igen Tricine Gel getrennt (eingefügte Abbildung). Die Banden wurden durch Silberfärbung entwickelt.

Da SAPLIP 3 zur Freisetzung des Liposomeninhalts führt und damit also mit den Liposomen interagiert, scheint die zugrunde liegende Bindung ein reversibler Prozess mit einer geringen Affinität oder einer hohen Dissoziationskonstanten zu sein, so dass keine stabile Assoziation mit den Liposomen nach der langandauernden Gelfiltrationsprozedur nachweisbar ist. Diese Schlussfolgerung ist nur gültig, vorausgesetzt, dass die Liposomen nicht vollständig durch die Proteinaktivität aufgelöst wurden, so dass sie Mizellen-ähnliche Größe angenommen haben, da diese ebenfalls im Totalvolumen eluieren würden.

3.5.5.2 Darstellung mittels konfokaler Fluoreszenz-Lasermikroskopie

SAPLIP 3 verursacht einen Austausch des Liposomeninhalts mit der umgebenden Flüssigkeit, wobei anschließend wieder verschlossene Vesikel entstehen können

Zur visuellen Darstellung der Interaktion von SAPLIP 3 mit multilamellaren, PS-haltigen Liposomen wurden diese mit SAPLIP 3 in Gegenwart des fluoreszierenden Farbstoffes Calcein bei pH 4,5 für 2 Stunden inkubiert. Anschließende Zugabe von Cobalt(II)nitrat bewirkte die Auslöschung der Fluoreszenz des freien Calceins infolge der Ausbildung eines nicht fluoreszierenden Calcein-Co²⁺-Komplexes (Kendall und MacDonald, 1982). Als Kontrolle diente ein auf die gleiche Weise behandeltes Versuchsansatz ohne Protein. Bei der Betrachtung dieser Ansätze mittels konfokaler Fluoreszenz-Lasermikroskopie konnte die 4,3-fache Anzahl an fluoreszierenden Vesikeln pro Ausschnitt in dem Ansatz mit SAPLIP 3



im Gegensatz zur Negativkontrolle beobachtet werden (siehe Abb. 18).

Abb. 18: Effekt von SAPLIP 3 auf PS-haltige Liposomen

2,475 µg multilamellare Liposomen bestehend aus PC/PS/Chol (55%/20%/25%) wurden mit SAPLIP 3 (2 µg) bei pH 4,5 in Gegenwart von Calcein bei 37°C für 2 h inkubiert. Freies Calcein wurde anschließend durch Zugabe von Cobaltnitrat komplexiert und die Suspension mittels konfokaler Fluoreszenz-Lasermikroskopie betrachtet. Der Mittelwert und die Standardabweichung von fluoreszierenden Vesikeln in jeweils 16 Bildausschnitten sind aufgeführt. Drei repräsentative Bilder von SAPLIP 3 behandelten Vesikeln sind dargestellt (eingefügte Abbildung). Die Länge der weißen Größenbalken entspricht 2 µm.

Die Inkubation derartiger Liposomen mit SAPLIP 3 führt demnach zu einem Austausch der in den Liposomen eingeschlossenen Flüssigkeit mit der die Liposomen umgebenden. Dabei werden aber gleichzeitig wieder Vesikel gebildet, die den Fluoreszenzfarbstoff einschließen und in die die Cobaltlösung nicht einfach eindringen kann.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass SAPLIP 3 die Liposomenstruktur nicht einfach durch einen Detergenz-ähnlichen Effekt zerstört.

3.5.6 Membranfusionstest

SAPLIP 3 fusioniert bei saurem pH-Wert Liposomen, die Phosphatidylserin enthalten

Zur Untersuchung, ob SAPLIP 3 die Fusion von Liposomen bewirkt, wurde ein Test durchgeführt, der auf der Eigenauslöschung ("self-quenching") der Fluoreszenz von Octadecyl Rhodamin B (R18) nach Einbau in Liposomenmembranen beruht. Fusion solcher Membranen mit unmarkierten Liposomenmembranen resultiert in einer Verdünnung von R18, die von einem Anstieg der Fluoreszenz begleitet ist. Wenn gleiche Mengen von R18-markierten und nichtmarkierten multilamellaren Liposomen (PS/Chol/PC) mit SAPLIP 3 bei pH 4,5 inkubiert werden, nimmt die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle zu (Abb. 19A).

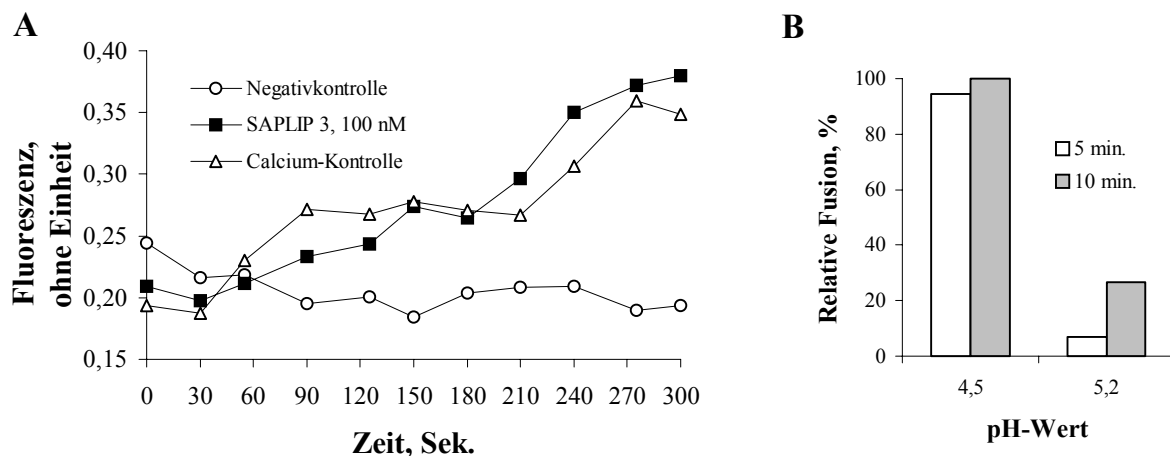


Abb. 19: Graphische Darstellung der durch SAPLIP 3 induzierten Vesikelfusion

A: R18-markierte und unmarkierte multilamellare Liposomen wurden zu gleichen Teilen gemischt und entweder mit Puffer (Negativkontrolle), mit SAPLIP 3 oder mit 5 mM CaCl_2 , gefolgt von 15 mM EDTA (Calcium-Kontrolle) versetzt. Die Fluoreszenzzunahme wurde zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von experimentellen Dreifachbestimmungen.

B: Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität wurde die Fluoreszenz jeweils nach 5 und 10 Minuten gemessen. Die Werte entsprechen der Differenz von absoluter Fluoreszenz und der entsprechenden Negativkontrolle. Der resultierende Wert für 10 Minuten bei pH 4,5 wurde gleich 100 % gesetzt.

Es ist bekannt, dass man Vesikelfusion beobachten kann, wenn Liposomen, die PS enthalten, erst mit Ca^{2+} und dann mit EDTA versetzt werden (Kendall und MacDonald, 1982). Der Anstieg der Fluoreszenz dieses Fusionsereignisses ähnelt dem durch SAPLIP 3 verursachten und unterstützt damit die Schlussfolgerung, dass SAPLIP 3 Fusionsaktivität ausübt.

Dieser Fusionsprozess ist sowohl abhängig vom pH-Wert als auch von der Zusammensetzung der Liposomen. Die Aktivität nimmt stark ab, wenn der pH-Wert von 4,5 auf 5,2 erhöht wird (Abb. 19B). Weder bei pH 7,0 noch, wenn das anionische Lipid Phosphatidylserin durch Phosphatidylcholin ersetzt wurde, konnte Aktivität gemessen werden.

Die SAPLIP-Domäne 12 besitzt keine Liposomen-fusionierende Aktivität

Die Inkubation der SAPLIP-Domäne 12 (500 nM) mit R18-markierten und nichtmarkierten multilamellaren Liposomen (PS/Chol/PC) führte bei einem pH Wert von 4,5 zu keinem Anstieg der Fluoreszenz. Auch bei pH 5,2 und 7,0 oder wenn Phosphatidylcholin statt Phosphatidylserin eingesetzt wurde, konnte keine Aktivität gemessen werden.

3.6 Rekonstitutionsexperiment mit Prosaposin-defizienten Fibroblasten

SAPLIP 3 wirkt nicht unterstützend auf den Glykosphingolipid Katabolismus von humanen Prosaposin-defizienten Fibroblasten

Das humane Saposin C zeigt ebenfalls die Fähigkeit zur Fusion von Liposomen mit anionischen Lipiden und bei saurem pH-Wert (Qi und Chu, 2004; Vaccaro *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2003). Insgesamt gibt es vier humane Saposine, die alle von einem einzigen Vorläuferprotein, Prosaposin, abstammen (Morimoto *et al.*, 1989). Die Saposine werden für die Aktivierung von spezifischen Exohydrolasen benötigt, die in den Abbau von Sphingolipiden in den Lysosomen beteiligt sind. Jedes Saposin zeigt eine spezifische Wirksamkeit für eine bestimmte Hydrolase. Die Defizienz des humanen Prosaposins resultiert in dem Speichern unterschiedlicher Glykosphingolipide in verschiedenen Organen (Sun *et al.*, 2002). Prosaposin-defiziente Fibroblasten zeigen eine Ansammlung von Lipiden, die von Laktosylceramid dominiert wird (Hulkova *et al.*, 2001). Durch die Zugabe von externem Prosaposin zu dem Zellkulturmedium solcher Fibroblasten kann die Lipidansammlung aufgelöst werden (Burkhardt *et al.*, 1997). Die Effekte der einzelnen Saposine auf Prosaposin-defiziente Fibroblasten wurde ebenfalls bestimmt und dabei die Spezifität jedes Saposins für das zugehörige Enzym bestätigt (Sadeghlar *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen, ob auch SAPLIP 3 in der Lage ist, in den Glykosphingolipid Katabolismus von Prosaposin-defizienten Fibroblasten unterstützend einzugreifen, wurden die Zellen für 6 und 30 Stunden in Medium mit SAPLIP 3 (10 µg/ml) inkubiert. Nach der Ernte

der Zellen wurden die Lipide extrahiert und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

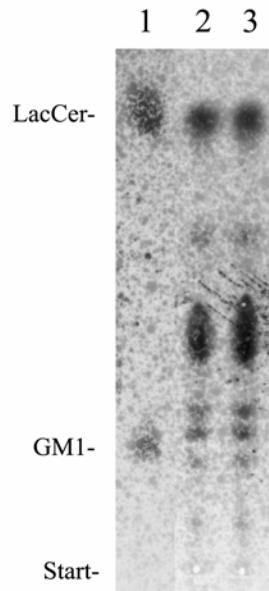


Abb. 20: Analyse des Glykolipidmusters von Prosaposin-defizienten Fibroblasten nach der Inkubation mit SAPLIP 3 mittels Dünnschichtchromatographie

Humane Prosaposin-defiziente Fibroblasten wurden mit (Spur 2) oder ohne (Spur 3) SAPLIP 3 (1,1 μ M) für 6 h inkubiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Ein Gemisch aus Asialo-GM1 Gangliosid (GM1) und Laktosylceramide (LacCer) wurden als Standardlipide eingesetzt. Ein Ausschnitt mit den ausschlaggebenden Lipiden ist dargestellt.

Das Lipidmuster von Fibroblasten, die mit SAPLIP 3 inkubiert wurden, unterscheidet sich nicht von demjenigen der Fibroblasten, die nicht mit SAPLIP 3 inkubiert wurden. SAPLIP 3 ist also nicht in der Lage, den Glykosphingolipid Katabolismus von humanen Prosaposin-defizienten Fibroblasten zu beeinflussen.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Charakterisierung von bisher unbekanntem, Saposin-ähnlichen Proteinen aus *E. histolytica* durch theoretische Sequenzanalysen, Genexpressionsanalyse und die heterologe Expression der Proteine in *E. coli* mit z. T. anschließender funktioneller Analyse verfolgt. Für die SAPLIP-Domäne von SAPLIP 12 wurden ähnliche Aktivitäten wie für die Amöbapores, die antimikrobiellen Effektorproteine von *E. histolytica*, gefunden. Strukturelle und auch funktionelle Eigenschaften von SAPLIP 3 dagegen ähneln dem humanen Saposin C und zeigen, dass bereits in diesem primitiven Einzeller ein SAPLIP mit saposin-ähnlichen membranfusionierenden Aktivitäten existiert.

Sequenzanalysen und Homologievergleiche

Bei der Familie der Saposin-ähnlichen Proteine handelt es sich um eine sehr mannigfaltige Proteinfamilie (Munford *et al.*, 1995). *E. histolytica* weist als primitiver Einzeller mit insgesamt 19 Genen, die für putative SAPLIPs kodieren, eine erstaunlich hohe Anzahl derartiger Gene auf. Im Menschen z. B. sind bis jetzt 7 Gene, die für Vorläuferproteine von 11 funktionellen SAPLIPs kodieren, bekannt (Bruhn, 2005). Obwohl die Mitglieder strukturell durch eine gleiche Proteinfaltung ausgezeichnet sind, ist doch die Fähigkeit mit Lipiden zu interagieren, die einzige funktionelle Übereinstimmung, die sich für die verschiedenen Mitglieder formulieren lässt. Dass die Faltung eine ausreichende Voraussetzung für ein Protein zu sein scheint, um mit Lipiden zu interagieren, wird von dem Beispiel des Proteins Bacteriocin AS-48 aus dem Bakterium *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 unterstützt. Dieses Protein ist kein SAPLIP, da es nicht das charakteristische Cystein-Motiv und damit keine Disulfidbrückenbindungen aufweist, jedoch besitzt es die gleiche Faltung und ist in der Lage, Lipide zu binden und antimikrobielle Aktivität auszuführen (Abriouel *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2000). Neben der generell ähnlichen Faltung führen aber wahrscheinlich jeweils strukturelle Besonderheiten zu den speziellen Lipid- und Membraninteraktionen. Die SAPLIPs weisen abgesehen vom Cystein-Motiv eine hohe Sequenzvariabilität auf, wobei die nicht konservierten Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche eine entscheidene Rolle spielen könnten. Genauere Funktionsvorhersagen aufgrund der Sequenzdaten sind bislang jedoch nicht möglich.

Die große Anzahl an Amöben-SAPLIPs und ihre Sequenzdiversität mit Identitäten z.T. unter 5 % lassen vermuten, dass sie vielfältige und essentielle Aufgaben in der Amöbe übernehmen könnten. Die neuen Amöben-SAPLIPs unterscheiden sich nicht nur in ihren Sequenzen sehr,

sondern auch in ihrer Größe. So sind die meisten größere Proteine, die jeweils eine C-terminal gelegene SAPLIP-Domäne tragen. Auch innerhalb der SAPLIP-Familie findet man sowohl Vertreter, bei denen die SAPLIP-Domäne Teil einer größeren Struktur ist, aber auch Vertreter, bei der die SAPLIP-Domäne als autonome funktionelle Einheit existiert. Beispiele für größere Proteine, die eine SAPLIP-Domäne enthalten, sind die humane saure Sphingomyelinase (Ponting, 1994; Schuchman *et al.*, 1991) und die Acyloxyacyl Hydrolase (Staab *et al.*, 1994) oder auch die pflanzlichen Aspartat-Proteinasen (Simões und Faro, 2004). Innerhalb dieser Enzyme ist die SAPLIP-Domäne eine von mehreren Domänen, die als große Vorläuferproteine synthetisiert werden und zusammen wirken (Ferlinz *et al.*, 1994; Munford und Hall, 1989; Simões und Faro, 2004). Außer zu der SAPLIP-Domäne konnten für die teilweise sehr großen Proteine (bis zu 1009 Aminosäuren) von *E. histolytica* allerdings keine Ähnlichkeiten zu bekannten funktionellen oder strukturellen Domänen in den relevanten Datenbanken gefunden werden. Es gibt zwar für alle bis auf eine Ausnahme klare Signalpeptidvorhersagen, was sie als Proteine des sekretorischen Weges charakterisiert, aber über weitere Reifungsprozesse dieser großen Proteine kann aufgrund der Sequenzanalysen nichts vorhergesagt werden.

Die Tatsache, dass sie also eine bislang einzigartige Domänenzusammensetzung aufweisen, könnte bedeuten, dass diese großen SAPLIPs eigene, vielleicht an besondere Aufgaben in der Amöbe angepasste Funktionen, ausüben und keine ursprünglichen Vorläufer von bekannten SAPLIPs repräsentieren. Strukturelle Vorhersagen für die N-terminalen Bereiche der großen Proteine ergaben, dass 9 der 10 großen SAPLIPs (mit mehr als 600 Aminosäuren) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit "coiled coil"-Strukturen aufweisen, wobei die einzige Ausnahme in SAPLIP 11 besteht (persönliche Mitteilung Frau Dr. Bruhn, Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg). Derartige Strukturen sind häufig in Protein-Protein Interaktionen involviert, so dass auch eine Interaktion der großen SAPLIPs mit anderen Proteinen, aber vor allem auch untereinander denkbar wäre.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass diese SAPLIPs sich evolutionär nicht durchgesetzt haben, sondern ihre Aufgaben von Mitgliedern anderer Proteinfamilien übernommen worden sind. So sind z. B. die Annexine eine Gruppe von membraninteragierenden Proteinen, für die die Suche nach homologen Proteinen in der Genomdatenbank für *E. histolytica* erstaunlicherweise erfolglos blieb, obwohl die Identifikation von Annexin-Genen im Genom von *D. discoideum* oder dem ebenfalls einzelligen Flagellaten *Giardia lamblia* beschrieben wurden (Gerke und Moss, 2002). Die Kernregion der Annexine besteht aus vier oder acht konservierten repetitiven Einheiten von ca. 75 Aminosäuren, die jeweils eine Faltung von fünf

α -Helices aufweisen, wobei diese nicht durch Disulfidbrücken, sondern durch Salzbrücken stabilisiert werden (Barton *et al.*, 1991). Sie können pH-abhängig und Calcium-reguliert Phospholipide binden und zeigen *in vitro* Aktivitäten, wie z. B. Membranbindung, -destabilisierung und -fusion. Für die zellulären Funktionen werden zahlreiche Möglichkeiten diskutiert, wie z. B. eine Beteiligung an Calcium-Signaltransduktionsprozessen, an endo- und exozytotischen Prozessen, aber auch an Protein-Protein Interaktionen und mehr (Gerke und Moss, 2002). In der Amöbe könnten derartige zelluläre Aufgaben teilweise von SAPLIPs erfüllt werden.

Die einzigen SAPLIPs aus *E. histolytica*, deren molekulare Architektur und Funktion bereits aufgeklärt ist, sind die Amoebapores. Diese antimikrobiellen und cytolytischen Proteine bestehen strukturell nur aus der SAPLIP-Domäne. Auf diese Weise sind vier weitere von den neuen SAPLIPs aufgebaut, nämlich SAPLIP 1, 3, 4 und 6 und können daher mit Sicherheit als funktionelle Einheit angesehen werden. Strukturell und den Amoebapores funktionell ähnliche Proteine gibt es auch in anderen Amöbenarten. So hat die sehr eng verwandte, aber apathogene Art *E. dispar* den Amoebapores orthologe Proteine (Nickel *et al.*, 1999) und auch in der für Schlangen pathogenen Art *E. invadens* treten Amoebapore-ähnliche Proteine auf (Dissertation, R. Herbst, 2001). Alle diese Proteine bestehen nur aus der SAPLIP-Domäne und können als antimikrobielle Effektorproteine angesehen werden, die am intrazellulären Töten von Mikroorganismen, hauptsächlich von Bakterien, beteiligt sind, so dass auch für die vier neuen, kurzen SAPLIPs aus *E. histolytica* eine derartige Funktion nahe liegt.

Die Amoebapore-ähnlichen Proteine aus *N. fowleri*, die Naegleriapores, werden in Form von zwei Vorläuferproteinen mit jeweils 3 bzw. 5 SAPLIP-Elementen synthetisiert, die freigesetzt werden und als eigenständige SAPLIPs wirken (Herbst *et al.*, 2004). Eine derartige Organisation ist z. B. auch von den antibakteriellen Peptiden, wie z. B. den Magainins des Frosches bekannt (Terry *et al.*, 1988; Zasloff, 1987) und wird als effizienter Weg zur Bereitstellung einer größeren Menge bzw. Vielfalt an Effektormolekülen angesehen. Da in *E. histolytica* keine Synthese als Vorläuferprotein mit mehreren SAPLIP-Elementen auftritt, ist daher vielleicht die hohe Anzahl an einzelnen SAPLIPs nötig, um eine Ergänzung und Unterstützung der Amoebapores zu erreichen und damit gegen die Vielzahl von Zielzellen dieser unersättlichen, phagozytierenden Zelle ausgerüstet zu sein.

Auch die Saposine und das Surfactant Protein B werden als Vorläuferproteine synthetisiert, wobei dem Prosaposin sogar eigenständige Funktionen zugesprochen werden (Kishimoto *et al.*, 1992; Morimoto *et al.*, 1989; Zaltash und Johansson, 1998). Diese Organisation soll im Laufe der Evolution durch interne Genduplikationen eines

ursprünglichen Gens entstanden sein (Hazkani-Covo *et al.*, 2002). Die hier in *E. histolytica* identifizierten kurzen SAPLIPs könnten also z.T. ursprüngliche Vorläufer der SAPLIPs höherer Organismen darstellen, wie es für die Amoebapores und das NK-lysin und das Granulysin bereits diskutiert wird (Bruhn *et al.*, 2003; Leippe, 1995).

Die große Ähnlichkeit von SAPLIP 1 (Sequenzidentität: 64 %) zu Amoebapore A lässt vermuten, dass es den Amoebapores auch funktionell sehr ähnlich ist. Erstaunlicherweise zeigen die beiden bekannten Isoformen Amoebapore B und Amoebapore C dagegen nur eine Sequenzidentität von 57 % bzw. 48 %. Allerdings fehlt bei SAPLIP 1 das für die pH-abhängige Dimerisierung von Amoebapore A verantwortlich gemachte Histidin (Hecht *et al.*, 2004; Leippe *et al.*, 2005). Diese Dimerisierung wird als Grundlage für die Porenbildung angesehen, so dass ein derartiger Mechanismus für SAPLIP 1 unwahrscheinlich ist. Das Beispiel des NK-lysin und der Amoebapores zeigt allerdings, dass die gleiche Funktion, nämlich die Permeabilisierung von Membranen zum Zwecke des Tötens der Zielzelle, durch einen anderen mechanistischen Hintergrund ausgeübt werden kann (Bruhn *et al.*, 2003).

SAPLIP 3 ist mit 30 % Sequenzidentität zu Amoebapore A den Amoebapores nicht ganz so ähnlich, dafür zeigt es aber eine hohe Sequenzidentität (67 %) zu einem SAPLIP aus der nahe verwandten Art *E. invadens*. Für dieses aus *E. invadens* gereinigte Invapore X konnte *in vitro* antibakterielle Aktivität gegen *B. subtilis*, aber keine porenbildende Aktivität gezeigt werden (Dissertation, R. Herbst, 2001). Neben der hohen negativen Nettoladung (-7), durch die es sich grundlegend von den Amoebapores unterscheidet, ließe also diese Ähnlichkeit zu einem antibakteriellen Protein SAPLIP 3 als einen geeigneten Kandidaten erscheinen, um Amoebapore-ähnliche Funktionen durch einen anderen Mechanismus ausüben zu können. Ein weiterer auffälliger Unterschied zu allen anderen Amöben-SAPLIPs einschließlich des Invapore X ist, dass die Sequenz von SAPLIP 3 ein zusätzliches siebtes Cystein enthält, über das eine Dimerisierung denkbar wäre.

SAPLIP 4 ist mit 27 % Sequenzidentität Amoebapore C am ähnlichsten, das eine hohe cytotoxische Aktivität aufweist (Bruhn *et al.*, 2003). Ähnlich wie die drei Amoebapore-Sequenzen zeigt es keine auffällige Ladungsverteilung und Nettoladung.

SAPLIP 6 dagegen hat, wie SAPLIP 3, eine hohe negative Nettoladung (-7). Die Sequenzidentitäten zu den Amoebapores und den Amoebapore-ähnlichen Proteinen aus den Arten *E. dispar* und *E. invadens* liegen unter 25 %, wobei es Invapore A mit 25 % Sequenzidentität am ähnlichsten ist. Bei SAPLIP 6 handelt es sich also um die am meisten von den Amoebapores abweichende Variante innerhalb der kurzen SAPLIPs.

Interessanterweise konnten SAPLIP 12 und SAPLIP 14 im Phagosom von *E. histolytica* mittels Proteomanalyse identifiziert werden (persönliche Mitteilung Prof. T. Nozaki, "Gunma University Graduate School of Medicine", Maebashi, Japan). Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese SAPLIPs am Phagozytoseprozess beteiligt sind.

Strukturell handelt es sich bei der Domäne von SAPLIP 12 um einen interessanten Vertreter innerhalb der Amöben-SAPLIPs, da dieses die Sequenz mit den meisten geladenen Aminosäuren, nämlich 29, ist und die Nettoladung der Domäne + 5 beträgt. Die Sequenz von SAPLIP 3 dagegen enthält 23 geladene Aminosäuren, wobei das Protein einer der beiden Vertreter mit negativer Nettoladung (-7) ist. Im Vergleich dazu findet man in der Sequenz von Amoebapore A insgesamt nur 18 geladene Aminosäuren, die in einer neutralen Nettoladung resultieren.

E. histolytica stellt einen der primitivsten Organismen dar, in dem SAPLIPs identifiziert werden konnten. Die sich innerhalb dieses Einzelllers bietende Ansammlung von natürlichen SAPLIP-Varianten kann einerseits zur Aufklärung der Funktionen dieser SAPLIPs genutzt werden und damit zum tieferen Verständnis von Vorgängen innerhalb der Amöbe einschließlich derjenigen, die zur Pathogenität des Parasiten führen, beitragen. Andererseits bietet die Charakterisierung von möglichst verschiedenen Varianten die Möglichkeit, Hinweise auf generelle Lipid- und Membraninteraktionen von derartigen Proteinen zu gewinnen.

Genexpressionsanalyse

Bereits im Jahre 2001 zeigte die transkriptionelle Analyse mit genspezifischen Oligonukleotiden für die bis dahin bekannten SAPLIP-Domänen, dass alle zur gleichen Zeit in axenisch kultivierten Trophozoiten exprimiert werden (Bruhn und Leippe, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen der fünf weiteren Gene aus der RNA axenisch kultivierter Trophozoiten bestätigte auch deren Expression.

Um zu untersuchen, ob eine vermehrte Transkription einzelner Gene, also eine Genhochregulierung, durch Kokultivierung von Trophozoiten mit humanen Zellen induzierbar ist, wurden vergleichende transkriptionelle Analysen mittels Mikroarray durchgeführt. *E. histolytica* ist im Gegensatz zur avirulenten Art *E. dispar* in der Lage, eukaryotische Zellen zu töten und zu phagozytieren und leitet damit die invasive, pathologische Lebensphase ein. So konnte auch hier während der Kokultivierung mit der

humanen Kolontumorzelllinie HT-29 mikroskopisch beobachtet werden, dass der ehemalige Zellrasen durch die Amöben aufgelockert und schließlich nach ca. 3-4 Stunden vollständig aufgelöst wurde.

Die Amöben wurden bis zum Einsatz im Versuch axenisch in Medium kultiviert, das keine phagozytische Aufnahme von festen Stoffen erforderte. Falls Prozesse wie Phagozytose oder Cytolyse einer transkriptionellen Regulation unterworfen sind, kann ein vergleichender Ansatz, bei dem die SAPLIP-Gene parallel betrachtet werden, schnell Aufschluss darüber geben, ob eines der SAPLIPs in die cytolytische Reaktion und die Phagozytose eukaryotischer Zellen involviert ist und somit als Hinweis für die funktionelle Analyse dieses Proteins dienen. Es zeigte sich allerdings, dass lediglich für das Amoebapore A Gen eine vermehrte Transkription nachgewiesen werden konnte, wobei diese nur knapp einer zweifachen Hochregulierung entsprach und sich damit im unteren Bereich einer nachweisbaren Regulation bewegt. Daneben gibt es keine dramatischen Unterschiede in den Transkriptionsprofilen der hier betrachteten SAPLIP-Gene nach dem Kontakt, der Cytolyse und der Phagozytose von humanen Zellen. Einerseits könnte der Grund hierfür sein, dass kein weiteres SAPLIP daran beteiligt ist, es wäre aber auch möglich, dass diese Gene nicht der transkriptionellen Regulation unterliegen, da sie für Proteine kodieren, die z. B. essentiell an endozytotischen Prozessen beteiligt sind.

So gehören die Amoebapores zum antimikrobiellen Arsenal der Amöbe und wirken mit bei dem Töten phagozytierter Bakterien (Leippe *et al.*, 1994b). Die Transkriptionsanalysen mittels Northern-Blots nach Stimulation der Amöben mit Bakterien zu verschiedenen Zeitpunkten zeigte, dass keine wesentlichen Änderungen im Transkriptionsprofil auch zu sehr frühen Zeitpunkten auftreten (Andrä *et al.*, 2003). Dieses wird dadurch begründet, dass die Trophozoiten unter natürlichen Bedingungen nie ohne Bakterien in ihrer Umgebung sein würden und sie deshalb für ihre unersättliche phagozytierende Aktivität die ständige Präsenz dieser antibakteriellen Proteine benötigen (Andrä *et al.*, 2003).

Die cytolytische Aktivität und als Folge davon die Invasion in die Darmwand dagegen stellt keinen festen Bestandteil des Lebenszyklus von *E. histolytica* dar, sondern sind fakultativ, so dass die Amöben hierfür eine Regulierung auf RNA-Ebene benötigen könnten.

Es gibt mehrere Beispiele, die zeigen, dass *Entamoeba* mit transkriptioneller Regulation auf bestimmte physiologische Bedingungen antwortet, wie z. B. Enzystierung, Sauerstoff ausgesetzt zu sein, Hitzestress und nach der Leberinvasion (Akbar *et al.*, 2004; Bruchhaus *et al.*, 2002; Eichinger, 2001b). Eine Hochregulierung des Amoebapore A Gens wurde kürzlich ebenfalls im Zusammenhang mit der pathogenen

Lebensweise mittels Mikroarrays, die zufällige Genfragmente enthielten, gezeigt (Debnath *et al.*, 2004). Diese Untersuchungen bezogen sich darauf, welche Gene nach einer Stimulation der Amöben mit humanem Kollagen Typ I und Ca^{2+} reguliert werden. Kollagen ist Hauptbestandteil der epithelialen Basallamina und der extrazellulären Matrix des Darms und stimuliert die Amöben zu einer die Zerstörung der Darmwand nachahmenden biochemischen Kaskade. In einer weiteren Arbeit wurde mittels "Differential-Display-Reverse-Transcription-Polymerase"-Kettenreaktion und Northern-Blot Analyse eine Hochregulierung des Amoebapore C Gens nach der gleichen Stimulation identifiziert (Debnath *et al.*, 2005). Eine Hochregulierung der Amoebapore-Gene ist durchaus naheliegend, denn es ist bekannt, dass sie einen essentiellen Anteil zu dem cytolytischen Potential der Amöbe beitragen. So konnte gezeigt werden, dass die Amoebapores humane Zellen *in vitro* töten können (Berninghausen und Leippe, 1997; Leippe *et al.*, 1994a). Außerdem unterdrückt die Inhibition der Amoebapore A Synthese durch Produktion von spezifischer antisense RNA in lebenden Amöben das Töten von Wirtszellen (Bracha *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 2003).

Wie sich im Falle der Kollageninduktion inzwischen herausstellte, ist eine Interaktion von zwei Stunden für die maximale RNA-Synthese optimal (Debnath *et al.*, 2005). Die hier getestete RNA wurde nach sechs Stunden geerntet, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Werte bereits in die Abklingphase einer Hochregulierung fallen.

Mittels dieser Versuche konnte also kein weiteres SAPLIP identifiziert werden, dessen Transkriptionsniveau ansteigt und für das aufgrund dieses Ergebnisses geschlossen werden könnte, dass es an der Cytolyse der humanen Zellen beteiligt ist und damit zur Pathogenität von *E. histolytica* beiträgt.

Falls doch eine Regulation während dieses Prozesses vorliegt, wäre es auch möglich, dass die Menge an SAPLIPs nicht durch die Transkriptmenge reguliert wird, sondern hauptsächlich auf Translationsebene oder post-translational z. B. über die Stabilität der Proteine *in vivo*. Eine weitere Möglichkeit, nämlich die Regulation auf post-transkriptioneller Ebene in Abhängigkeit von den 5'-nichtkodierenden Bereichen, wurde für das ribosomale Protein L21 von *E. histolytica* beschrieben (Moshitch-Moshkovitch *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse der hier dargestellten Analysen können insgesamt lediglich als Tendenz angesehen werden. Die externen Kontrollen zeigten zwar, dass durch diese Analysen prinzipiell Regulationen identifiziert werden können, doch müssten für gesicherte Ergebnisse sicher weitere Bedingungen für die Amöbengene optimiert, die Anzahl der

Versuchswiederholungen erhöht und weitere Zeitpunkte betrachtet werden. Interne Kontrollen durch weitere sogenannte "house-keeping" Gene, nämlich Gene, die sich auch bei veränderten Bedingungen durch stabile Transkription auszeichnen, standen für diese Analysen nicht zur Verfügung. Aktin gilt zwar als Kontrollgen und wird zur Normalisierung eingesetzt (Akbar *et al.*, 2004; Debnath *et al.*, 2005; Debnath *et al.*, 2004), doch hier konnte eine Tendenz zur Hochregulierung festgestellt werden, was eine Folge der vermehrten Phagozytoseaktivität sein könnte. Da diese Untersuchungen aber hauptsächlich zu Hinweisen führen sollten, aus denen man auf mögliche Funktionen der einzelnen SAPLIPs in der Amöbe schließen könnte, um die Aktivitätstests entsprechend auszurichten, wurde auf weitere zeitaufwendige optimierende Versuche verzichtet.

Molekulare Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung der SAPLIP-Domänen

Es wurde ein "Expressionsscreening" in *E. coli* mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporterprotein etabliert, das einen schnellen Überblick über den Erfolg der Klonierung und gleichzeitig auch eine Aussage über die Expressionsrate erlaubt und sich damit für die parallele Klonierung von einer Vielzahl von Fragmenten eignet. Dieses war von besonderer Bedeutung, da die rekombinante Expression von Amöbapore-ähnlichen Proteinen bisher nicht möglich war.

Aufgrund der speziellen Klonierungsstrategie kann das GFP nur transkribiert werden, wenn durch erfolgreiche Ligation ein Fragment, das dazu noch kein Stop-Kodon tragen darf, zwischen das zukünftige Start-Methionin und das GFP eingefügt worden ist. Durch Anregung der bakteriellen Transformationskolonien mit UV-Licht fluoreszierten derartige Klone grün, eine Folge der Hintergrundexpression des GFP-Fusionsproteins. Damit reduzierte sich die Zahl der zu überprüfenden Klone enorm und alle ursprünglich gefundenen SAPLIP-Domänen und Amöbapore B konnten auf diese Weise kloniert werden. Durch diese Vorauswahl konnte auch gleichzeitig überprüft werden, ob ein Fusionsprotein überhaupt exprimiert wurde, denn ansonsten hätte die Bakterienkolonie nicht fluoresziert. Die Transformationsplatten mit entsprechenden Kolonien wurden bei 4°C gelagert, um einerseits das weitere Bakterienwachstum zu minimieren, andererseits die für die Fluoreszenz des GFP nötige autokatalytische Zyklisierung des Chromophors und anschließende Oxidation zu erreichen, was bei 22°C durchschnittlich 4 Stunden dauert (Heim *et al.*, 1994). Doch wenn diese zeitabhängigen Schritte erfolgreich sind, dann ist nur sehr wenig Protein nötig, um eine

Bakterienkolonie als fluoreszierend zu detektieren. Somit bedeutete eine grüne Kolonie auf der Transformationsplatte nicht in jedem Fall, dass das Protein von den *E. coli*-Zellen auch in zur Reinigung ausreichender Menge in Kultur synthetisiert wird, wie es das Beispiel von SAPLIP 1 oder Amoebapore B zeigt. Für die visuelle Beurteilung der Transformationskolonien mussten entsprechende *E. coli*-Zellen, deren Promotor nicht induzierte Expression zuließ, verwendet werden, da bei starker Expression die Induktion durch IPTG das Wachstum ansonsten vollständig verhindert hätte. Für eine große Proteinausbeute in Kultur ist es, gerade für antibakterielle Proteine, von Nutzen, wenn so wenig Protein wie möglich vor der eigentlichen Induktion produziert wird, damit die *E. coli*-Zellen ungestört wachsen können. Erst durch Induktion soll hier das gesamte Potential der Zellen in die Synthese des rekombinanten Proteins geleitet werden. Eine Inkubationstemperatur von 37°C wäre für die T7-RNA-Polymerase optimal gewesen, hat aber eine Synthese vom GFP unlöslich, in Form von "Inclusionbodies", zur Folge (Fukuda *et al.*, 2000). Dieses hätte die Synthese der Fusionsproteine vollständig ins unlösliche verschoben und somit anschließend eine Rückfaltung nach sich gezogen, die ein aufwendiger Prozess sein kann. Deshalb wurden die Expressionen bei Raumtemperatur durchgeführt, doch auch hierbei zeigte sich, dass es zu einer starken Überexpression der Fusionsproteine kommt, die fast immer dazu führte, dass die Faltung nicht schnell genug erfolgen kann und somit die Fusionsproteine zu einem größeren Teil unlöslich synthetisiert wurden.

Seit einigen Jahren schon wurde ohne Erfolg versucht, die Amoebapores rekombinant zu exprimieren. Dass Amoebapore A und C auch mittels dieses Systems nicht exprimiert werden können, lässt sich daraus schließen, dass diese Gene nicht in den Expressionsvektor kloniert werden konnten, es also keine grünen Kolonien gab. Um so erstaunlicher, dass dieses für Amoebapore B möglich war. Allerdings erforderte die Synthese besondere *E. coli*-Zellen und auch dann erfolgte sie ausschließlich unlöslich mit geringer Ausbeute. Wahrscheinlich ist dieses auf einen Schutzmechanismus der Bakterien vor den antibakteriell wirkenden Amoebapores zurückzuführen.

SAPLIP 1 ähnelt den Amoebapores in dieser Hinsicht und konnte zwar kloniert werden, war mit diesem System aber nicht exprimierbar.

Die Expression von SAPLIP 3 und SAPLIP 6, die auch wie die Amoebapores nur die SAPLIP-Domäne als funktionelle Einheit besitzen, war dagegen möglich.

SAPLIP 3 ließ sich mit einer vielversprechenden Ausbeute löslich exprimieren, was die Grundlage für die Reinigung und die anschließenden funktionellen Tests bildete.

Auch SAPLIP 6 zeigt im Western-Blot ein prominentes Signal in der löslichen Fraktion, allerdings auch noch mindestens ein weiteres etwa gleichstarkes Signal kleinerer Größe.

Die Sequenz von SAPLIP 6 enthält 8 Methionine zusätzlich zum eigentlichen Startmethionin. Diese stellten sich bei der Expression als Problem dar, da zusätzlich zu dem Fusionsprotein in erwarteter Größe auch kleinere Nebenprodukte von den *E. coli*-Zellen synthetisiert wurden. Von den insgesamt 8 zur Verfügung stehenden Basentriplets, die für Methionine kodieren, könnten theoretisch 3 zum zusätzlichen Translationsstart dienen, da in der Sequenz von SAPLIP 6 Teile von Shine-Dalgarno Sequenzen vorgelagert sind. Die resultierenden, verkürzten Fusionsproteine wären demnach 6-7 kDa kleiner im Gegensatz zum vollständigen, was gut mit der detektierten Größe der Signale im Western-Blot mit Anti-His Antikörpern übereinstimmt. Ein gezielter Einfluss, um nur die Synthese des gesamten Fusionsproteins zu fördern, war nicht möglich. Die Ausbeute an vollständigem Fusionsprotein, gemessen an dem Signal im Western-Blot, schwankte von Ansatz zu Ansatz. Trotzdem wurde eine Reinigung des SAPLIP 6 verfolgt, die aber lediglich zu einem an SAPLIP 6 angereicherten Proteingemisch führte, das schwache porenbildende Aktivität zeigte. Wegen der bakteriellen Fremdproteine kann diese porenbildende Aktivität aber nicht eindeutig SAPLIP 6 zugesprochen werden.

Die SAPLIP-Domäne von dem im Phagosom detektierte Protein SAPLIP 12 (persönliche Mitteilung Prof. T. Nozaki, "Gunma University Graduate School of Medicine", Maebashi, Japan) ließ sich ebenfalls mit guter Ausbeute exprimieren, so dass auch mit diesem gereinigten Protein Aktivitätstests durchgeführt werden konnten.

Aufgrund der Synthese der rekombinanten Proteine als Fusionsproteine mit GFP konnte die Fluoreszenz des GFPs auch ausgenutzt werden, um die Proteine während der Reinigung schnell zu detektieren. Da keine Aktivität der Proteine bekannt war, konnte damit eine Vorauswahl für die eindeutige Identifizierung der relevanten Reinigungsfraktionen mit Fusionsprotein getroffen werden. Die genaue Detektion erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit Anti-His-Antikörpern oder Anti-GFP-Antikörpern.

Da die klonierten SAPLIP-Domänen nur ca. $\frac{1}{4}$ des Fusionsproteins ausmachten, nahmen ihre Eigenschaften keinen großen Einfluss auf die Reinigungsstrategie des Fusionsproteins, so dass die Bedingungen bis zur Abtrennung des GFP auf alle löslichen Fusionsproteine anwendbar sind. Die Freisetzung der SAPLIPs oder der SAPLIP-Domänen durch die Endoprotease Igase stellte sich als zeitaufwendiger Schritt heraus. Die spezifische enzymatische Reaktion der Igase führte dazu, dass lediglich zwei Prolinreste am C-Terminus

des SAPLIPs oder der SAPLIP-Domäne verblieben. Da sich durch die Klonierungsstrategie bereits 3 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus und 2 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus befanden, war dieses von Vorteil. Allerdings war die Effizienz der Igase äußerst gering. Trotz verschiedener Versuche die Bedingungen nach Rücksprache mit dem Hersteller zu optimieren, wie z. B. Einsatz möglichst konzentrierter Fusionsproteinlösungen und dem Zusatz von Glycerin (Dissertation, M. Lewinska, 2002), konnte keine zufriedenstellende Verbesserung erzielt werden. Die Inkubation zog sich über viele Tage bei einer Temperatur von 37°C hin. Bedingungen, die für andere, weniger stabile Proteine sicher undenkbar wären. Immerhin erwies sich das Enzym als sehr spezifisch, wie sich durch die massenspektrometrische Analyse des SAPLIP 3 herausstellte.

Die weiteren Schritte erfolgten in Anlehnung an die Reinigung der Amöbapores (Andrä *et al.*, 2003). Es wurde die hohe Stabilität der SAPLIPs gegenüber Säuren ausgenutzt, indem die Ansätze stark angesäuert wurden. Diese Ansäuerung führte bei vielen *E. coli*-Proteinen einschließlich des abgetrennten GFPs zur Denaturierung, so dass ein Teil durch Zentrifugation entfernt werden konnten. Die anschließende Fraktionierung mittels einer hydrophoben Matrix diente einerseits der weiteren Reinigung, aber auch der Konzentrierung der Probe, um sie abschließend mittels Chromatographie an Umkehrphasen zu reinigen. Die Konzentration an hydrophoben Elutionsmittel variierte für jedes SAPLIP je nach Anteil hydrophober Aminosäuren.

Amöbapore-ähnliche Aktivitäten der SAPLIP-Domäne 12

Aufgrund der nicht eindeutigen Sequenzdaten der N-terminalen Bereiche der SAPLIPs im frühen Stadium des Genomsequenzierungsprojektes, orientierte sich die Länge der zu klonierenden SAPLIP-Sequenzen an der Länge der matura Amöbapore-Proteine und entsprach, wie sich im Laufe der fortschreitenden Genomsequenzierungen herausstellte, im Falle des SAPLIP 12 lediglich der Sequenz der SAPLIP-Domäne und nicht der Sequenz des gesamten Proteins. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese SAPLIP-Domäne nur als Teil des gesamten Proteins (857 Aminosäuren) seine volle Funktion in der Amöbe ausübt. Andererseits könnte es aber auch ein Vorläuferprotein darstellen, aus dem nach Prozessierung die SAPLIP Domäne als funktionelle Einheit hervorgeht, so wie es z. B. bei den Swaposinen der pflanzlichen Aspartat-Proteinasen diskutiert wird. Diese Domänen werden proteolytisch freigesetzt und sind nicht Teil des matura Enzyms, doch soll ihnen eine Aufgabe bei der Abwehr gegen Pathogene zukommen (Egas *et al.*, 2000).

Auch wenn also keine eindeutige funktionelle Einordnung möglich ist, so können die *in vitro* Aktivitäten der SAPLIP-Domäne vergleichende mechanistische Rückschlüsse zulassen.

Im Gegensatz zu den Amoebapores lässt sich die SAPLIP-Domäne 12, wie SAPLIP 3, nicht an Liposomen gebunden sedimentieren. Der Nachweis einer Bindung von anderen SAPLIPs, neben den Amoebapores, an Liposomen durch Inkubation und Zentrifugation findet man in der Literatur nur wenig. Lediglich von den humanen Saposinen sind derartige Untersuchungen bekannt, wobei die Fähigkeit zur Bindung an Liposomen ebenfalls variiert und stark abhängig ist von Bedingungen wie der Lipidzusammensetzung der Liposomen und dem pH-Wert, aber auch von der Größe der Liposomen und dem Verhältnis von Lipid zu Protein (Ciaffoni *et al.*, 2001; Tatti *et al.*, 1999; Vaccaro *et al.*, 1999).

Mit Liposomen gleicher Zusammensetzung konnte allerdings porenbildende Aktivität der SAPLIP-Domäne 12 nachgewiesen werden, so dass einerseits die Parameter für den Nachweis einer Bindung an Liposomen nicht optimal gewesen sein könnten, andererseits könnte es ein Hinweis sein, dass nur eine Bindung mit geringer Affinität auftritt. Die Lyse der Liposomen ist bei weitem nicht so effektiv, wie die für Amoebapore A gemessene, so dass die Freisetzung des in den Liposomen eingeschlossenen Farbstoffs auf einem anderem mechanistischem Hintergrund basieren könnte. Für Amoebapore A ist bekannt, dass es zu stabilen Poren mit Inonenkanal-ähnlichen Eigenschaften in Membranen führt (Gutsmann *et al.*, 2003; Leippe und Müller-Eberhard, 1994). Der Porenbildung soll eine pH-abhängige Dimerisierung als Folge von elektrostatischen Interaktionen der Monomere zugrunde liegen, deren anschließende Oligomerisierung zu einer Pore führen soll. Das Innere der Pore wird demnach von den hydrophilen Resten ausgekleidet und die hydrophoben Reste liegen auf der Außenseite (Hecht *et al.*, 2004; Leippe *et al.*, 2005). Diese Vorstellung stimmt gut mit der Annahme überein, dass die Porenbildung der Amoebapores nach dem "barrel stave"-Modell abläuft. Dieses für antimikrobielle Peptide, wie z. B. das Alamethicin, angenommene Modell beschreibt eine Ansammlung von Proteinmoleküle, die wie die Dauben eines Fasses in die Membran inserieren und zwar so orientiert, wie für Amoebapore A oben beschrieben (Brogden, 2005; Reddy *et al.*, 2004; Shai, 1999; Oren und Shai, 1998).

Im Gegensatz zur SAPLIP-Domäne 12 mit einer positiven Nettoladung von +5 hat Amoebapore A eine neutrale Nettoladung. Wie das strukturelle Modell verdeutlicht, weist die SAPLIP-Domäne 12 prominente positiv geladene Bereiche auf der Oberfläche auf, während dieses bei Amoebapore A nicht der Fall ist (Abb. 21). Vom NK-lysin und Granulysin ist eine positiv geladene Proteinoberfläche bekannt, wobei diese bei beiden Proteinen wesentlich ausgeprägter ist (Bruhn und Leippe, 1999; Hecht *et al.*, 2004). Trotzdem wäre es denkbar,

dass diese positiv geladenen Regionen von der SAPLIP-Domäne 12, wie für NK-lysin und Granulylin postuliert, mit den negativ geladenen Phospholipidköpfen der Membranen interagieren und letztendlich zur Störung der Struktur der Lipiddoppelschicht und deren Durchlässigkeit führen (Anderson *et al.*, 2003; Clayberger und Krensky, 2003; Miteva *et al.*, 1999; Ruyschaert *et al.*, 1998).

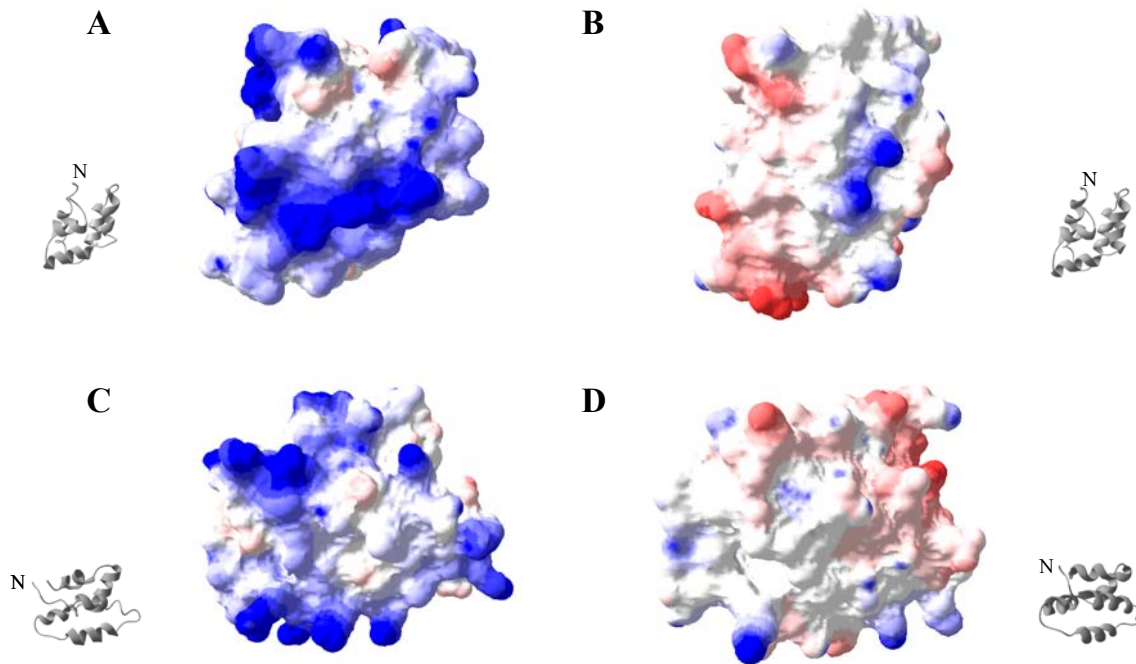


Abb. 21: Verschiedene Ansichten der molekularen Oberflächen eines strukturellen Modells der SAPLIP-Domäne 12 und Amoebapore A gefärbt in Abhängigkeit von ihrem elektrostatischen Potential

Jeweils zwei verschiedene Ansichten eines strukturellen Modells der SAPLIP-Domäne 12 (A + C) und der dreidimensionalen Struktur von Amoebapore A (B + D) sind bezüglich der Orientierung des Proteingrundgerüsts gleich dargestellt, wie durch die Schleifendarstellungen verdeutlicht. Rote Färbung bezeichnet ein negatives, blaue Farbe ein positives Potential und weiß sind die unpolaren Reste dargestellt.

Bakterien stellen durch ihre negativ geladenen Membranen geeignete Zielstrukturen für derartige Interaktionen dar. Solch ein Mechanismus wird daher auch für einige lineare, kationische, antibakterielle Peptide, wie z. B. für das Dermaseptin (Pouny *et al.*, 1992) oder die Cecropine (Gazit *et al.*, 1995) diskutiert und als "carpet"-Modell bezeichnet. Peptidmonomere bedecken aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen die Membran wie ein Teppich. Wird lokal eine kritische Schwellenkonzentration der Peptide überschritten, kommt es zur ungeordneten Auflösung der Lipiddoppelschicht, ähnlich dem Effekt eines Detergens. Es wird angenommen, dass dieses durch eine Umorientierung der hydrophilen Reste in Richtung des hydrophoben Kerns der Membran kommt, was zur Störung der natürlichen Membrankrümmung, eventuell verbunden mit der Bildung von Micellen, führt

und letztendlich zur Auflösung der Membranstruktur (Brogden, 2005; Reddy *et al.*, 2004; Shai, 1999; Oren und Shai, 1998).

Ähnlich wie bei Amoebapore A ist die porenbildende Aktivität der SAPLIP-Domäne 12 pH-abhängig und nimmt mit steigendem pH-Wert ab. Für die pH-Abhängigkeit von Amoebapore A wird die Protonierung des einzigen Histidin-Restes verantwortlich gemacht, da nur so die auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen Histidin (H75) und einem negativ geladenen Aspartatrest (D63) beruhende Dimerisierung erfolgen kann (Hecht *et al.*, 2004; Leippe *et al.*, 2005). Nun weist auch die SAPLIP-Domäne 12 einen Histidinrest auf, der sich allerdings an anderer Position (H57) befindet. Die Modellierung der Struktur der SAPLIP-Domäne 12 auf Grundlage der Amoebapore A Struktur deutet darauf hin, dass dieses Histidin nach außen gerichtet, also dem Lösungsmittel zugewandt ist und damit für eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Proteinmolekülen oder mit den Lipiden zur Verfügung stünde. Im Gegensatz zu Amoebapore A nimmt die Aktivität der SAPLIP-Domäne 12 allerdings schon zwischen pH 4,5 und pH 5,2 stark ab. Daher könnten auch die Protonierungszustände der Glutamatreste als Erklärung für die pH-Abhängigkeit in diesem Bereich herangezogen werden. Die theoretische Analyse ihrer pK_a -Werte unter Berücksichtigung aller paarweisen elektrostatischen Wechselwirkungen im Strukturmodell mit dem PCE ("protein continuum electrostatics") web service (Miteva *et al.*, 2005) zeigte, dass die pK_a -Werte der Glutamatreste Glu-13, Glu-33 und Glu-70 im Modell zwischen pH 5 und 6 liegen, während der eines isolierten Glutamatrestes typischerweise bei einem pH-Wert von ca. 4,4 zu erwarten wäre. Diese nicht-protonierten, negativ geladenen Glutamatreste oberhalb von pH 5 könnten teilweise die positiven Ladungen neutralisieren, was demnach in einer schlechteren Membraninteraktion resultieren könnte. Andererseits könnte es auch sein, dass alle Reste protoniert sein müssen, um die Hydrophobizität des Proteins zu erhöhen und dadurch erst eine Membraninteraktion möglich zu machen, wie z. B. für das humane Saposin C gezeigt (de Alba *et al.*, 2003).

Diese Aktivitätszunahme der SAPLIP-Domäne 12 bei saurem pH-Wert könnte ein Hinweis auf eine Lokalisation in sauren Vesikeln darstellen. Allerdings konnten bei der Reinigung der Amoebapores keine weiteren porenbildenden Proteine detektiert werden. Zum einen ist nicht bekannt, in welchen Mengen und welcher Größe das natürliche SAPLIP 12 in der Amöbe auftritt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine wesentlich höhere Konzentration von der SAPLIP-Domäne 12 im Gegensatz zu Amoebapore A für eine vergleichbare Aktivität notwendig ist. Es ist also gut möglich, dass es aufgrund der geringen Menge und Effizienz, mitbegründet durch vielleicht nicht optimale Bedingungen für den Aktivitätsnachweis für die

SAPLIP-Domäne 12, nicht detektiert wurde. Andererseits ist es möglich, dass dieses SAPLIP als großes Protein mit C-terminaler SAPLIP-Domäne unter natürlichen Bedingungen in der Amöbe vorliegt, so dass es während der extrem sauren Extraktion, die bei der Reinigung der Amöbapores durchgeführt wird, ausfällt (Leippe *et al.*, 1991).

Die SAPLIP-Domäne 12 zeigt antibakterielle Aktivität, wobei allerdings nur die Lyse von gram-positiven *B. megaterium* Zellen und nicht von gram-negativen *E. coli* K-12 D31 Zellen detektiert werden konnte. Gegen die *B. megaterium* Zellen war die SAPLIP-Domäne 12 im direkten Vergleich 10-fach effektiver als das antimikrobielle Peptid Cecropin B, von dem allerdings auch bekannt ist, dass es gram-negative Bakterien sehr viel besser lysiert als gram-positive (Hancock, 2001). Amöbapore A dagegen ist ebenfalls sehr viel weniger aktiv gegen gram-negative *E. coli*-Zellen als gegen gram-positive Zellen, wie z. B. *B. subtilis* (Andrä *et al.*, 2003; Bruhn *et al.*, 2003). Dieses beruht wohl darauf, dass gram-negative Bakterien durch ihre äußere Membran den Amöbapore-Molekülen eine zusätzliche Barriere entgegen setzen, die überwunden werden muss, damit sie zu ihrer eigentlichen Zielstruktur, der cytoplasmatischen Membran, gelangen (Leippe *et al.*, 1994b). Amöbapore A kann deshalb die *E. coli* Mutante K-12 D31, die einen Defekt in der Länge des LPS aufweist (Boman *et al.*, 1974), besser lysieren als *E. coli*-Zellen ohne diesen Defekt, doch liegen hier die Werte ebenfalls etwa 200-fach höher als für gram-positive *B. subtilis* (Andrä *et al.*, 2003). Für die Aktivitätsbestimmung der SAPLIP-Domäne 12 wurde zwar diese *E. coli* Mutante eingesetzt, trotzdem war eine maximale Konzentration von 2 μM nicht ausreichend, um eine Lyse nachzuweisen. Aufgrund des beobachteten starken Abfalls der porenbildenden Aktivität bei pH 5,2 wäre es möglich, dass ein niedrigerer pH-Wert als hier in den antibakteriellen Test eingesetzt (pH 5,5), eine Steigerung der Aktivität nach sich ziehen würde.

Die SAPLIP-Domäne 12 ähnelt funktionell den Amöbapores, da sie porenbildende und antibakterielle Aktivität bei saurem pH-Wert zeigt. Strukturelle Unterschiede, nämlich das Vorhandensein von positiven Ladungsanhäufungen auf der Proteinoberfläche der SAPLIP-Domäne 12 im Gegensatz zu den Amöbapores und das Fehlen des für die Aktivitäten des Amöbapore A essentiellen Histidinrestes an entsprechender Stelle in der Aminosäuresequenz, führen zu der Annahme, dass diese Aktivitäten auf einem anderen mechanistischem Hintergrund basieren.

Sapoin C-ähnliche Charakteristika des SAPLIP 3

Die wahrscheinlichste Funktion von SAPLIP 3, nämlich das antimikrobielle Arsenal der Amöbe gegen Mikroorganismen zu erweitern, konnte nicht bestätigt werden, da weder Aktivität gegen gram-positive noch gegen gram-negative Bakterien festgestellt werden konnte. Von einigen antimikrobiellen Peptiden, wie z. B. dem Magainin und dem PGLa vom Frosch (Matsuzaki *et al.*, 1998), ist bekannt, dass sie synergistisch wirken. Dieses wird als Möglichkeit diskutiert, die Peptidkonzentration für das effektive Töten eines Mikroorganismus möglichst gering zu halten (Yan und Hancock, 2001). Diese Strategie wäre sicher auch für die antimikrobielle Aktivität von Amoebapore A gegen gram-negative Bakterien denkbar, da Amoebapore A für die Lyse von gram-negativen *E.coli* Zellen eine sehr viel höhere Konzentration als für die Lyse gram-positiver Bakterien erfordert (Andrä *et al.*, 2003; Bruhn *et al.*, 2003). Es konnte jedoch keine synergistische Aktivität von Amoebapore A und SAPLIP 3 gegen *E. coli* K-12 Zellen detektiert werden.

Da die Phagozytose von Erythrozyten ein Charakteristikum von *E. histolytica* zur Unterscheidung von der apathogenen Art *E. dispar* ist, wäre für ein Amöben-SAPLIP auch hämolytische Aktivität denkbar. *F. hepatica*, ein Parasit, der sich während seiner Entwicklung ebenfalls im Darm exzystiert und die Darmwand anschließend durchdringt, ebenso wie der intestinale Parasit *C. sinensis*, besitzen jeweils ein SAPLIP mit hämolytischer Aktivität (Espino und Hillyer, 2003; Lee *et al.*, 2002). Für die Amoebapores konnte keine hämolytische Aktivität nachgewiesen werden, obwohl sie cytolytisch auf verschiedene humane Zelllinien wirken (Leippe *et al.*, 1994a). Ebenso wenig wies SAPLIP 3 hämolytische Aktivität auf und während der Inkubation von SAPLIP 3 mit humanen Fibroblasten wurde keinerlei Lyse der Zellen beobachtet.

Auch weitere *in vitro* Aktivitäten, die von den Amoebapores bekannt sind, wie Porenbildung oder Sedimentation gebunden an Liposomen, konnten für SAPLIP 3 nicht gezeigt werden, obwohl verschiedene Bedingungen wie die Lipidzusammensetzung der Liposomen und der pH-Wert verändert wurden. Es zeigte sich bei der Analyse der Gelfiltrationsfraktionen nach Inkubation mit PS-haltigen multilamellaren Vesikeln mittels SDS-PAGE, dass SAPLIP 3 nicht an die Liposomen gebunden eluierte, obwohl eine eindeutige Interaktion stattgefunden hatte. Eine Bindung mit hoher Affinität an die Liposomen scheint also keine Voraussetzung für die Aktivität von SAPLIP 3 zu sein. Während dieses Versuches wurde durch SAPLIP 3 erstaunlicherweise eine Calceinlösung aus den Liposomen freigesetzt, was eigentlich die Grundlage für den hier verwendeten Nachweis der Porenbildung darstellt, in dem keine Aktivität gemessen werden konnte. Abgesehen von der Inkubationszeit besteht der

grundlegende Unterschied darin, dass zum Nachweis der Porenbildung unilamellare Liposomen eingesetzt wurden. Diese bestehen nur aus einer einzigen Lipiddoppelschicht, die den wässrigen Inhalt umschließt und daher besonders sensitiv gegenüber Permeabilisierung und Freisetzung des Inhalts sind. Für den Assoziationsnachweis mittels der Gelfiltration dagegen wurden multilamellare Liposomen, die aus mehreren, konzentrisch angeordneten Lipiddoppelschichten, die zwiebelschalenartig übereinander gestapelt sind, eingesetzt. Nur die Interaktion zwischen SAPLIP 3 und den multilamellaren Liposomen führt demnach zur Freisetzung des eingeschlossenen Farbstoffes. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von fluoreszierenden Vesikeln nach Inkubation mit SAPLIP 3 zeigten, dass die Interaktion nicht in der Zerstörung der Liposomenstruktur durch einen Detergens-ähnlichen Effekt besteht, sondern zu Vesikeln führt, die die in diesem Versuch zunächst außen befindliche fluoreszierende Lösung einschließen und in die eine Cobalt-Lösung, die die Fluoreszenz auslöschen würde, nicht ungehindert eindringen konnte. Ein ähnliches Bild ist für den Einfluß von Calciumionen und EDTA auf PS-haltige Liposomen beschrieben (Hoekstra *et al.*, 1984), wobei das Resultat eine Vergrößerung der regenerierten, Calcein-einschließenden Liposomen ist. Diese sollen durch einen Fusionsprozess, der unter Austreten der eingeschlossenen Flüssigkeit abläuft und daher "leaky" genannt wird, entstehen. Ein derartiger Prozess ist auch von Protein-vermittelten Fusionsereignissen bekannt (Frolov *et al.*, 2003; Shangguan *et al.*, 1996). Bei der Interaktion von SAPLIP 3 mit den multilamellaren Liposomen handelt es sich daher wohl um einen derartigen "leaky" Fusionsprozess. Diese fusionierten Liposomen konnten während des Gelfiltrationsexperiments nicht detektiert werden, weil es zu einer extremen Verdünnung der in dem winzigen Volumen der multilamellaren Vesikeln eingeschlossenen Calceinlösung während des "leaky" Fusionsprozesses kommt. Dementsprechend liegt die Calceinkonzentration der resultierenden Liposomen unterhalb der Detektionsgrenze der durchgeführten Fluoreszenzanalyse.

Strukturell ähnelt SAPLIP 3 in der Größe und molekularen Architektur zwar den Amoebapores, unterscheidet sich aber grundlegend von diesen in Bezug auf die Nettoladung. Funktionell konnte hier gezeigt werden, dass SAPLIP 3, im Gegensatz zu Amoebapore A in der Lage ist, PS-haltige Liposomen bei saurem pH-Wert zu fusionieren. Das einzige bekannte SAPLIP, das eine derartige Aktivität unter gleichen Bedingungen zeigt, ist das humane Saposin C (Qi und Chu, 2004; Vaccaro *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2003). Es gibt zwar ein weiteres SAPLIP, nämlich das Surfactant Protein B, für das beschrieben ist, dass es Vesikelfusion verursacht, aber die *in vitro* Analysen konzentrieren sich dabei auf neutralen pH-Wert und die typischen Lipide des Lungensurfactants, die sich sehr von den hier

untersuchten Bedingungen unterscheiden. Zusätzlich unterscheidet sich dieses SAPLIP von allen anderen SAPLIPs dadurch, dass es wasserunlöslich und ein kovalent verknüpftes Dimer ist (Hawgood, 2004). SAPLIP 3 enthält zwar auch ein siebtes Cystein in seiner Sequenz, das für eine intermolekulare Disulfidbrücke zur Verfügung stände, doch die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass dieses wasserlösliche Protein keine kovalenten Dimere in Lösung ausbildet. Hinzu kommt, dass das Surfactant Protein B im Gegensatz zu Saposin C und SAPLIP 3 ein kationisches Protein ist.

Obwohl die Sequenzidentität von SAPLIP 3 und Saposin C unter 20 % liegt, weisen beide Proteine doch eine auffällig negative Nettoladung auf (SAPLIP 3: -7 und Saposin C: -8). Diese negativ geladenen Aminosäurereste werden als wichtig für die pH-Abhängigkeit der Aktivitäten von Saposin C angesehen. Sie müssen für eine Membraninteraktion teilweise durch Protonierung neutralisiert werden, um die Oberflächenhydrophobizität zu erhöhen (de Alba *et al.*, 2003). Die hier für SAPLIP 3 gefundene Abhängigkeit der Aktivität von saurem pH-Wert könnte demnach auf einem ähnlichen strukturellen Hintergrund basieren.

Die strukturelle Ähnlichkeit bezieht sich nicht nur auf die Anzahl negativ geladener Aminosäurereste, sondern spiegelt sich auch in der Gesamtanordnung dieser Ladungen auf der Proteinoberfläche wider, wie ein strukturelles Modell verdeutlicht (Abb. 22). Beide Proteine besitzen die gleiche hauptsächlich negativ geladene Seite, die aus Helix zwei, drei und Teilen von Helix vier besteht und keine positiven Reste aufweisen.

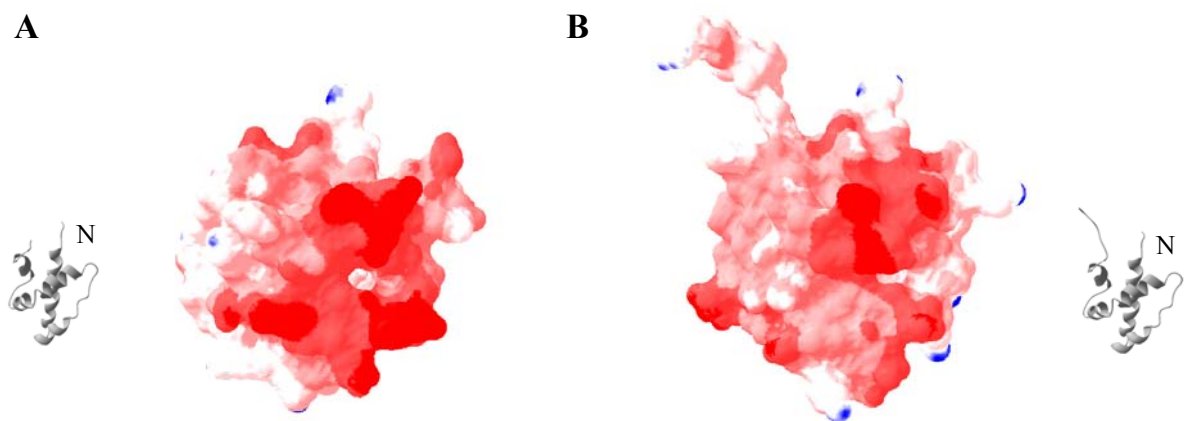


Abb. 22: Molekulare Oberfläche eines strukturellen Modells von SAPLIP 3 und Saposin C gefärbt in Abhängigkeit von ihrem elektrostatischen Potential

Die Ansichten eines strukturellen Modells von SAPLIP 3 (A) und der dreidimensionalen Struktur von Saposin C (B) sind bezüglich der Orientierung des Proteingrundgerüsts gleich dargestellt, wie durch die Schleifendarstellungen verdeutlicht. Rote Färbung bezeichnet ein negatives, blaue Farbe ein positives Potential und weiß sind die unpolaren Reste dargestellt.

Die Aktivität bei saurem pH-Wert stimmt gut mit dem natürlichen Vorkommen von Saposin C in den späten endosomalen und lysosomalen Kompartimenten des endozytotischen Weges überein (Chu *et al.*, 2005; Vielhaber *et al.*, 1996). Saure Vesikel findet man auch innerhalb des extensiven vesikulären Systems von *E. histolytica* und viele lysosomale Proteine konnten identifiziert werden (Batista *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 1999). Derartige Vesikel enthalten Lysozym-ähnliche Proteine (Jacobs und Leippe, 1995; Nickel *et al.*, 1998), saure Phosphatasen (Temesvari *et al.*, 1999), Cysteinproteinasen (Jacobs *et al.*, 1998), die membranpermeabilisierenden Amöbapores (Leippe *et al.*, 1994b) sowie Rab-Proteine (Saito-Nakano *et al.*, 2004). Prinzipiell laufen die endozytotischen Prozesse in *E. histolytica* wahrscheinlich ähnlich ab, wie diejenigen höherer Eukaryoten, doch weiß man noch wenig über die molekularen Mechanismen, die die Aufnahme von Flüssigkeiten und Partikeln oder das Sortieren und die Interaktionen von Endosomen und Phagosomen regulieren (Batista *et al.*, 2000; Meza und Clarke, 2004; Saito-Nakano *et al.*, 2004). Die Bedeutung der Phagozytose für die Virulenz dieses Parasiten ist aber offensichtlich, da gezeigt werden konnte, dass Mutanten mit einem Phagozytose-Defekt avirulent sind (Orozco *et al.*, 1983).

In Säugetieren ist Saposin C der Aktivator des lysosomalen Enzyms Glukosylceramid- β -Glukosidase, das Glykosylceramid abbaut (Berent und Radin, 1981; Ho und O'Brien, 1971). Zusätzlich kann Saposin C auch unterstützend auf den Galaktosylceramid- und Sphingomyelin-Katabolismus wirken (Tayama *et al.*, 1993; Wenger *et al.*, 1982). Im Gegensatz zu Saposin C ist SAPLIP 3 nicht in der Lage, die Lipidanhäufung in Prosaposin-defizienten Fibroblasten aufzuheben, indem es spezifische hydrolytische Enzyme aktiviert. Der Grund hierfür könnte einerseits darin liegen, dass es zu keiner endozytotischen Aufnahme und Weiterleitung ("trafficking") von SAPLIP 3 kommt - obwohl diese Prozesse gut für die humanen Saposine funktionieren - oder es liegt daran, dass es zu keiner spezifischen Interaktion zwischen den humanen Enzymen und dem Amöben-SAPLIP kommt. Die Suche in der Genomdatenbank von *E. histolytica* nach Genprodukten, die Enzymen des humanen Glykosphingolipid Katabolismus, die Saposine als Aktivator benötigen, entsprechen, führte lediglich zu einem putativen homologen Protein zur humanen sauren Sphingomyelinase. Erstaunlicherweise konnten dabei keine Ähnlichkeiten zu der N-terminalen Region, von der bekannt ist, dass sie homolog zu einer SAPLIP-Domäne ist, gefunden werden (Ponting, 1994). Obwohl ein aktivierender Effekt des humanen Saposin D auf dieses Enzym beschrieben wurde, scheint dieses nicht notwendig zu sein für die *in vivo* Degradation von Sphingomyelin (Linke *et al.*, 2001; Morimoto *et al.*, 1988). Dieses Enzym könnte zwar einen passenden Interaktionspartner für SAPLIP 3 darstellen, insbesondere da es keine SAPLIP-

Domäne besitzt, aber die Amöbe könnte ebenso gut in der Lage sein, Glykosphingolipide mittels eines unbekanntes Stoffwechselweges einschließlich besonderer Enzyme abzubauen oder zu metabolisieren. Experimentelle Unterstützung für diese Möglichkeit ist durch eine kürzlich durchgeführte Proteom Analyse des frühen, unreifen Phagosoms gegeben, die zur Identifikation von 85 Proteine führte (Okada *et al.*, 2005). Nur für ungefähr die Hälfte der Proteine konnte eine eindeutige funktionelle Zuordnung erreicht werden, aber darunter konnten keine Hydrolasen, die den humanen Enzymen, die Saposine als Aktivator brauchen, gefunden werden.

Neben der Aktivierung der Glukosylceramid- β -Glukosidase durch spezifische Bindung übt Saposin C noch eine Reihe enzymunabhängiger Membraninteraktionen *in vitro* aus, die vorgeschlagen werden, in die Organisation der späten endosomalen und lysosomalen Kompartimente involviert zu sein (Chu *et al.*, 2005; Vaccaro *et al.*, 1994). Die Aktivität des SAPLIP 3 könnte also eher diesen Membraninteraktionen des Saposin C ähneln, wie hier *in vitro* für die Membranfusion gezeigt werden konnte, als dass es eine direkte Enzymaktivierung bewirkt. Es wird angenommen, dass der Hauptanteil des humanen Glykosphingolipid Katabolismus an der Oberfläche kleiner intra-endosomalen und intra-lysosomaler Vesikel stattfindet, die von der Plasmamembran abstammen (Sandhoff und Kolter, 1996; Sandhoff und Kolter, 2003). Solche Vesikel sollen durch aufeinanderfolgende Prozesse von Membranabtrennung und -fusion entlang des endozytotischen Weges direkt in das Lumen der Lysosomen transportiert werden, ein Prozess der auch als "Multivesicular body (MVB) sorting pathway" beschrieben ist. Die durch den Prosaposin-Defekt ausgelöste Glykolipid-Anhäufung findet hauptsächlich innerhalb solcher späten endosomalen MVB und innerhalb intra-lysosomaler Vesikel statt, wie durch Elektronenmikroskopie gezeigt werden konnte (Bradova *et al.*, 1993). Die Ansammlung von derartigen Vesikeln in Prosaposin-defizienten Fibroblasten kann aufgelöst werden durch extern hinzugefügtes Prosaposin oder Saposin C, aber nicht durch Saposin A, B oder D (Burkhardt *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 2005). Saposin C und ein Lipid, das für MVB kennzeichnend ist, Bis(monoacylglycero)phosphat, kolokalisieren. Hinzu kommt, dass Saposin C das einzige Saposin ist, das zur Fusion von Liposomen, die dieses Lipid enthalten, *in vitro* bei saurem pH-Wert fähig ist. Daher wird vorgeschlagen, dass Saposin C für die Regulation der MVB-Bildung in den Zellen mittels seiner fusionierenden Aktivität verantwortlich sei (Chu *et al.*, 2005). Es ist zwar noch nicht bewiesen, dass auch in *E. histolytica* ähnliche MVB-Sortierprozesse existieren, aber multivesikuläre Vakuolen sind bekannt (Mazzuco *et al.*, 1997). Kürzlich konnte der Transfer von Proteinen, die in den Stoffabbau involviert sind, mittels derartiger Vakuolen zum

Phagosom gezeigt werden (Saito-Nakano *et al.*, 2004). Diese präphagosomalen Vakuolen (PPV) werden als vorbereitende Organellen beschrieben, da sie als Kompartimente für die temporäre Lagerung, Prozessierung und Aktivierung von hydrolytischen Enzymen und lytischen Peptiden dienen, bevor sie mit dem Phagosom fusionieren. Darüber hinaus legt die Lokalisation einer Retromer-Komponente, ein Komplex, der in endozytotische Recyclingprozesse involviert ist, auf den präphagosomalen Vakuolen nahe, dass diese Vakuolen ähnliche Funktionen wie die MVB übernehmen (Nakada-Tsukui *et al.*, 2005).

Die hier dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass ein Protein mit Saposin-ähnlichen Aktivitäten bereits in einem so basalen Organismus wie der Amöbe existiert. Membranfusion ist ein grundlegendes Prinzip in allen lebenden Organismen für endo- und exozytotische Prozesse. Ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften von SAPLIP 3 und dem humanen Saposin C lassen daher die Vermutung zu, dass das SAPLIP 3 eine ähnliche Rolle in Transport- und Sortierungsvorgängen während endozytotischer Prozesse in der Amöbe übernimmt.

5 Zusammenfassung

Saposin-ähnliche Proteine sind membraninteragierende Proteine, die in phylogenetisch so unterschiedlichen Organismen wie Einzellern und Säugetieren zu finden sind. Sie zeichnen sich durch die konservierte Position von drei Disulfidbrücken, einer typischen α -helikalen Proteinfaltung und der Fähigkeit mit Lipiden zu interagieren, aus. Ihre zellulären Funktionen sind äußerst vielfältig und können aufgrund der Sequenzdaten nicht vorhergesagt werden.

Bis zum Beginn des Genomsequenzierungsprojektes waren die Amoebapores die einzigen bekannten und charakterisierten SAPLIPs von *Entamoeba histolytica*, dem Erreger der humanen Amöbenruhr. Aufgrund ihrer antimikrobiellen Aktivität stellen sie für diesen parasitischen Einzeller, der sich von phagozytierten Bakterien ernährt, wichtige Effektormoleküle dar. Sie können aber auch cytolytisch auf Wirtszellen wirken und werden deshalb als bedeutender Pathogenitätsfaktor angesehen.

Die Datenbankanalyse zu Beginn des Genomsequenzierungsprojekts zeigte, dass es 12 weitere Gene kodierend für SAPLIPs in diesem Organismus gibt, deren Anzahl im Verlauf dieser Arbeit durch weitere Datenbankanalysen auf insgesamt 16 Gene zusätzlich zu den drei Amoebapore-Genen erhöht werden konnte. Paarweise Sequenzidentitäten von teilweise weniger als 5 % bis maximal 64 % zeigen die Diversität der Genfamilie.

Wie die theoretische computergestützte Analyse der Sequenzen nach Abschluss der Genomsequenzierung ergab, unterscheidet sich die Größe der putativen Proteine stark (77 - 1009 Aminosäuren), doch alle besitzen eine einzige, C-terminal gelegene SAPLIP Domäne. Mit einer Ausnahme weisen alle eine eindeutige Signalpeptidvorhersage auf, die sie als Proteine des sekretorischen Weges kennzeichnet. Eine weitere Prozessierung der großen SAPLIPs, wie von anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie bekannt, kann nicht ausgeschlossen werden. Neben der SAPLIP-Domäne konnten keine weiteren bekannten funktionellen oder strukturellen Domänen in den relevanten Datenbanken identifiziert werden, die auf mögliche Funktionen hätten hinweisen können.

Alle SAPLIP-Gene werden gleichzeitig in axenisch kultivierten Trophozoiten transkribiert wie durch reverse Transkriptions-PCR gezeigt wurde. Die vergleichende transkriptionelle Analyse im Mikroarray ergab, dass nach sechsständigem Kontakt mit menschlichen Kolonzellen und deren Phagozytose keine Hochregulierung dieser Gene mit Ausnahme des Amoebapore A Gens stattfindet.

Um die für die Aktivitätsanalysen notwendigen Proteinmengen zur Verfügung zu haben, wurde die rekombinante Expression der Proteine in *E. coli* verfolgt. Hierzu wurden zunächst die für die SAPLIPs kodierenden DNA-Sequenzen nach der Isolierung von RNA aus *E. histolytica* und deren reversen Transkription kloniert. Die N-terminal vor den SAPLIP-Domänen gelegenen Sequenzbereiche waren zu diesem Zeitpunkt der Genomsequenzierung bei den meisten Genprodukten nicht eindeutig. Daher entsprach die Größe der klonierten Sequenzen in Anlehnung an die Länge der murenen Amöbapore-Proteine den SAPLIP-Domänen. Für die parallele Klonierung dieser verschiedenen Fragmente wurde ein "Expressionscreening" mit GFP als Reporterprotein etabliert, das die erfolgreiche Klonierung und Expression eines Fragments aufgrund der Fluoreszenz der Bakterienkolonie bereits auf der Ebene der Transformation anzeigt. Es konnten alle ursprünglich identifizierten neuen SAPLIP-Domänen in den Expressionsvektor kloniert werden. Mit Ausnahme des SAPLIP 1/GFP-Fusionsproteins werden alle Fusionsproteine von den Bakterien synthetisiert, allerdings schwankt die Höhe der Ausbeute sowie das Verhältnis von löslich und unlöslich synthetisiertem Protein.

In erster Linie kann *E. histolytica* als eine unersättlich phagozytierende Zelle angesehen werden, die mit einer Vielfalt von Zielzellen interagiert und sie letztendlich tötet. Als naheliegendste Funktion der neuen SAPLIPs war daher die Unterstützung der Aktivitäten der Amöbapores und somit ihre Beteiligung an einem fein abgestimmten antimikrobiellen System anzusehen.

Die rekombinant exprimierte und bis zur Homogenität gereinigte SAPLIP-Domäne von SAPLIP 12 wies tatsächlich Amöbapore-ähnliche Aktivitäten auf, die sich in den Interaktionen mit künstlichen wie auch bakteriellen Membranen widerspiegeln. Unter Verwendung von Liposomen konnte porenbildende Aktivität nachgewiesen werden, wobei diese Aktivität stark an einen sauren pH-Wert gebunden ist. Die SAPLIP-Domäne 12 ist aber auch antibakteriell und dieses sogar mit vergleichbarer Selektivität wie Amöbapore A, nämlich Zellyse von gram-positiven *B. megaterium* war nachweisbar, jedoch nicht von gram-negativen *E. coli*. Strukturell unterscheiden sich die SAPLIP-Domäne 12 und Amöbapore A bezüglich der Exposition positiver Ladungsansammlungen auf der Proteinoberfläche und des Fehlens des für den Mechanismus der Amöbapores essentiellen Histidinrestes an entsprechender Position in der Sequenz. Darüber hinaus übt die SAPLIP-Domäne 12 eine im Vergleich zum Amöbapore A geringere spezifische Aktivität aus. Diese Eigenschaften weisen darauf hin, dass es sich um einen anderen Wirkungsmechanismus handeln könnte. Für

die SAPLIP-Domäne 12 wäre eine über die positiven Ladungen der Proteinoberfläche vermittelte Interaktion mit den negativ geladenen Phospholipidköpfen von Membranen denkbar, die bei Erreichen einer bestimmten Konzentration in einer Störung der Lipidordnung und letztendlich in der Auflösung der Membranstruktur resultieren könnte.

Von besonderem Interesse sind diejenigen SAPLIPs, die den Amoebapores in der Größe und molekularen Architektur ähneln und somit als funktionelle Einheit angesehen werden können. Bei SAPLIP 3 handelt es sich strukturell um ein derartiges Protein, das sich aber durch eine hohe negative Nettoladung von den Amoebapores unterscheidet. Doch das rekombinante SAPLIP 3 ist nicht antibakteriell und die Membraninteraktionen dieses SAPLIPs unterscheiden sich grundlegend von denjenigen, die für die Amoebapores beschrieben sind wie durch verschiedene Aktivitätstests nachgewiesen werden konnte. SAPLIP 3 zerstört nicht einfach die Liposomenstruktur wie von den porenbildenden Amoebapores bekannt, sondern es vermittelt die Fusion von multilamellaren Liposomen unter Freisetzung des Liposomeninhalts. Diese Aktivität ist abhängig von der Anwesenheit anionischer Lipide und von einem sauren pH-Wert. Die Fähigkeit zur Vesikelfusion sowie die Verteilung der negativen Ladungen von SAPLIP 3 auf der Proteinoberfläche ähneln Merkmalen des humanen Saposin C. Neben der Funktion als Cofaktor von Exohydrolasen, die im Sphingolipid Katabolismus involviert sind, wird angenommen, dass die Fähigkeit von Saposin C, Vesikel zu fusionieren, wichtig für die Reorganisation der humanen lysosomalen Kompartimente ist. Die Saposin C-ähnlichen Charakteristika von SAPLIP 3 geben Grund zu der Annahme, dass es bereits in einem so basalen Organismus wie der Amöbe ein Protein mit Saposin-ähnlichen membranfusionierenden Aktivitäten gibt und dass dieses SAPLIP entsprechende Funktionen während endo- und exozytotischer Transportprozesse in der Amöbe übernehmen könnte.

6 Summary

Saposin-like proteins are membrane-interacting proteins that exist in phylogenetically most unrelated organisms such as protozoa and mammals. They are characterized by the conserved position of three disulphide bonds, a typical α -helical fold and the ability to interact with lipids. Their cellular functions are diverse and cannot be predicted from sequence data.

Until the beginning of the genome-sequencing project, the amoebapores were the only known and characterized SAPLIPs of *Entamoeba histolytica*. Due to their antimicrobial activity, these proteins are important effector molecules of this unicellular parasite, which feeds on phagocytosed bacteria. However they also exert cytolytic activity against host cells and therefore, they are considered to be a major pathogenicity factor of the amoeba, which is the causative agent of human amoebiasis.

The database analysis in an early phase of the genome-sequencing project revealed the existence of 12 additional genes coding for SAPLIPs in this organism. Performing further database analysis, the number was raised to altogether 16 genes apart from the three amoebapore genes in the course of this thesis. Pairwise sequence identities of partially less than 5 % to a maximum of 64 % show the diversity of this gene family.

The theoretical computer-based analysis of the sequences after the finishing of genome sequencing revealed that the sizes of the putative proteins are highly different (77 – 1009 amino acid residues) but they all contain one, C-terminally located SAPLIP domain. With one exception, they all appear to possess a signal peptide suggesting that they are secretory products. Further processing of these large SAPLIPs, as known from other members of the protein family, cannot be excluded. Beside the SAPLIP domain, no other functional or structural domains that would have pointed to possible functions were identified in the relevant databases.

All SAPLIP-genes are transcribed in axenically cultured trophozoites at the same time as shown by reverse transcription PCR. The comparative transcriptional analysis using microarrays revealed that after six hours of contact with human cells and their phagocytosis none of these genes, with the exception of the amoebapore A gene, was upregulated.

To make a sufficient amount of protein available for the analysis of protein activities, the recombinant expression of the proteins in *E. coli* was performed. Initially, the SAPLIP-coding DNA sequences were cloned after isolation of the RNA from *E. histolytica* and its reverse

transcription. At this stage of the genome sequencing, the sequences located N-terminally of the SAPLIP domains were not defined. Therefore, the sizes of the cloned sequences correspond to the SAPLIP domains according to the length of the mature amoebapore proteins. In order to clone the different fragments in parallel, an expression screening with GFP as reporter protein was established, which indicates the successful cloning and expression of a fragment by the fluorescence of the bacterial colony already shown at the level of transformation. All of the originally identified SAPLIP domains have been cloned into the expression vector. With the exception of the SAPLIP 1/GFP fusion protein, they are all synthesized by the bacteria but the yield and the ratio of solubly and insolubly synthesized protein varies.

Primarily, *E. histolytica* may be viewed as an insatiable phagozytozing cell, which interacts with a variety of target cells and finally kills them. The most likely function of the novel SAPLIPs was therefore considered to be the support of the activities of the amoebapores and thus, to participate in a fine-tuned antimicrobial system.

Indeed, the SAPLIP domain 12, which has been recombinantly expressed and purified to homogeneity, exerts amoebapore-like activities that are reflected in the interactions with artificial and bacterial membranes. Using liposomes, pore-forming activity was detected, which is strongly dependent on acidic pH. Furthermore, the SAPLIP domain 12 is antibacterial even with similar selectivity as amoebapore A in that cell lysis of gram-positive *B. megaterium* was detectable but not of gram-negative *E. coli*. Structurally, the SAPLIP domain 12 differs from the amoebapores by exposing patches of positive charges on the protein surface and by lacking a histidine residue at a corresponding position in its sequence, which has been shown to be essential for the mechanism of amoebapore A. Moreover, the SAPLIP domain 12 displays a lower specific activity. These features indicate that this SAPLIP domain may act by means of another mechanism. It may interact with the negatively charged phospholipid head groups of membranes by its positively charged protein surface and after reaching a certain threshold concentration, possibly resulting in a disturbance of the lipid order and finally in the disintegration of the membrane structure.

Of special interest are those SAPLIPs that resemble the amoebapores in size and molecular architecture and could therefore be considered as a functional unit. Structurally, SAPLIP 3 represents such a protein but it differs from the amoebapores by a highly negative net charge. Notably, the recombinant protein is not antibacterial and the membrane interactions of this SAPLIP are completely different from those described for the amoebapores as evidenced by

using different activity tests. SAPLIP 3 does not simply destroy the liposome structure as known from the pore-forming amoebapores but induces leaky fusion of multilamellar liposomes. This activity is dependent on the presence of negatively charged lipids and on acidic pH. The capability of vesicle fusion as well as the negative charge distribution of SAPLIP 3 resembles features of the human saposin C. Beside its function as a cofactor of exohydrolases, which are involved in the sphingolipid catabolism, saposin C is considered to be involved in the reorganization of human lysosomal compartments due to its fusogenic activity. The saposin C-like characteristics of SAPLIP 3 suggest that a protein with saposin-like membrane fusogenic activity already exists in such a basal organism like an amoeba and that this SAPLIP fulfils corresponding functions during endo- and exocytotic transport processes in the amoeba.

7 Literatur

- Abriouel, H., Sanchez-Gonzalez, J., Maqueda, M., Galvez, A., Valdivia, E. und Jose Galvez-Ruiz, M. (2001). Monolayer Characteristics of Bacteriocin AS-48, pH Effect and Interactions with Dipalmitoyl Phosphatidic Acid at the Air-Water Interface. *J Colloid Interface Sci* **233** (2), 306-312.
- Ahn, V. E., Faull, K. F., Whitelegge, J. P., Fluharty, A. L. und Prive, G. G. (2003). Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (1), 38-43.
- Akbar, M. A., Chatterjee, N. S., Sen, P., Debnath, A., Pal, A., Bera, T. und Das, P. (2004). Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* **133** (2), 187-196.
- Aley, S. B., Scott, W. A. und Cohn, Z. A. (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **152** (2), 391-404.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25** (17), 3389-3402.
- An, C. I., Fukusaki, E. und Kobayashi, A. (2002). Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **214** (5), 661-667.
- Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A. und Eisenberg, D. (2003). Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J Mol Biol* **325** (2), 355-365.
- Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jornvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H., Dagerlind, A., Boman, H. G. und Gudmundsson, G. H. (1995). NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *Embo J* **14** (8), 1615-1625.
- Andrä, J., Berninghausen, O. und Leippe, M. (2004). Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett* **564** (1-2), 109-115.
- Andrä, J., Herbst, R. und Leippe, M. (2003). Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev Comp Immunol* **27** (4), 291-304.
- Ankri, S., Padilla-Vaca, F., Stolarsky, T., Koole, L., Katz, U. und Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. *Mol Microbiol* **33** (2), 327-337.
- Bakatselou, C., Beste, D., Kadri, A. O., Somanath, S. und Clark, C. G. (2003). Analysis of genes of mitochondrial origin in the genus *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol* **50** (3), 210-214.

- Bakker-Grunwald, T. und Wostmann, C. (1993). *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell. *Parasitol Today* **9** (1), 27-31.
- Banyai, L. und Patthy, L. (1998). Amoebapore homologs of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* **1429** (1), 259-264.
- Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S. und Crumpton, M. J. (1991). Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur J Biochem* **198** (3), 749-760.
- Batista, E. J., de Menezes Feitosa, L. F. und de Souza, W. (2000). The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* **86** (11), 881-890.
- Berent, S. L. und Radin, N. S. (1981). Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein). *Biochim Biophys Acta* **664** (3), 572-582.
- Berninghausen, O. und Leippe, M. (1997). Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **65** (9), 3615-3621.
- Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K. und Rasmuson, T., Jr. (1974). Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect Immun* **10** (1), 136-145.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M. und Mirelman, D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol* **34** (3), 463-472.
- Bracha, R., Nuchamowitz, Y. und Mirelman, D. (2003). Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot Cell* **2** (2), 295-305.
- Bradova, V., Smid, F., Ulrich-Bott, B., Roggendorf, W., Paton, B. C. und Harzer, K. (1993). Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum Genet* **92** (2), 143-152.
- Brock, D. A. und Gomer, R. H. (1999). A cell-counting factor regulating structure size in Dictyostelium. *Genes Dev* **13** (15), 1960-1969.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3** (3), 238-250.
- Brown, J. M. und Firtel, R. A. (2000). Just the right size: cell counting in Dictyostelium. *Trends Genet* **16** (5), 191-193.
- Bruchhaus, I., Loftus, B. J., Hall, N. und Tannich, E. (2003). The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukaryot Cell* **2** (3), 501-509.

- Bruchhaus, I., Roeder, T., Lotter, H., Schwerdtfeger, M. und Tannich, E. (2002). Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol Microbiol* **44** (4), 1063-1072.
- Bruhn, H. (2005). A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J* **389** (2), 249-257.
- Bruhn, H. und Leippe, M. (1999). Comparative modeling of amoebapores and granulysin based on the NK-lysin structure-structural and functional implications. *Biol Chem* **380** (7-8), 1001-1007.
- Bruhn, H. und Leippe, M. (2001). Novel putative saposin-like proteins of *Entamoeba histolytica* different from amoebapores. *Biochim Biophys Acta* **1514** (1), 14-20.
- Bruhn, H., Riekens, B., Berninghausen, O. und Leippe, M. (2003). Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochem J* **375** (Pt 3), 737-744.
- Buck, M. A., Olah, T. A., Weitzmann, C. J. und Cooperman, B. S. (1989). Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate. *Anal Biochem* **182** (2), 295-299.
- Bujanover, S., Katz, U., Bracha, R. und Mirelman, D. (2003). A virulence attenuated amoebapore-less mutant of *Entamoeba histolytica* and its interaction with host cells. *Int J Parasitol* **33** (14), 1655-1663.
- Burkhardt, J. K., Hüttler, S., Klein, A., Möbius, W., Habermann, A., Griffiths, G. und Sandhoff, K. (1997). Accumulation of sphingolipids in SAP-precursor (prosaposin)-deficient fibroblasts occurs as intralysosomal membrane structures and can be completely reversed by treatment with human SAP-precursor. *Eur J Cell Biol* **73** (1), 10-18.
- Christomanou, H., Chabas, A., Pampols, T. und Guardiola, A. (1989). Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the newly identified lipid storage disorder. *Klin Wochenschr* **67** (19), 999-1003.
- Chu, Z., Witte, D. P. und Qi, X. (2005). Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Exp Cell Res* **303** (2), 300-307.
- Ciaffoni, F., Salvioli, R., Tatti, M., Arancia, G., Crateri, P. und Vaccaro, A. M. (2001). Saposin D solubilizes anionic phospholipid-containing membranes. *J Biol Chem* **276** (34), 31583-31589.
- Clark, C. G. (1995). Evolution of virulence in *Entamoeba histolytica*. *Trop Dis Bull* **92** R147-R155.
- Clark, C. G. (2000). The evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale. *Res Microbiol* **151** (8), 599-603.
- Clayberger, C. und Krensky, A. M. (2003). Granulysin. *Curr Opin Immunol* **15** (5), 560-565.
- Das, S., Stevens, T., Castillo, C., Villasenor, A., Arredondo, H. und Reddy, K. (2002). Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol* **32** (6), 655-675.

- de Alba, E., Weiler, S. und Tjandra, N. (2003). Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **42** (50), 14729-14740.
- Debnath, A., Akbar, M. A., Mazumder, A., Kumar, S. und Das, P. (2005). *Entamoeba histolytica*: Characterization of human collagen type I and Ca²⁺ activated differentially expressed genes. *Exp Parasitol* **110** (3), 214-219.
- Debnath, A., Das, P., Sajid, M. und McKerrow, J. H. (2004). Identification of genomic responses to collagen binding by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* **190** (3), 448-457.
- Diamond, L. S. und Clark, C. G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol* **40** (3), 340-344.
- Diamond, L. S., Harlow, D. R. und Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72** (4), 431-432.
- Donaldson, M., Heyneman, D., Dempster, R. und Garcia, L. (1975). Epizootic of fatal amebiasis among exhibited snakes: epidemiologic, pathologic, and chemotherapeutic considerations. *Am J Vet Res* **36** (6), 807-817.
- Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R. M., Pires, E., de Lima, M. C. und Faro, C. (2000). The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *J Biol Chem* **275** (49), 38190-38196.
- Eichinger, D. (2001a). Encystation in parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* **4** (4), 421-426.
- Eichinger, D. (2001b). A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of Entamoeba. *J Eukaryot Microbiol* **48** (1), 17-21.
- Elsbach, P. und Weiss, J. (1992). Phagocytic cells: oxygen-independent antimicrobial systems. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin, J.I., Goldstein, I. M., Snyderman, R., eds.), 2nd edn., Raven Press Ltd., New York. 603-636.
- Epaud, R., Ikegami, M., Whitsett, J. A., Jobe, A. H., Weaver, T. E. und Akinbi, H. T. (2003). Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28** (3), 373-378.
- Espino, A. M. und Hillyer, G. V. (2003). Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol* **89** (3), 545-552.
- Ferlinz, K., Hurwitz, R., Vielhaber, G., Suzuki, K. und Sandhoff, K. (1994). Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *Biochem J* **301** (Pt 3) 855-862.
- Frazao, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C. M., Verissimo, P., Faro, C., Pires, E., Cooper, J. und Carrondo, M. A. (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *J Biol Chem* **274** (39), 27694-27701.

- Frolov, V. A., Dunina-Barkovskaya, A. Y., Samsonov, A. V. und Zimmerberg, J. (2003). Membrane permeability changes at early stages of influenza hemagglutinin-mediated fusion. *Biophys J* **85** (3), 1725-1733.
- Fukuda, H., Arai, M. und Kuwajima, K. (2000). Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochemistry* **39** (39), 12025-12032.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H. G. und Shai, Y. (1995). Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34** (36), 11479-11488.
- Gerke, V. und Moss, S. E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82** (2), 331-371.
- Ghosh, S. K., Field, J., Frisardi, M., Rosenthal, B., Mai, Z., Rogers, R. und Samuelson, J. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun* **67** (6), 3073-3081.
- Gonzalez, C., Langdon, G. M., Bruix, M., Galvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M. und Rico, M. (2000). Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (21), 11221-11226.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18** 2714-2723.
- Gutsmann, T., Riekens, B., Bruhn, H., Wiese, A., Seydel, U. und Leippe, M. (2003). Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* **42** (32), 9804-9812.
- Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* **1** (3), 156-164.
- Haque, R., Ali, I. M., Sack, R. B., Farr, B. M., Ramakrishnan, G. und Petri, W. A., Jr. (2001). Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis* **183** (12), 1787-1793.
- Hawgood, S. (2004). Surfactant protein B: structure and function. *Biol Neonate* **85** (4), 285-289.
- Hazkani-Covo, E., Altman, N., Horowitz, M. und Graur, D. (2002). The evolutionary history of prosaposin: two successive tandem-duplication events gave rise to the four saposin domains in vertebrates. *J Mol Evol* **54** (1), 30-34.
- Hecht, O., Van Nuland, N. A., Schleinkofer, K., Dingley, A. J., Bruhn, H., Leippe, M. und Grötzinger, J. (2004). Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **279** (17), 17834-17841.
- Heim, R., Prasher, D. C. und Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (26), 12501-12504.

- Herbst, R. (2001). Molekulare Charakterisierung von cytolytischen Proteinen parasitischer Protozoen. Dissertation. *Der Andere Verl, ISBN 3-935316-21-6*.
- Herbst, R., Marciano-Cabral, F. und Leippe, M. (2004). Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J Biol Chem* **279** (25), 25955-25958.
- Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano-Cabral, F. und Leippe, M. (2002). Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* **277** (25), 22353-22360.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1986). Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. *Pharmacia LKB-Applikationen* **RE-034**.
- Hiraiwa, M., Soeda, S., Kishimoto, Y. und O'Brien, J. S. (1992). Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (23), 11254-11258.
- Ho, M. W. und O'Brien, J. S. (1971). Gaucher's disease: deficiency of 'acid' -glucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68** (11), 2810-2813.
- Hoekstra, D., de Boer, T., Klappe, K. und Wilschut, J. (1984). Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* **23** (24), 5675-5681.
- Hulkova, H., Cervenkova, M., Ledvinova, J., Tochackova, M., Hrebicek, M., Poupetova, H., Befekadu, A., Berna, L., Paton, B. C., Harzer, K., Boor, A., Smid, F. und Elleder, M. (2001). A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation. *Hum Mol Genet* **10** (9), 927-940.
- Ish-Horowicz, D. und Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9** (13), 2989-2998.
- Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E. und Leippe, M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **27** (2), 269-276.
- Jacobs, T. und Leippe, M. (1995). Purification and molecular cloning of a major antibacterial protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* with lysozyme-like properties. *Eur J Biochem* **231** (3), 831-838.
- Kang, S. J. und Cresswell, P. (2004). Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol* **5** (2), 175-181.
- Kendall, D. A. und MacDonald, R. C. (1982). A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. *J Biol Chem* **257** (23), 13892-13895.

- Kervinen, J., Tobin, G. J., Costa, J., Waugh, D. S., Wlodawer, A. und Zdanov, A. (1999). Crystal structure of plant aspartic proteinase prophytepsin: inactivation and vacuolar targeting. *Embo J* **18** (14), 3947-3955.
- Kishimoto, Y., Hiraiwa, M. und O'Brien, J. S. (1992). Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res* **33** (9), 1255-1267.
- Klein, A., Henseler, M., Klein, C., Suzuki, K., Harzer, K. und Sandhoff, K. (1994). Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **200** (3), 1440-1448.
- Krensky, A. M. (2000). Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Pharmacol* **59** (4), 317-320.
- Lee, J. Y., Cho, P. Y., Kim, T. Y., Kang, S. Y., Song, K. Y. und Hong, S. J. (2002). Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochem Biophys Res Commun* **296** (5), 1238-1244.
- Leippe, M. (1995). Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* **83** (1), 17-18.
- Leippe, M. (1997). Amoebapores. *Parasitol Today* **13** (5), 178-183.
- Leippe, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev Comp Immunol* **23** (4-5), 267-279.
- Leippe, M., Andrä, J. und Müller-Eberhard, H. J. (1994a). Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (7), 2602-2606.
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E. und Müller-Eberhard, H. J. (1994b). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol* **14** (5), 895-904.
- Leippe, M., Bruhn, H., Hecht, O. und Grötzinger, J. (2005). Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. *Trends Parasitol* **21** (1), 5-7.
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R. D. und Müller-Eberhard, H. J. (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (17), 7659-7663.
- Leippe, M. und Herbst, R. (2004). Ancient weapons for attack and defense: the pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *J Eukaryot Microbiol* **51** (5), 516-521.
- Leippe, M. und Müller-Eberhard, H. J. (1994). The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. *Toxicology* **87** (1-3), 5-18.
- Leippe, M., Sievertsen, H. J., Tannich, E. und Horstmann, R. D. (1995). Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. *Parasitology* **111** (Pt 5), 569-574.

- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R. D. und Muller-Eberhard, H. J. (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Embo J* **11** (10), 3501-3506.
- Leon-Avila, G. und Tovar, J. (2004). Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. *Microbiology* **150** (Pt 5), 1245-1250.
- Lewinska, M. (2002). Verlängerung des N-Terminus von Proteinen mithilfe von IgA-Protease: Eine neue Methode zur posttranslationalen *in vitro* Modifikation von Proteinen. *Dissertation* <http://tumb1bibliothek-muenchende/publ/diss/ch/2002/lewinskapdf>.
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M. und Otting, G. (1997). Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat Struct Biol* **4** (10), 793-795.
- Linke, T., Wilkening, G., Sadeghlar, F., Mozcall, H., Bernardo, K., Schuchman, E. und Sandhoff, K. (2001). Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J Biol Chem* **276** (8), 5760-5768.
- Lynch, E. C., Rosenberg, I. M. und Gitler, C. (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *Embo J* **1** (7), 801-804.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Matsuda, J., Vanier, M. T., Saito, Y., Tohyama, J. und Suzuki, K. (2001). A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene results in a late-onset, chronic form of globoid cell leukodystrophy in the mouse. *Hum Mol Genet* **10** (11), 1191-1199.
- Matsuzaki, K., Mitani, Y., Akada, K. Y., Murase, O., Yoneyama, S., Zasloff, M. und Miyajima, K. (1998). Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa. *Biochemistry* **37** (43), 15144-15153.
- Mazzuco, A., Benchimol, M. und De Souza, W. (1997). Endoplasmic reticulum and Golgi-like elements in *Entamoeba*. *Micron* **28** (3), 241-247.
- Meza, I. und Clarke, M. (2004). Dynamics of endocytic traffic of *Entamoeba histolytica* revealed by confocal microscopy and flow cytometry. *Cell Motil Cytoskeleton* **59** (4), 215-226.
- Mirelman, D. (1987). Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol Rev* **51** (2), 272-284.
- Misasi, R., Garofalo, T., Di Marzio, L., Mattei, V., Gizzi, C., Hiraiwa, M., Pavan, A., Grazia Cifone, M. und Sorice, M. (2004). Prosaposin: a new player in cell death prevention of U937 monocytic cells. *Exp Cell Res* **298** (1), 38-47.

- Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A. und Otting, G. (1999). Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett* **462** (1-2), 155-158.
- Miteva, M. A., Tuffery, P. und Villoutreix, B. O. (2005). PCE: web tools to compute protein continuum electrostatics. *Nucleic Acids Res* **33** (Web Server issue), W372-375.
- Morimoto, S., Martin, B. M., Kishimoto, Y. und O'Brien, J. S. (1988). Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun* **156** (1), 403-410.
- Morimoto, S., Martin, B. M., Yamamoto, Y., Kretz, K. A., O'Brien, J. S. und Kishimoto, Y. (1989). Saposin A: second cerebroside activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (9), 3389-3393.
- Moshitch-Moshkovitch, S., Petter, R., Levitan, A., Stolarsky, T. und Mirelman, D. (1998). Regulation of expression of ribosomal protein L-21 genes of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* is at the post-transcriptional level. *Mol Microbiol* **27** (4), 677-685.
- Munford, R. S. und Hall, C. L. (1989). Purification of acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that removes secondary acyl chains from bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **264** (26), 15613-15619.
- Munford, R. S. und Hunter, J. P. (1992). Acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that deacylates bacterial lipopolysaccharides, has phospholipase, lysophospholipase, diacylglycerollipase, and acyltransferase activities in vitro. *J Biol Chem* **267** (14), 10116-10121.
- Munford, R. S., Sheppard, P. O. und O'Hara, P. J. (1995). Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* **36** (8), 1653-1663.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V. und Nozaki, T. (2005). A Retromerlike Complex Is a Novel Rab7 Effector That Is Involved in the Transport of the Virulence Factor Cysteine Protease in the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* (in press).
- Nickel, R., Jacobs, T. und Leippe, M. (1998). Molecular characterization of an exceptionally acidic lysozyme-like protein from the protozoan *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett* **437** (1-2), 153-157.
- Nickel, R., Ott, C., Dandekar, T. und Leippe, M. (1999). Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur J Biochem* **265** (3), 1002-1007.
- Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng* **12** (1), 3-9.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10** (1), 1-6.

- O'Brien, J. S., Carson, G. S., Seo, H. C., Hiraiwa, M., Weiler, S., Tomich, J. M., Barranger, J. A., Kahn, M., Azuma, N. und Kishimoto, Y. (1995). Identification of the neurotrophic factor sequence of prosaposin. *Faseb J* **9** (8), 681-685.
- Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, W. A., Jr., Kita, K. und Nozaki, T. (2005). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell* **4** (4), 827-831.
- O'Keefe, D. O. (1994). Quantitative electrophoretic analysis of proteins labeled with monobromobimane. *Anal Biochem* **222** (1), 86-94.
- Oren, Z. und Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47** (6), 451-463.
- Orozco, E., Guarneros, G., Martinez-Palomo, A. und Sanchez, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* **158** (5), 1511-1521.
- Page, R. D. (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12** (4), 357-358.
- Peña, S. V. und Krensky, A. M. (1997). Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* **9** (2), 117-125.
- Petri, W. A., Jr., Haque, R. und Mann, B. J. (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu Rev Microbiol* **56** 39-64.
- Petri, W. A., Jr. und Singh, U. (1999). Diagnosis and management of amebiasis. *Clin Infect Dis* **29** (5), 1117-1125.
- Ponting, C. P. (1994). Acid sphingomyelinase possesses a domain homologous to its activator proteins: saposins B and D. *Protein Sci* **3** (2), 359-361.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. und Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31** (49), 12416-12423.
- Qi, X. und Chu, Z. (2004). Fusogenic domain and lysines in saposin C. *Arch Biochem Biophys* **424** (2), 210-218.
- Que, X. und Reed, S. L. (1997). The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today* **13** (5), 190-194.
- Reddy, K. V., Yedery, R. D. und Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* **24** (6), 536-547.
- Reed, M. B., Strugnell, R. A., Panaccio, M. und Spithill, T. W. (2000). A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* **105** (2), 297-303.

- Ruyschaert, J. M., Goormaghtigh, E., Homble, F., Andersson, M., Liepinsh, E. und Otting, G. (1998). Lipid membrane binding of NK-lysin. *FEBS Lett* **425** (2), 341-344.
- Sadeghlar, F., Remmel, N., Breiden, B., Klingenstein, R., Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (2003). Physiological relevance of sphingolipid activator proteins in cultured human fibroblasts. *Biochimie* **85** (3-4), 439-448.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** (4839), 487-491.
- Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M. und Nozaki, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **279** (47), 49497-49507.
- Sandhoff, K. und Kolter, T. (1996). Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol* **6** (3), 98-103.
- Sandhoff, K. und Kolter, T. (2003). Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358** (1433), 847-861.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. und Roe, B. A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* **143** (2), 161-178.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166** (2), 368-379.
- Scholze, H. und Schulte, W. (1990). Purification and partial characterization of the major cysteine protease from *Entamoeba invadens*. *Biomed Biochim Acta* **49** (6), 455-463.
- Schuchman, E. H., Suchi, M., Takahashi, T., Sandhoff, K. und Desnick, R. J. (1991). Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. *J Biol Chem* **266** (13), 8531-8539.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462** (1-2), 55-70.
- Shangguan, T., Alford, D. und Bentz, J. (1996). Influenza-virus-liposome lipid mixing is leaky and largely insensitive to the material properties of the target membrane. *Biochemistry* **35** (15), 4956-4965.
- Sharma, M., Hirata, K., Herdman, S. und Reed, S. (1996). *Entamoeba invadens*: characterization of cysteine proteinases. *Exp Parasitol* **84** (1), 84-91.
- Simões, I. und Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur J Biochem* **271** (11), 2067-2075.

- Soeda, S., Hiraiwa, M., O'Brien, J. S. und Kishimoto, Y. (1993). Binding of cerebrosides and sulfatides to saposins A-D. *J Biol Chem* **268** (25), 18519-18523.
- Staab, J. F., Ginkel, D. L., Rosenberg, G. B. und Munford, R. S. (1994). A saposin-like domain influences the intracellular localization, stability, and catalytic activity of human acyloxyacyl hydrolase. *J Biol Chem* **269** (38), 23736-23742.
- Stauffer, W. und Ravdin, J. I. (2003). *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr Opin Infect Dis* **16** (5), 479-485.
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M. und Modlin, R. L. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282** (5386), 121-125.
- Stenger, S., Rosat, J. P., Bloom, B. R., Krensky, A. M. und Modlin, R. L. (1999). Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* **20** (9), 390-394.
- Sun, Y., Qi, X., Witte, D. P., Ponce, E., Kondoh, K., Quinn, B. und Grabowski, G. A. (2002). Prosaposin: threshold rescue and analysis of the "neuritogenic" region in transgenic mice. *Mol Genet Metab* **76** (4), 271-286.
- Tatti, M., Salvioli, R., Ciaffoni, F., Pucci, P., Andolfo, A., Amoresano, A. und Vaccaro, A. M. (1999). Structural and membrane-binding properties of saposin D. *Eur J Biochem* **263** (2), 486-494.
- Tayama, M., Soeda, S., Kishimoto, Y., Martin, B. M., Callahan, J. W., Hiraiwa, M. und O'Brien, J. S. (1993). Effect of saposins on acid sphingomyelinase. *Biochem J* **290** (Pt 2) 401-404.
- Temesvari, L. A., Harris, E. N., Stanley, S. L., Jr. und Cardelli, J. A. (1999). Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. *Mol Biochem Parasitol* **103** (2), 225-241.
- Terry, A. S., Poulter, L., Williams, D. H., Nutkins, J. C., Giovannini, M. G., Moore, C. H. und Gibson, B. W. (1988). The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepro-polypeptide. *J Biol Chem* **263** (12), 5745-5751.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22** (22), 4673-4680.
- Tovar, J., Fischer, A. und Clark, C. G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol* **32** (5), 1013-1021.
- Vaccaro, A. M., Salvioli, R., Tatti, M. und Ciaffoni, F. (1999). Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem Res* **24** (2), 307-314.

- Vaccaro, A. M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Serafino, A. und Barca, A. (1994). Saposin C induces pH-dependent destabilization and fusion of phosphatidylserine-containing vesicles. *FEBS Lett* **349** (2), 181-186.
- Vielhaber, G., Hurwitz, R. und Sandhoff, K. (1996). Biosynthesis, processing, and targeting of sphingolipid activator protein (SAP) precursor in cultured human fibroblasts. Mannose 6-phosphate receptor-independent endocytosis of SAP precursor. *J Biol Chem* **271** (50), 32438-32446.
- Wang, Y., Grabowski, G. A. und Qi, X. (2003). Phospholipid vesicle fusion induced by saposin C. *Arch Biochem Biophys* **415** (1), 43-53.
- Watanabe, K. und Mizuta, M. (1995). Fluorometric detection of glycosphingolipids on thin-layer chromatographic plates. *J Lipid Res* **36** (8), 1848-1855.
- Wenger, D. A., DeGala, G., Williams, C., Taylor, H. A., Stevenson, R. E., Pruitt, J. R., Miller, J., Garen, P. D. und Balentine, J. D. (1989). Clinical, pathological, and biochemical studies on an infantile case of sulfatide/GM1 activator protein deficiency. *Am J Med Genet* **33** (2), 255-265.
- Wenger, D. A., Roth, S. und Sattler, M. (1982). Acute neuronopathic (infantile) and chronic nonneuronopathic (adult) Gaucher disease in full siblings. *J Pediatr* **100** (2), 252-254.
- WHO/PAHO/UNESCO (1997). A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull* **18** (1), 13-14.
- Winau, F., Schwierzeck, V., Hurwitz, R., Rimmel, N., Sieling, P. A., Modlin, R. L., Porcelli, S. A., Brinkmann, V., Sugita, M., Sandhoff, K., Kaufmann, S. H. und Schaible, U. E. (2004). Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat Immunol* **5** (2), 169-174.
- Yan, H. und Hancock, R. E. (2001). Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **45** (5), 1558-1560.
- Young, J. D. und Cohn, Z. A. (1987). Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv Immunol* **41** 269-332.
- Zaltash, S. und Johansson, J. (1998). Secondary structure and limited proteolysis give experimental evidence that the precursor of pulmonary surfactant protein B contains three saposin-like domains. *FEBS Lett* **423** (1), 1-4.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (15), 5449-5453.
- Zhou, D., Cantu, C., 3rd, Sagiv, Y., Schrantz, N., Kulkarni, A. B., Qi, X., Mahuran, D. J., Morales, C. R., Grabowski, G. A., Benlagha, K., Savage, P., Bendelac, A. und Teyton, L. (2004). Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science* **303** (5657), 523-527.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
as	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BIS	Bisacrylamid
BLAST	(„Basic Local Alignment Search Tool“)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
CD	Zirkulardichroismus („circular dichroism“)
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
CFU	Kolonie bildende Einheiten („Colony-forming-units“)
CHOL	Cholesterol
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DTT	Dithiothreitol
E _x	Extinktion der Probe x
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FT-ICR-MS	Fourier Transform-Ionen Cyclotron Resonanz-Massenspektrometrie
g	Gramm oder Erdbeschleunigung in m/s
GC	Galaktosylceramid
GFP	grün fluoreszierendes Protein ("green fluorescent protein")
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulphonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ("high performance liquid chromatography")
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LMP-Agarose	Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampere
MBBr	Monobromobimane
MBC	Minimale, bakterizide Konzentration ("minimal bactericidal concentration")
MES	4-Morpholinethansulfonsäure
MIC	Minimale inhibitorische Konzentration ("minimal inhibitory concentration")
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MVB	Multivesikulärer Körper ("Multivesicular body")
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nt	Nukleotide
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
p.A.	zur Analyse
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	physiologischer Phosphatpuffer ("phosphate buffered saline")

PC	Phosphatidylcholin
PCIIS	ein an PC angereichertes Lipidgemisch aus Sojabohnen; Azolectin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion ("Polymerase chain reaction")
PEG	Polyethylenglykol
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
s	sense
SAPLIP	Saposin-ähnliches Protein ("saposin-like protein")
SDS	Natriumdodecylsulfat ("Sodiumdodecylsulphate")
Sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetat/EDTA
TBE	Tris-borat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ("Tris buffered saline")
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tricine	Tris-[hydroxymethyl]methylglycin ("Tris-[hydroxymethyl]methylglycine")
Tris	Tris-[hydroxymethyl]aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid

8.2 Sequenzen der genspezifische Oligonukleotide zur Klonierung der SAPLIP-Domänen

Amoebapores:	APA-s blunt	5'-AAA GCC ATC GTC TTT GTT TT
	APA-as blunt	5'-GCA AGC ATG AAT CTT AGC AC
	APB-s blunt	5'-AGA GCT ATT ATC TTT GTT TT
	APB-as blunt	5'-ACA AGC GTG AAT CTT TTC GC
	APC-s blunt	5'-AAG TTA TTT GTT CTC CTT TG
	APC-as blunt	5'-ACA TGC ATG AAT CAA CCC AC
SAPLIP 1	SAP1-s blunt	5'-GGA CCA ATT GTT TGC AAC CTT TG
	SAP1-as blunt	5'-GCA AGC ATT CAT TTG AGC ACA A
SAPLIP 2	SAP2-s blunt	5'-GGA GAT ATT CTT TGT AAT TTA TG
	SAP2-as blunt	5'-GGG AAT AGA TCT GAT CAA TTT TGT
SAPLIP 3	SAP3-s blunt	5'-GCT GAT ACT GCA AGT TGT GCA T
	SAP3-as blunt	5'-ACA AGA TCC ACA TTT TGC AC
SAPLIP 4	SAP4-s blunt	5'-GTT CCA GAA AAT TGT TTC ATG TG
	SAP4-as blunt	5'-ATG TGC AAG TTA ATG GAT CAA TGT
SAPLIP 5	SAP5-s blunt	5'-GGA ATT ATT AAT TGC AGA TAT TG
	SAP5-as blunt	5'-AAT GCC ACA AAC TCC AAT CTT C
SAPLIP 6	SAP6-s blunt	5'-GGT TCA TGC ATC AAC TGT TTC C
	SAP6-as blunt	5'-ATT ATA TGG ACA ATT TCC AAT AAT TG
SAPLIP 7	SAP7-s blunt	5'-CAA TGT GAG ATG TGT ACT AAC
	SAP7-as blunt	5'-GCA CTT ATT TAT TTG GCT ACA AG
SAPLIP 8	SAP8-s blunt	5'-CAA ACT GAT TGT AAG ATT TGT AG
	SAP8-as blunt	5'-AAT TCG TTG TTA GTG AAG TGT GC
SAPLIP 9	SAP9-s blunt	5'-AAT ATC GCT ACT TGT AAA ATT TG
	SAP9-as blunt	5'-TTT GCT CAA AGA TCA ACT TAT GT
SAPLIP 10	SAP10-s blunt	5'-GGG AAA TTA TGT GAG AGA TG
	SAP10-as blunt	5'-ACA CAT TTT GAC TTT TTG AC
SAPLIP 11	SAP11-s blunt	5'-AAT TGG AGA TGT AAT ACC TG
	SAP11-as blunt	5'-GCA ATG ATT GAA TCT TTT GC
SAPLIP 12	SAP12-s blunt	5'-GGT GAT TGT CCA TTG TGT AGA AC
	SAP12-as blunt	5'-TAG TCC ACA AAC ACC AAT TTT TC
SAPLIP 13	SAP13-s blunt	5'-GGA ATT AAA GTC AAA TGC AC
	SAP13-as blunt	5'-AAC ATG TAA TAC GCA TCT ACC

SAPLIP 14	SAP14-s blunt	5'-AGT CCA TGT AAA ATG TGT GTT G
	SAP14-as blunt	5'-AAG AGT ATC ACA TCC CTT TAA C
SAPLIP 15	SAP15-s blunt	5'-CTT CAG CAA ATC TGT TCT ATC TG
	SAP15-as blunt	5'-TTA GGT TTT TGT TCT AAA AGC TGG
SAPLIP 16	SAP16-s blunt	5'-CAA CAA AAA TGT AAA GTT TGT G
	SAP16-as blunt	5'-AAC ACA TTT ATT AGA ATG AAC AC

8.3 Sequenzen der genspezifische Oligonukleotide für die Mikroarray Analyse

AP-A:	5'-TCACTGCTACTCACCAAGGAGAAATCCTCTGCAACCTTTGCACTGGACTT
AP-B:	5'-GTTGATGAACTTGTCAAGCTTATTGAAAATCATGTTGACCCAGTCGTTGT
AP-C:	5'-AGTTATTTGTTCTCCTTTGTTTTGTTTTATGTTTAGCTTCTCAAGAAAA
SAPLIP 1:	5'-TTGATCTTATTCAAAGTAAAGTAGATCCTAATGCAATTTGTGCTCAAATG
SAPLIP 2:	5'-GAGAGCTTCCACAACATTATTGTTATTTTGTCTTGATGAATTATATTTTC
SAPLIP 3:	5'-GGATAAAATTGTTGATGCTATTATGGCACATGAATTATCAGACTCTGTTT
SAPLIP 4:	5'-TTATGGAAAAAATTCAGTTGAAAAAATGTGCAAGTTAATGGATCAATGT
SAPLIP 5:	5'-TGATGTTGCTATGAGATTAAGTGAAGTTGCTGTTAAAGTGTGTTGACCCAG
SAPLIP 6:	5'-ATGGAGAAGGTTGTTGATTTAATGATGAACGGTACTTCAGCTATGGAAAT
SAPLIP 7:	5'-TTGAAGAAGGAGTTACACCAATAACTGCTTGTAGCCAAATAAATAAGTGC
SAPLIP 8:	5'-CATTTGACCCATCAAAATTCGTTGTTAGTGAAGTGTGCTCTTCTCTTGGA
SAPLIP 9:	5'-AAAACAATGAAACAGTTGACACTACACTTTGCTCAAAGATCAACTTATGT
SAPLIP 10:	5'-ACTTTATCACATCAACAAGCCATGAAATGTGTCAAAAAGTCAAAATGTGT
SAPLIP 11:	5'-ACATCAGTAGCACATACTTTTGATCCATTAATAATTTGATGCAAAAAGCAGT
SAPLIP 12:	5'-GTAAGAGATCCTTTAACCTTTAATACTGAACAAACATGCAGAAAAATTGG
SAPLIP 13:	5'-AGAATAAAGACTTAACACCAAAAAGAATTGTGTTACAAAGTTGGTAGATGC
SAPLIP 14:	5'-AATATGCTGCTAATTTGTTTGATCCACAAGAAGTAAAATAAAGAAAATG
SAPLIP 15:	5'-CTGGAAATCAACTTTGTTACTTCATTAGGTTTTTGTCTAAAAGCTGGTAA
Aktin:	5'-TGTTGGAATTCAAGCTGTTCTTTCATTATATGCCTCAGGTAGAAGTACTG

Danksagung

Herrn Professor Dr. M. Leippe danke ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation. Besonders danken möchte ich für die vielen wegweisenden Anregungen, mit denen er meine wissenschaftliche Arbeit unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Gross möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Herrn Prof. Dr. Dr. J. Hacker für die Möglichkeit, alle praktischen Tätigkeiten am Zentrum für Infektionsforschung durchführen zu können, bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Conzelmann und Herrn PD Dr. W. Schmitz für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse und Frau T. Gronauer für die Durchführung der CD Spektroskopie, sowie Frau Dr. S. Theiß und Frau A. Schramm für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Mikroarray-Analysen.

Einen außerordentlichen und tief empfundenen Dank möchte ich Frau Dr. Heike Bruhn sagen, die mir unermüdlich und zu jeder Zeit praktisch und theoretisch mit hilfreichem Rat zur Seite stand und mich dadurch in jeder Weise unterstützt hat.

Lebenslauf

Name:	Julia Winkelmann	
Geburtstag:	01.01.1975	
Geburtsort:	Hamburg	
Schulbildung:	1981 – 1985	Katholische Grundschule Elsastraße, Hamburg
	1985 – 1994	Margaretha-Rothe-Gymnasium, Hamburg
	14.06.1994	Abitur
Berufsausbildung:	1994 - 1997	1. Studienabschnitt im Fach Biologie mit Studienziel Diplom, Universität Hamburg
	10/1997	Vordiplom (Gesamtnote: „sehr gut“)
	1997 – 2001	2. Studienabschnitt im Fach Biologie mit Studienziel Diplom, Universität Hamburg
	07 – 08/1998	Dänisch-deutsche Exkursion nach Disko Island, Grönland; Untersuchungen zur Meiofauna im Mellemfjord
	10/1999 – 02/2000	Diplomprüfungen im Hauptfach Zoologie und den Nebenfächern Mikrobiologie und Biochemie (Gesamtnote: „sehr gut“)
	03/2000 – 01/2001	Diplomarbeit, Universität Hamburg (Prof. W. Becker), erstellt in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. M. Leippe (Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg): „Molekulare Charakterisierung eines cytolytischen und antibakteriellen Proteins von <i>Eisenia foetida</i> “ (Note: „sehr gut“)
	seit 05/2001	Promotion, Zentrum für Infektionsforschung der Julius-Maximilians Universität Würzburg: „Molekulare Charakterisierung Saposin-ähnlicher Proteine von <i>Entamoeba histolytica</i> SCHAUDINN“ betreut durch Herrn Prof. Dr. M. Leippe