

**Etablierung eines intestinalen 2D-Sphäroidmodells  
zur Analyse des Invasionsverhaltens von  
*Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903).**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
*Doctor rerum naturalium*

vorgelegt von  
**Julieta Anders**

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
Universität Hamburg

2024

**1. Gutachterin: Prof. Dr. Iris Bruchhaus**

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Arbeitsgruppe „Wirt-Parasit-Interaktion“  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**2. Gutachter: Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger**

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Arbeitsgruppe „Zelluläre Parasitologie“  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**Datum der Disputation: 24.01.2025**

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben.

Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Hamburg, 19.09.2024

---

Juliett Anders

Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XII
Zusammenfassung .....	1
Summary.....	3
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Der intestinale Trakt .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1 Die Anatomie des intestinalen Trakts.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2 Die Mukusschicht .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3 Die intestinalen Zelltypen .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4 Das intestinale Mikrobiom.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 <i>Entamoeba histolytica</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1 Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2 Amöbiasis – Krankheitsbild, Diagnose und Therapie .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.3 Epidemiologie .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.4 Wirt-Parasit-Interaktionen während der intestinalen Invasion .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.5 Pathogener und nicht-pathogener <i>E. histolytica</i> Klon .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Modelle zur Erforschung der invasiven Amöbiasis.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.1 Organoide und Organoid-assoziierte Modelle zur Untersuchung der invasiven Amöbiasis .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.1 Organismen und Zelllinien .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>22</b>

## Inhaltsverzeichnis

2.1.4 Geräte .....	22
2.1.5 Puffer und Medien .....	24
2.1.6 Reaktionskits .....	30
2.1.7 Enzyme.....	30
2.1.8 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	30
2.1.9 Plasmide und Oligonukleotide .....	31
2.1.10 Webseiten und Datenbanken .....	31
2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Etablierung von aus intestinalen Sphäroiden generierten Epithelzellschichten .....	33
2.2.1.1 Kultivierung von <i>Roof plate-specific Spondin 1</i> -exprimierenden 293T-Zellen .....	33
2.2.1.2 Produktion von R-Spondin 1- <i>conditioned</i> Medium .....	33
2.2.1.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen .....	34
2.2.1.4 Kultivierung von <i>Wingless-related integration site 3a</i> -, R-Spondin 3- und Noggin-exprimierenden L-Zellen .....	34
2.2.1.5 Produktion von L-WRN- <i>conditioned</i> Medium.....	34
2.2.1.6 Bestimmung der WNT3a-Aktivität im L-WRN- <i>conditioned</i> Medium .....	35
2.2.1.7 Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen durch Hitzeschock .....	36
2.2.1.8 Plasmid-Medipräparation aus <i>Escherichia coli</i> Zellen .....	36
2.2.1.9 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	36
2.2.1.10 Isolierung von Krypten aus intestinalem Gewebe .....	37
2.2.1.11 Kultivierung intestinaler Sphäroide .....	37
2.2.1.12 Beschichtung von <i>transwell</i> -Einsätzen.....	38
2.2.1.13 Kultivierung von aus intestinalen Sphäroiden generierten Epithelzellschichten ....	38
2.2.2 Methoden zur Kultivierung und Vorbereitung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	39
2.2.2.1 Kultivierung von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	39
2.2.2.2 Ernte von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	39
2.2.2.3 Herstellung von Lysat aus <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	39
2.2.2.4 Bestimmung der Überlebensfähigkeit von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten unter aeroben Bedingungen.....	39

## Inhaltsverzeichnis

2.2.3 Co-Inkubation von intestinalen Epithelzellen mit <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	40
2.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Epithelzellschichten aus intestinalen Sphäroiden ...	41
2.2.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung .....	42
2.2.5.4 Überprüfung der Qualität isolierter RNA .....	44
2.2.5.5 Transkriptomanalyse .....	44
2.2.6 Statistik .....	45
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1 Arbeitsablauf zur Untersuchung der Interaktion zwischen <i>E. histolytica</i> Trophozoiten und Epithelzellen aus intestinalen Sphäroiden .....	46
3.2 Kultur von intestinalen Sphäroiden .....	47
3.2.1 Produktion von L-WRN <i>conditioned</i> -Medium .....	50
3.3 Generierung von Epithelzellschichten aus intestinalen Sphäroiden .....	52
3.3.1 Charakterisierung von intestinalen SDM-Kulturen .....	52
3.4 Effekt von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten auf die Integrität humaner Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden .....	57
3.4.2 Einfluss von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten auf die Integrität von Epithelzellkulturen aus Kolonsphäroiden .....	60
3.4.3 Einfluss von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten auf die Integrität von Epithelzellkulturen aus Dünndarmsphäroiden .....	62
3.5 Analyse der Parasiten- und Epithelzelltranskriptome .....	63
3.5.1 Das Transkriptom humaner Epithelzellen aus Kolonsphäroiden nach Kontakt zu A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	64
3.5.2 Das Transkriptom humaner Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden nach Kontakt zu A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	71
3.5.3 Das Transkriptom von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach Kontakt zu humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden .....	78
3.5.4 Das Transkriptom von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach Kontakt zu humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden .....	85
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>93</b>
4.1 Etablierung intestinaler Sphäroidkulturen .....	93

## Inhaltsverzeichnis

4.2 Etablierung und Charakterisierung von Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden.....	95
4.3 Co-Inkubation von <i>E. histolytica</i> Trophozoiten mit Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden.....	98
4.3.1 Effekt von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten auf die Barrierefunktion intestinaler Epithelzellen .....	99
4.3.2 Effekt auf das Transkriptom humaner Kolonepithelzellen nach Kontakt zu A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten.....	102
4.3.3 Effekt auf das Transkriptom humaner Dünndarmepithelzellen nach Kontakt zu A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten .....	104
4.3.4 Effekt auf das Transkriptom von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach Kontakt zu Kolonepithelzellen .....	105
4.3.5 Effekt auf das Transkriptom von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach Kontakt zu Dünndarmepithelzellen im Vergleich zu Kolonepithelzellen .....	108
4.3.6 Fazit.....	110
5 Anhang.....	111
6 Literaturverzeichnis.....	146
7 Publikationen .....	173
8 Danksagung.....	174

## Abkürzungsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis**

-G/-H	Ohne G-418 und Hygromycin B
3D	Dreidimensional
ABP	<i>Actin-binding protein</i>
AJ	<i>Adherens junction</i>
ALA	Amöbenleberabszess
ALI	<i>Air-liquid interface</i>
AMP	Antimikrobielles Peptid
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AP	<i>Activator protein</i>
ATAD	<i>ATPase family AAA domain containing</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BME	<i>Basement membrane extract</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C.	<i>Cryptosporidium</i>
Caco	<i>Cancer coli</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosin monophosphate</i>
CCK	Cholecystokinin
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
cGMP-PKG	<i>Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CM	<i>Conditioned Medium</i>
COX	<i>Cytochrome C oxidase assembly factor</i>
CP	Cysteinpeptidase
CREM	<i>cAMP response element modulator</i>
CT	<i>Cycle of threshold</i>
CXCL	<i>CXC motif chemokine ligand</i>
D.	<i>Dictyostelium</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

## Abkürzungsverzeichnis

DAPT	<i>N</i> -[ <i>N</i> -(3,5-Difluorphenacetyl)- <i>L</i> -alanyl]- <i>S</i> -phenylglycin- <i>tert</i> -butylester
DBZ	Dibenzazepin
DC	<i>Dendritic cell</i> , Dendritische Zelle
dd	Doppelt destilliert
DEG	Differenziell exprimierte Gene
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Entamoeba</i>
EC	<i>Epithelial cell</i> , Epithelzelle
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EEZ	Enteroendokrine Zellen
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eh	<i>Entamoeba histolytica</i>
EHEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
EP <sub>4</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub> Rezeptor 4
ErB	<i>Epidermal growth factor receptor B</i>
F	Filamentös
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False discovery rate</i> , Falscherkennungsrate
FOS	<i>Fos proto-oncogene</i>
FOSB	<i>FosB proto-oncogene</i>
FOSL	<i>FOS-like</i>
<i>G.</i>	<i>Giardia</i>
Gal/GalNAc	Galaktose/ <i>N</i> -Acetylgalaktosamin
GIP	<i>Gastric inhibitory protein</i>
GLP1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GOI	<i>Gene of interest</i> , Zielgen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>

## Abkürzungsverzeichnis

hi	Hitzeinaktiviert
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IEC	<i>Intestinal epithelial cell</i> , intestinale Epithelzelle
IEL	Intraepithelialer Lymphozyt
IFA	<i>Immunofluorescence assay</i> , Immunfluoreszenzfärbung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i> , angeborene lymphatische Zelle
JUN	<i>Jun proto-oncogene</i>
JUNB	<i>JunB proto-oncogene</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes</i>
L.	<i>Leishmania</i>
L-WRN-Zellen	WNT3A-, R-Spondin 3- und Noggin-exprimierende L-Zellen
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEPR	<i>Leptin receptor</i>
LGR5	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5</i>
LYZ	Lysozym
M-Zelle	Mikrofalten-Zelle
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetallopeptidase (nur Abb)
MO	Mikroorganismen
MP	Metallopeptidase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MUC2	<i>Mucin 2</i> , Muzin 2
MW	Mediumwechsel
MyD	<i>Myeloid differentiation primary response</i>
Na	Natrium
NAC	<i>N-Acetylcystein</i>
nc	<i>Non-coding</i> , nicht kodierend
NDUFB	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear-factor <math>\kappa</math>-light-chain enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>

## Abkürzungsverzeichnis

NHE3	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger 3</i> , Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter 3
NIC	Nikotinamid
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
np	Nicht pathogen
NTS	Neurotensin
p	Pathogen
PCA	<i>Principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K/AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
pRL-SV40	Plasmid <i>Renilla</i> Luciferase-Simian-Virus 40
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RELM	<i>Resistin-like molecule</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RLU	<i>Relative light unit</i> , relatives Lumineszenzsignal
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> , reactive Stickstoffspezies
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reactive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
R-Spondin	<i>Roof plate-specific-Spondin</i>
R-Spondin-Zellen	<i>Roof plate-specific-Spondin-1</i> -exprimierende 293T-Zellen
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Shigella</i>
SCFA	<i>Short chain fatty acid</i> , kurzkettige Fettsäure
SCID-hu-mu	<i>Severe combined immunodeficiency</i> murin-human intestinal
SCT	Sekretin
SDM	<i>Spheroid-derived monolayer</i> , Zellschicht aus Sphäroiden
Sig	Sekretorisches Immunglobulin

## Abkürzungsverzeichnis

SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SOX9	<i>SRY-box transcription factor 9</i>
SST	Somatostatin
T.	<i>Trichomonas</i>
TAC1	Tachykinin 1
TBS	<i>Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung</i>
TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
TCM	<i>Transcripts per million</i>
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TJ	<i>Tight junction</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPM	<i>Transcripts per million</i>
TY	TYI-S-33
TYY1	<i>Peptide tyrosine tyrosine 1</i>
UQCR	<i>Ubiquinol-cytochrome C reductase, complex III subunit</i>
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>
ZG	<i>Zymogen granulae protein</i>
ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>
ÜS	Überstand

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der intestinalen Mukosa. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 2: Übersicht über den Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 3: Übersicht über die Immunpathogenese bei intestinaler Amöbiasis. . Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 4: Charakterisierung intestinaler Sphäroidkulturen..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 5: Repräsentative mikroskopische Bilder differenzierter 3D-Kulturen. . Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Produktion und Qualitätskontrolle von L-WRN-*conditioned* Medium..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 7: Kulturbedingungen und Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstands der intestinalen Epithelzellkulturen verschiedener Spezies und Gewebe..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 8: Charakterisierung humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden mittels Immunofluoreszenzfärbung. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 9: Polarisierung humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 10: Einfluss von *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten generiert aus intestinalen Sphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 11: Vergleich des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten aus Kolonsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 12: Vergleich des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 13: Vorbereitung der Proben für die Transkriptomanalyse. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 14: Transkriptomanalyse von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Kolonsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildung 15: Vergleich der nach 4 h und 8 h Inkubationszeit differenziell exprimierten Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Kolonsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 16:** Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 4 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 17:** Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 18:** Transkriptomanalyse von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Dünndarmsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 19:** Vergleich der nach 4 h und 8 h Inkubationszeit differenziell exprimierten Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Dünndarmsphäroiden. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 20:** Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 4 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 21:** Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 22:** Analyse des Transkriptoms von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit Epithelzellen aus humanen Kolonsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 23:** Analyse differenziell exprimierter Gene von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 24:** Signifikant regulierte Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, bei mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten *E. histolytica* Trophozoiten. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 25:** Analyse des Transkriptoms von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit Epithelzellen aus humanen Dünndarmsphäroiden..... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 26:** Analyse differenziell exprimierter Gene von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden. Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung 27:** Signifikant regulierte Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, bei mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten *E. histolytica* Trophozoiten. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung A28:** Übersichtskarten der Plasmide pRL-SV40P (A) und M50 Super 8x TOPFlash (B). .... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung A29:** Relative mRNA-Konzentrationen der Markergene *ehi\_042870* und *ehi\_127670*. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.
- Abbildung A30:** Adhärente *E. histolytica* Trophozoiten nach 24 h unter aeroben Bedingungen. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung A31: GO *enrichment* der Kategorie „Biologischer Prozess“ signifikant hochregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten über 4 h inkubierten Kolonepithelzellen. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.**

**Abbildung A32: GO-*terms* gemeinsam regulierter Gene bei humanen Dünndarmepithelzellen nach Kontakt zu *E. histolytica* Trophozoiten..... Fehler! Textmarke nicht definiert.**

**Abbildung A33: KEGG-Stoffwechselwege signifikant herunterregulierter Gene bei Dünndarmepithelzellen. .... Fehler! Textmarke nicht definiert.**

**Abbildung A34: GO-*terms* signifikant hochregulierter Gene bei Dünndarmepithelzellen nach Kontakt zu *E. histolytica* Trophozoiten..... Fehler! Textmarke nicht definiert.**

**Abbildung A35: GO-*terms* gemeinsam regulierter Gene bei *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu Kolonepithelzellen..... Fehler! Textmarke nicht definiert.**

**Abbildung A36: GO-*terms* gemeinsam regulierter Gene bei *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu Kolonepithelzellen..... Fehler! Textmarke nicht definiert.**

## Tabellenverzeichnis

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Auflistung verwendeter Organismen.</b> .....	20
<b>Tabelle 2: Auflistung verwendeter Zelllinien.</b> .....	20
<b>Tabelle 3: Auflistung verwendeter Chemikalien und Reagenzien.</b> .....	21
<b>Tabelle 4: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien.</b> .....	22
<b>Tabelle 5: Auflistung verwendeter Geräte.</b> .....	22
<b>Tabelle 6: Auflistung verwendeter Medien.</b> .....	24
<b>Tabelle 7: Auflistung verwendeter Mediumszusätze.</b> .....	26
<b>Tabelle 8: Auflistung verwendeter Puffer.</b> .....	28
<b>Tabelle 9: Auflistung verwendeter Antibiotika.</b> .....	29
<b>Tabelle 10: Auflistung verwendeter Reaktionskits.</b> .....	30
<b>Tabelle 11: Auflistung verwendeter Enzyme.</b> .....	30
<b>Tabelle 12: Auflistung verwendeter Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.</b> .....	30
<b>Tabelle 13: Auflistung verwendeter Plasmide.</b> .....	31
<b>Tabelle 14: Auflistung verwendeter Oligonukleotide.</b> .....	31
<b>Tabelle 15: Auflistung verwendeter Websites, Software und Datenbanken.</b> .....	31
<b>Tabelle 16: Ansatz für die transiente Co-Transfektion von HEK293T-Zellen.</b> .....	35
<b>Tabelle 17: Ablauf der RT-qPCR.</b> .....	43
<b>Tabelle 18: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR <math>p &lt; 0,05</math>, FC <math>\leq -1,8</math> und <math>\geq 1,8</math>) bei mit A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h oder 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden (n = 3).</b> .....	66
<b>Tabelle 19: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR <math>p &lt; 0,05</math>, FC <math>\leq -1,8</math> und FC <math>\geq 1,8</math>) bei mit A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h oder 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden (n = 3-6).</b> .....	73
<b>Tabelle 20: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR <math>p &lt; 0,05</math>, FC <math>\leq -2</math> und <math>\geq 2</math>) bei A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h oder 8 h Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden.</b> .....	80
<b>Tabelle 21: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) hochregulierter Gene (FC <math>\geq 2</math>, FDR <math>p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach <i>p</i>-Wert.</b> .....	83
<b>Tabelle 22: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) hochregulierter Gene (FC <math>\geq 2</math>, FDR <math>p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach <i>p</i>-Wert.</b> .....	83

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 23: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) herunterregulierter Gene (<math>FC \leq -2</math>, <math>FDR p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach <i>p</i>-Wert.....</b>	<b>84</b>
<b>Tabelle 24: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) herunterregulierter Gene (<math>FC \leq -2</math>, <math>FDR p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach <i>p</i>-Wert.....</b>	<b>84</b>
<b>Tabelle 25: Anzahl signifikant regulierter Gene (<math>FDR p &lt; 0,05</math>, <math>FC \leq -2</math> und <math>FC \geq 2</math>) bei A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h oder 8 h Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden. ....</b>	<b>87</b>
<b>Tabelle 26: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms hochregulierter Gene (<math>FC \geq 2</math>, <math>FDR p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach <i>p</i>-Wert. ....</b>	<b>90</b>
<b>Tabelle 27: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms hochregulierter Gene (<math>FC \geq 2</math>, <math>FDR p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach <i>p</i>-Wert. ....</b>	<b>90</b>
<b>Tabelle 28: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms herunterregulierter Gene (<math>FC \leq -2</math>, <math>FDR p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach <i>p</i>-Wert. ....</b>	<b>91</b>
<b>Tabelle 29: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms herunterregulierter Gene (<math>FC \leq -2</math>, <math>FDR p &lt; 0,05</math>) mit den höchsten <i>fold enrichment</i> Werten bei <i>E. histolytica</i> Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach <i>p</i>-Wert. ....</b>	<b>91</b>
<b>Tabelle A30: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (<math>FDR p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>115</b>
<b>Tabelle A31: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (<math>FDR p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>117</b>
<b>Tabelle A32: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (<math>FDR p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>118</b>
<b>Tabelle A33: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (<math>FDR p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>118</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle A34: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle. ....</b>	<b>121</b>
<b>Tabelle A35: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle. ....</b>	<b>123</b>
<b>Tabelle A36: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>125</b>
<b>Tabelle A37: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>127</b>
<b>Tabelle A38: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>130</b>
<b>Tabelle A39: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>132</b>
<b>Tabelle A40: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten B2<sup>p</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>134</b>
<b>Tabelle A41: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten B2<sup>p</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>137</b>
<b>Tabelle A42: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle. ....</b>	<b>139</b>
<b>Tabelle A43: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 8 h mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle. ....</b>	<b>142</b>
<b>Tabelle A44: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR <math>p \leq 0,05</math>) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten B2<sup>p</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.....</b>	<b>144</b>

Zusammenfassung

## Zusammenfassung

Der Humanparasit *Entamoeba (E.) histolytica*, ist der Auslöser der Infektionskrankheit Amöbiasis, an der im Jahr 2016 mehr als 26.000 Menschen starben. Die Mehrzahl der Infektionen verläuft symptomlos, jedoch kommt es bei etwa 10 % der Betroffenen zu einem invasiven Krankheitsverlauf, bei dem der Parasit die Darmmukosa des Kolons durchdringt und erhebliche Gewebeschäden verursacht. In 3-9 % der invasiven Fälle kommt es zu einer extraintestinalen Amöbiasis, die durch die Bildung von Abszessen hauptsächlich in der Leber gekennzeichnet ist (auch bekannt als Amöbenleberabszess, ALA). Die Auslöser des invasiven Verhaltens der Trophozoiten von *E. histolytica* sind derzeit nur teilweise bekannt. Um den Invasionsprozess besser zu verstehen, wurden die Interaktionen zweier genetisch identischer Klone des *E. histolytica* Isolats HM-1:IMSS, die sich in ihrer Fähigkeit zur Induktion von ALA im Tiermodell unterscheiden, mit intestinalen Epithelzellen aus primären humanen Dünndarm- und Kolonsphäroiden (SDM-Kulturen) untersucht. Dazu wurde der *E. histolytica* A1<sup>np</sup> Klon als nicht pathogener (np) Klon und der B2<sup>p</sup> Klon als pathogener (p) Klon verwendet.

Zunächst wurde die Kultur dreidimensionaler intestinaler Sphäroide etabliert, aus denen anschließend differenzierte SDM-Kulturen im *transwell*-System generiert wurden. Die SDM-Kulturen wurden hinsichtlich der Präsenz differenzierter Zelltypen, der apikal-basolateralen Polarisierung und der elektrophysiologischen Dichtigkeit charakterisiert, bevor sie für die Co-Kultivierung mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten verwendet wurden.

B2<sup>p</sup> Trophozoiten degradierten die Integrität der Kolonepithelzellschicht, bestimmt durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes, unabhängig von der eingesetzten Zellzahl effizienter als A1<sup>np</sup> Trophozoiten und lösten eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Genen wie *CXCL8*, *IL6*, *IL1B* oder *IL1A* sowie die Aktivierung von Schlüsselsignalwegen wie den NF- $\kappa$ B-Signalweg aus. A1<sup>np</sup> Trophozoiten induzierten eine erhöhte Expression von Genen, die an der oxidativen Phosphorylierung und dem Metabolismus beteiligt sind und mit der Geweberegeneration assoziiert werden.

Im Gegensatz dazu beeinflussten A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten in niedriger Anzahl die Integrität von Dünndarmepithelzellen nicht. In hoher Anzahl schädigten A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten die Barrierefunktion von Dünndarmepithelzellen ähnlich effektiv und lösten gleichermaßen eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Genen wie unter anderem *CXCL8* und *IL1B* aus.

A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten regulierten ihre Genexpression unterschiedlich nach Kontakt zu intestinalen Epithelzellen, wobei ein Großteil der differenziell exprimierten Gene für hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion kodierte. Gene, die an der Regulierung der Bewegungsfähigkeit und der

## Zusammenfassung

Reaktion auf oxidativen Stress beteiligt sind, waren B2<sup>p</sup>-spezifisch hochreguliert. In A1<sup>np</sup> Trophozoiten waren hauptsächlich Gene des Proteinmetabolismus hochreguliert.

Zusammengefasst unterscheidet sich der Invasionsprozess zwischen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten ausschließlich bei Kolonepithelzellen, wobei sich der B2<sup>p</sup> Klon aggressiver verhielt und in den Wirtszellen eine pro-inflammatorische Reaktion auf mRNA-Ebene hervorrief.

## Summary

### Summary

The human parasite *Entamoeba (E.) histolytica* causes amoebiasis, an infectious disease that killed more than 26,000 people in 2016. Most infections are asymptomatic; however, about 10 % of affected individuals develop an invasive form of the disease, in which the parasite penetrates the colonic mucosa, causing significant tissue damage. In 3-9 % of invasive cases, extraintestinal amoebiasis occurs, characterized by the formation of abscesses that are manifested mainly in the liver (also known as amoebic liver abscess, ALA). Currently, the triggers of the invasive behavior of *E. histolytica* trophozoites are only partially understood. To better understand the invasion process, the interactions of two genetically identical clones of the *E. histolytica* isolate HM-1:IMSS, which differ in their ability to induce ALAs in a mouse model, with human primary spheroid-derived epithelial cells of the small intestine and colon (SDM cultures) were investigated. For this purpose, the *E. histolytica* clone A1<sup>np</sup> was used as the non-pathogenic (np) clone and the clone B2<sup>p</sup> as the pathogenic (p) clone.

First, the culture of three-dimensional intestinal spheroids was established, from which differentiated SDM cultures were subsequently generated in a transwell system. The SDM cultures were characterized in terms of the presence of differentiated cell types, apical-basolateral polarization and electrophysiological tightness before being used for co-cultivation with A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup> trophozoites.

B2<sup>p</sup> trophozoites degraded the integrity of the colonic epithelial cell layer, as determined by measuring transepithelial electrical resistance, more efficiently than A1<sup>np</sup> trophozoites, regardless of the cell number used, and triggered increased expression of pro-inflammatory genes such as *CXCL8*, *IL6*, *IL1B* and *IL1A* and activation of key signaling pathways such as the NF- $\kappa$ B pathway. A1<sup>np</sup> trophozoites induced increased expression of genes involved in oxidative phosphorylation and metabolism, which are associated with tissue regeneration.

In contrast, A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup> trophozoites in low numbers did not affect the integrity of epithelial cells of the small intestine. In high numbers, A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup> trophozoites were similarly effective in damaging the barrier function of epithelial cells of the small intestine and induced increased expression of pro-inflammatory genes such as *CXCL8* and *IL1B*, among others.

A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup> trophozoites differentially regulated their gene expression after contact with intestinal epithelial cells, with the majority of differentially expressed genes encoding hypothetical proteins of unknown function. Genes involved in the regulation of motility and oxidative stress response were upregulated in a B2<sup>p</sup>-specific manner. In A1<sup>np</sup> trophozoites, mainly genes involved in protein metabolism were upregulated.

## Summary

In summary, the invasion process between A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup> trophozoites differed exclusively in colonic epithelial cells, with the B2<sup>p</sup> clone behaving more aggressively and eliciting a pro-inflammatory response in host cells at mRNA level.

## 1 Einleitung

# 1 Einleitung

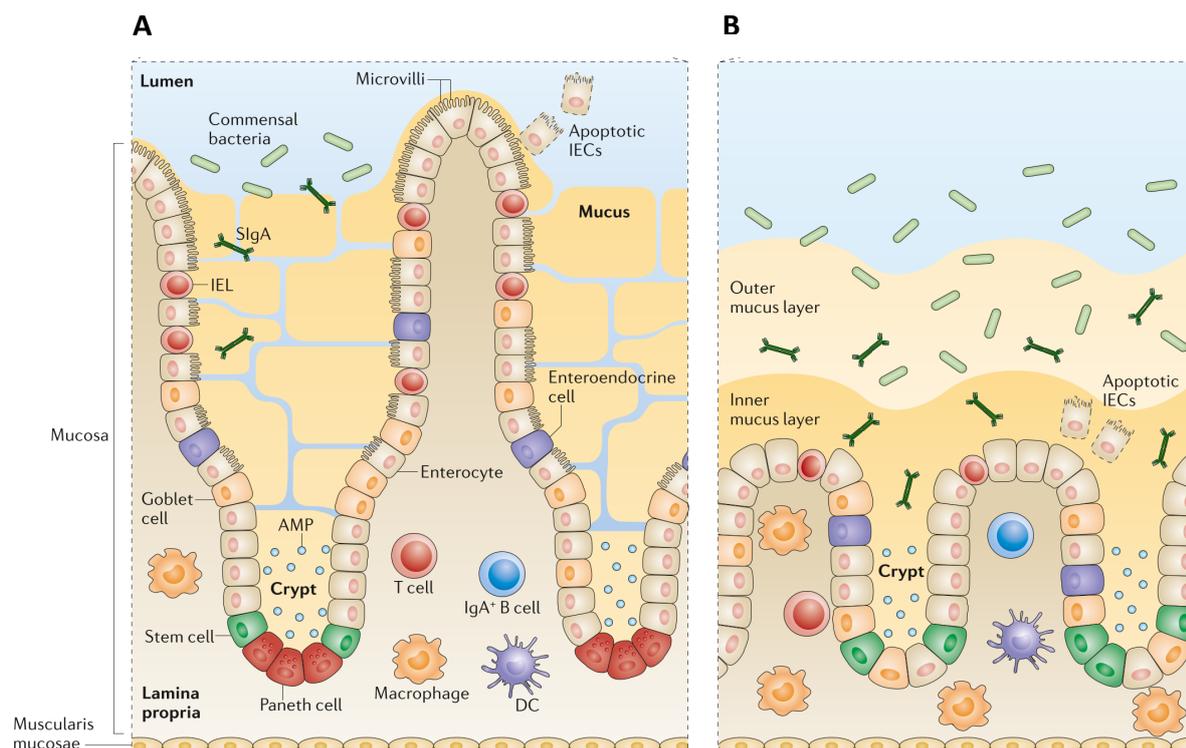
### 1.1 Der intestinale Trakt

Die hohlen, röhrenförmigen Organe des Intestinaltrakts sind für die Verdauung, die Absorption von Nährstoffen und Wasser, die Exkretion sowie den Schutz vor Pathogenen verantwortlich<sup>7; 8; 9</sup>. Unterteilt wird der intestinale Trakt in den Dünndarm, bestehend aus *Duodenum*, *Jejunum* und *Ileum* und den Dickdarm, weiter unterteilt in *Caecum*, *Colon* und *Rectum*<sup>6</sup>. Der Dünndarm ist primär für die Nährstoffaufnahme verantwortlich, während der Dickdarm hauptsächlich Wasser absorbiert<sup>7</sup>. Der Intestinaltrakt bildet die größte Barriere des Körpers zur Umwelt und beherbergt gleichzeitig die umfangreichste Population residenter Immunzellen, die durch das intestinale Epithelium von den luminalen Mikroorganismen (MO), dem Mikrobiom, separiert werden<sup>6; 9</sup>. Die Herausforderung des intestinalen Epitheliums besteht darin, den Organismus vor eindringenden Pathogenen zu schützen und gleichzeitig die Präsenz kommensaler MO zu tolerieren<sup>8; 9</sup>.

#### 1.1.1 Die Anatomie des intestinalen Trakts

Die Oberfläche des humanen Dünndarms beträgt geschätzt 30 m<sup>2</sup> bei einer Länge von 6-7 m<sup>10</sup>. Der Dickdarm ist mit einer Länge von in etwa 1,5 m und einer Oberfläche von ungefähr 2 m<sup>2</sup> vergleichsweise klein<sup>6; 10</sup>. Im Dünndarm tragen Kerckring-Falten (*Plicae circularis*), Villi und Lieberkühn-Krypten sowie Mikrovilli auf der apikalen Seite intestinaler Epithelzellen (*epithelial cell*, EC) zur  $\approx 127$ -fachen Oberflächenvergrößerung bei<sup>10</sup>. Im Dickdarm fehlen Kerckring-Falten und Villi, sodass Krypten und Mikrovilli allein zu einer  $\approx 6,5$ -fachen Vergrößerung der Oberfläche führen<sup>10</sup>. Die Oberfläche des intestinalen Trakts ist mit einer einlagigen Schicht aus kolumnaren polarisierten EC ausgekleidet, die zusammen mit der aufliegenden Mukusschicht die muko-epitheliale Barriere gegen Mikroorganismen bildet (Abbildung 1)<sup>6; 8; 9</sup>. Basal der Epithelzellschicht befindet sich die *Lamina propria*, die aus lockerem Bindegewebe besteht<sup>6</sup>. Sie dient dem Epithelium als Gerüst, beherbergt Blut- und Lymphgefäße sowie Nervengewebe und Immunzellen<sup>6</sup>. Unter der *Lamina propria* befindet sich eine einlagige Schicht aus Muskelzellen, die *Muscularis mucosae*<sup>6</sup>.

## 1 Einleitung



**Abbildung 1: Aufbau der intestinalen Mukosa.**

Der Aufbau der Mukosa des Dünndarms (A) und des Dickdarms (B) sind vergleichend dargestellt. Intestinale Epithelzellen (*intestinal epithelial cell*, IEC) entstehen aus Stammzellen (grün), die an der Basis der Krypten lokalisiert sind. Absorbierende Enterocyten des Dünndarms (braun) bzw. Kolonozyten des Dickdarms (braun), Goblet Zellen (orange), Enteroendokrine Zellen (lila), Mikrofalten- und Tuft Zellen (nicht dargestellt) entwickeln sich aus intestinalen Stammzellen und migrieren in Richtung Villuspitze (links, Dünndarm) bzw. Epitheloberfläche (rechts, Dickdarm). Paneth Zellen (rot) sind ausschließlich im Dünndarm präsent und migrieren in Richtung Basis der Krypte. Apoptische Epithelzellen werden ins Darmlumen abgegeben. Basolateral des Epithels liegt die *Lamina propria*, die Immunzellen wie Dendritische Zellen, Makrophagen oder T-Zellen beherbergt. Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) befinden sich zwischen den Epithelzellen. Apikal der Epithelzellschicht befindet sich die Mukusschicht, die im Dünndarm einlagig und im Dickdarm zweilagig ist und eine Barriere gegenüber Mikroorganismen bildet. Sig: sekretorisches Immunglobulin, Ig: Immunglobulin, AMP: antimikrobielles Peptid, DC: *dendritic cell*, Dendritische Zelle. Abbildung aus Mowat und Agace (2014)<sup>6</sup>.

### 1.1.2 Die Mukusschicht

Die apikale Membran der intestinalen EC ist mit einer Glykokalyx aus transmembranen Muzinen, hoch-glykolisierten Proteinen, bedeckt. Intestinale EC werden zusätzlich von einer schützenden Schicht aus Mucus, die hauptsächlich aus Gel-formenden Muzin 2-Polymeren besteht, überlagert<sup>11</sup>. Durch die starke Glykolisierung des Kernproteins, sind Muzine vollständig vor dem Abbau durch Proteasen geschützt<sup>11</sup>. Der Dünndarm besitzt eine lose Mukusschicht, während das Dickdarmepithel von einer festen inneren und einer losen äußeren Mukusschicht umgeben wird. Bakterien besiedeln die äußere Mukusschicht des Dickdarms, während sie im inneren Mucus normalerweise nicht zu finden sind<sup>12; 13</sup>. Eine gestörte Synthese von Muzin 2, führt zu einer erhöhten Invasion kommensaler Bakterien in das Epithelium des Colons im Mausmodell<sup>14</sup>. Zudem ist die Mukusschicht bei Patienten mit ulzerativer Kolitis dünner<sup>15</sup>.

## 1 Einleitung

### 1.1.3 Die intestinalen Zelltypen

Die Zelltypen des intestinalen Epitheliums können in sekretorische und absorbierende Zellen eingeteilt werden<sup>16; 17</sup>. Absorbierende Zellen werden im Dünndarm Enterozyten und im Dickdarm Kolonozyten genannt. Zu den sekretorischen Zelltypen gehören Goblet Zellen, Enteroendokrine Zellen, Tuft Zellen und Paneth Zellen, wobei letztere ausschließlich im Dünndarm vorkommen<sup>17</sup>. Ein weiterer Typ intestinaler Epithelzellen sind spezialisierte Mikrofalten- (M-) Zellen.

Alle differenzierten intestinalen Zelltypen stammen von adulten intestinalen *leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5* positiven (LGR5<sup>+</sup>-) Stammzellen ab, die an der Basis der Lieberkühn-Krypten lokalisiert sind und sich kontinuierlich selbst erneuern<sup>18; 19</sup>. Im Dünndarm sind intestinale Stammzellen von Paneth Zellen umringt, während dieser Zelltyp im Dickdarm fehlt<sup>16; 19</sup>. Als Stammzellnische wird die Mikroumgebung bezeichnet, die zum direkten Erhalt der Stammzellen notwendig ist und durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Signalwegen wie dem *wingless-related integration site* (WNT-), Notch- oder *bone morphogenetic protein* (BMP-) Signalweg gekennzeichnet ist<sup>16; 20</sup>. Intestinale Stammzellen bringen zunächst Vorläuferzellen hervor (*transit amplifying cells* der absorbierenden Linie und sekretorische Vorläuferzellen), die im Falle der absorbierenden Zelltypen vor der endgültigen Differenzierung und Reifung weitere Zellteilungen durchlaufen<sup>18; 20; 21</sup>. Zellen der sekretorischen Linie differenzieren sich direkt aus den Stammzellen<sup>20</sup>. Mit Ausnahme von Paneth Zellen, die in Richtung Kryptenbasis wandern, migrieren differenzierende Zellen von der Basis der Krypten in Richtung Villusspitze im Dünndarm bzw. Epitheloberfläche im Dickdarm<sup>16; 17; 19</sup>. Nach 4-5 Tagen durchlaufen differenzierte Zellen den Prozess der Apoptose und werden ins Darmlumen abgegeben<sup>19</sup>. Neben den aktiven proliferierenden Stammzellen existiert eine zweite, sich nicht-teilende „+4“ Stammzellpopulation, benannt nach ihrer Position in der Krypte<sup>16</sup>. Epitheliale und mesenchymale Zellen sezernieren Signalmoleküle wie Cytokine oder Wachstumsfaktoren, die die Proliferations- und Differenzierungsaktivität der Stammzellen regulieren<sup>22</sup>.

Enterozyten des Dünndarms und Kolonozyten des Dickdarms sind der häufigste intestinale Zelltyp und für die Absorption von Nährstoffen und Wasser zuständig<sup>18; 23; 24</sup>. Nährstoffe werden hauptsächlich von den Enterozyten absorbiert, während Kolonozyten primär Wasser und Elektrolyte aufnehmen<sup>7</sup>. Dazu ist die apikale Oberfläche der Entero- und Kolonozyten durch das Vorhandensein von Mikrovilli, die die *brush border* bilden, stark vergrößert<sup>18</sup>. Makromoleküle wie Fettsäuren, Aminosäuren, Zucker oder Ionen können transzellulär durch Rezeptor-vermittelte Endozytose oder parazellulär zwischen benachbarten Zellen von der apikalen Seite zur basolateralen Seite der Zellen transportiert werden<sup>24</sup>.

Die Abundanz von Goblet Zellen nimmt vom Dünndarm, wo sie weniger als 10 % aller EC ausmachen, in Richtung des distalen Kolons, mit einem Anteil von 25 % aller EC, zu<sup>6</sup>. Primär sind Goblet Zellen für

## 1 Einleitung

den Aufbau und die Aufrechterhaltung der schützenden Mukusschicht verantwortlich, indem sie Muzine, hauptsächlich Muzin 2, sezernieren<sup>18; 25</sup>. Neben Muzinen sezernieren Goblet Zellen Cytokine, Chemokine sowie antimikrobielle Peptide (AMP) wie *resistin-like molecule* (RELM-)  $\beta$  und *zymogen granulae protein* (ZG) 16, die zusammen mit dem Mukus den Kontakt zwischen dem intestinalen Epithelium und kommensalen sowie pathogenen MO verhindern<sup>25; 26; 27; 28</sup>.

Tuft Zellen sind chemosensorische Zellen, die an intestinalen Immunreaktionen beteiligt sind und 0,4-2 % der EC im Intestinaltrakt ausmachen<sup>29; 30; 31</sup>. Tuft Zellen sind insbesondere im Kontext von Infektionen mit Helminthen erforscht, während der sie die Typ 2 Immunantwort über die Sezernierung von Interleukin (IL-) 25 auslösen<sup>31; 32; 33</sup>. Die daraus resultierende IL-13 Freisetzung durch angeborene lymphatische Zellen (*innate lymphoid cells*, ILC) des Typs 2 induziert die Differenzierung intestinaler Vorläuferzellen in Richtung Goblet Zellen und Tuft Zellen, deren Anteil im intestinalen Epithelium während einer parasitären Infektion ansteigt<sup>31; 33</sup>.

Enteroendokrine Zellen (EEZ) sezernieren zahlreiche verschiedene Hormone und sind dadurch an einem breiten Spektrum physiologischer Prozesse wie der intestinalen Muskelkontraktion, dem Insulinstoffwechsel oder Entzündungsreaktionen beteiligt<sup>34</sup>. Abhängig vom sezernierten Hormon werden sie in verschiedene Subtypen unterteilt. Zu den Subtypen gehören Serotonin und Tachykinin 1 (TAC1) produzierende Enterochromaffin Zellen, *glucagon-like peptide-1* (GLP1) und *peptide tyrosine tyrosine 1* (TYY1) produzierende L-Zellen, *gastric inhibitory protein* (GIP) produzierende K-Zellen, Somatostatin (SST) produzierende D-Zellen, Cholecystokinin (CCK) produzierende I-Zellen, Neurotensin (NTS) produzierende N-Zellen und Sekretin (SCT) produzierende S-Zellen<sup>34; 35</sup>. Entgegen dem Model der Subtypen exprimieren EEZ zum Teil Hormone mehrerer Subtypen gleichzeitig, was eine eindeutige Einteilung erschwert<sup>34; 36</sup>.

M-Zellen besitzen keine Glykokalyx und gehören dem follikelassoziierten Epithel an, das zwischen Darmlumen und Darm-assoziierten Lymphgeweben, wie isolierten Lymphfollikeln oder den Peyer Plaques des Dünndarms, liegt<sup>37</sup>. M-Zellen präsentieren Kommensale und Pathogene an basolateral liegende Immunzellen und fungieren als „Wächter“ des intestinalen Mikrobioms<sup>38</sup>.

Paneth Zellen kommen im Dünndarm, nicht aber im Dickdarm vor und sind mit einer Lebensspanne von mehreren Monaten im Vergleich zu anderen intestinalen EC deutlich langlebiger<sup>39</sup>. Im Gegensatz zu allen anderen EC-Typen migrieren sie in Richtung Kryptenbasis und sezernieren dort zum Schutz benachbarter Stammzellen AMP wie Lysozym oder Defensine sowie Faktoren zur Aufrechterhaltung der Stammzellnische wie Liganden von WNT- und Notch-Rezeptoren<sup>20; 39; 40; 41</sup>. Im Dickdarm wird die Aufrechterhaltung der Stammzellennische von *deep crypt secretory cells* übernommen<sup>42</sup>.

## 1 Einleitung

Intestinale EC bilden zusammen mit der Mukusschicht, der Glykokalyx sowie ihren Zell-Zell-Verbindungen wie *tight junctions* (TJ), *adherens junctions* (AJ) und Desmosomen eine physikalische Barriere, die vor dem Eindringen pathogener MO schützt.

### 1.1.4 Das intestinale Mikrobiom

Das intestinale Mikrobiom umfasst alle kommensal im Intestinaltrakt lebenden MO wie Bakterien, Archaeen, Viren und Eukaryoten, die an wichtigen metabolischen, physiologischen und immunologischen Prozessen beteiligt sein können<sup>43; 44; 45; 46</sup>. Sie verarbeiten unverdauliche komplexe Kohlenhydrate wie Zellulose, Hemizellulose oder resistente Stärke zu kurzkettigen Fettsäuren (*short chain fatty acids*, SCFA), die dem Wirtsorganismus wiederum Energie liefern und immunmodulatorische sowie regulatorische Funktionen ausführen<sup>47; 48; 49</sup>. Kommensale MO produzieren AMP und konkurrieren mit pathogenen MO um Nährstoffe und Anheftungsstellen an den Muzinen des Mukus, wodurch sie eine schützende Funktion für den Wirt ausüben<sup>50</sup>. Mehr als  $10^{14}$  MO besiedeln den intestinalen Trakt, wobei der Dickdarm die höchste Anzahl an MO und gleichzeitig die höchste Anzahl verschiedener Spezies berherbergt<sup>37; 43; 51</sup>. Der Großteil des intestinalen Mikrobioms hat einen obligat anaeroben Stoffwechsel, wobei auch fakultative anaerob und aerob lebende MO vorkommen<sup>43; 52</sup>. Mehr als 99 % des Mikrobioms gehören zu einem von vier Bakterienstämmen, den Bacillota (Firmicutes), Bacteroidetes, Proteobacteria oder Actinobacteria<sup>37; 44</sup>. Faktoren wie das Nährstoffangebot oder der pH-Wert beeinflussen die Zusammensetzung des Mikrobioms<sup>53</sup>. Im Dünndarm beispielsweise dominieren aufgrund des niedrigeren pH-Werts und erhöhten Sauerstoffgehalts im Vergleich zum Dickdarm fakultative Anaerobier<sup>53</sup>. Antigene kommensaler MO führen normalerweise nicht zu einer inflammatorischen Immunreaktion im Darm, was durch klonale Anergie und Deletion antigenspezifischer T-Lymphozyten oder aktive Unterdrückung vermittelt durch regulatorische T-Lymphozyten ermöglicht wird<sup>54</sup>. Die Dysbiose des intestinalen Mikrobioms wird mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und dem Reizdarmsyndrom assoziiert<sup>55; 56; 57</sup>.

## 1.2 *Entamoeba histolytica*

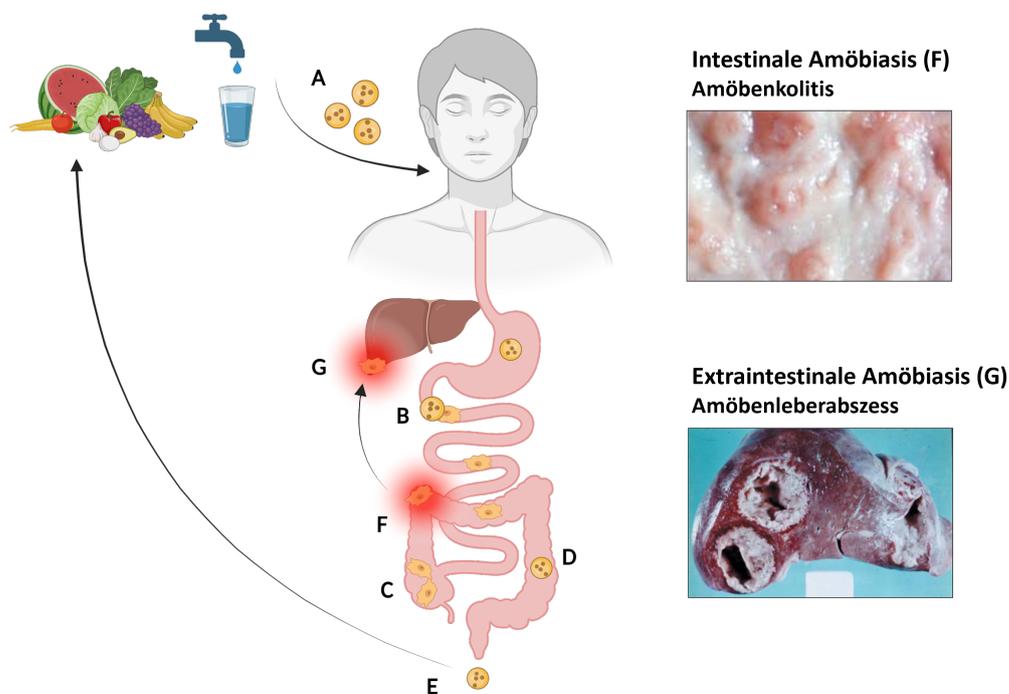
*E. histolytica* (SCHAUDINN, 1903) ist ein humanpathogenes Protozoon und Auslöser der Krankheit Amöbiasis. Der Parasit wurde zuerst von dem russischen Arzt Fedor Lösch im Jahr 1875 als Ursache eines tödlichen Falls von Dysenterie beschrieben<sup>58</sup> und 1903 vom deutschen Zoologen Fritz Schaudinn, aufgrund seiner Fähigkeit Gewebe zu lysieren, *E. histolytica* genannt<sup>59</sup>.

### 1.2.1 Lebenszyklus von *E. histolytica*

*E. histolytica* kommt in zwei Stadien vor: als unbewegliche, infektiöse Zyste und als beweglicher Trophozoit<sup>60; 61</sup>. Vierkernige Zysten werden fäkal-oral über kontaminiertes Trinkwasser oder Lebensmittel, direkten Hand-zu-Hand Kontakt oder durch sexuellen Kontakt übertragen (Abbildung 2A)<sup>3; 60; 62; 63</sup>.

## 1 Einleitung

Die säureresistenten Zysten überstehen die Passage durch den Magen und gelangen in den Dünndarm<sup>60; 64</sup>. Dort exzystieren sie zu achtkernigen Trophozoiten, aus denen durch Plasmateilung je acht einkernige Trophozoiten entstehen (Abbildung 2B)<sup>61</sup>. Die Trophozoiten wandern zum Kolon und vermehren sich dort über vegetative Zweiteilung (Abbildung 2C)<sup>61</sup>. Im distalen Teil des Kolons enzystieren sich die Trophozoiten wiederum zu Zysten (Abbildung 2D), die mit dem Fäzes an die Umwelt abgegeben werden um neue Wirte zu infizieren (Abbildung 2E)<sup>3; 60</sup>. Im Gegensatz zu Trophozoiten bleiben Zysten außerhalb des Wirtes bis zu mehreren Wochen infektiös<sup>60; 64</sup>. Neben wenigen Primatenarten ist der Mensch der einzige bekannte natürliche Wirt der Parasiten<sup>60; 65</sup>. In wenigen Fällen invadieren Trophozoiten in die Mukosa des Kolons und es kommt zum Ausbruch der intestinalen Amöbiasis (Abbildung 2F)<sup>1</sup>. Über den Blutstrom des Pfortadersystems können die Trophozoiten weitere Organe, in den meisten Fällen die Leber, erreichen, wo es zur Bildung von ALA kommt (Abbildung 2G)<sup>1</sup>.



**Abbildung 2: Übersicht über den Lebenszyklus von *Entamoeba histolytica*.**

Infektiöse *Entamoeba histolytica* Zysten werden fäkal-oral vom menschlichen Wirt aufgenommen (A), passieren den Magen und gelangen in den Dünndarm, wo sie sich zu motilen Trophozoiten exzystieren (B). Die Trophozoiten wandern zum Kolon und vermehren sich dort über Zweiteilung (C). Im unteren Teil des Kolons enzystieren sich die Trophozoiten wiederum zu infektiösen Zysten (D), die anschließend mit dem Fäzes abgegeben werden um neue Wirte zu infizieren (E). In 10 % der Infektionen kommt es zur intestinalen Amöbiasis. Dabei invadieren die Trophozoiten die Mukosa des Kolons und es kommt zur Amöbenkolitis (F)<sup>3</sup>. Bei der extraintestinalen Amöbiasis erreichen die Trophozoiten über den Blutstrom weitere Organe, hauptsächlich die Leber. Dort kann es zur Bildung von Amöbenleberabszessen kommen (G)<sup>3</sup>. Abbildung erstellt mit Biorender.

## 1 Einleitung

### 1.2.2 Amöbiasis – Krankheitsbild, Diagnose und Therapie

Die Mehrzahl der Infektionen mit *E. histolytica* verläuft symptomlos, wohingegen es in 10 % der Fälle zur Entwicklung von Symptomen durch einen invasiven Verlauf kommt<sup>3; 60; 64; 66</sup>. Bei der invasiven, intestinalen Amöbiasis penetrieren die Trophozoiten die Mukosa des Kolons und es kommt zur Amöbenkolitis<sup>3; 64; 66</sup>. Die Symptome reichen von mildem Durchfall bis hin zu abdominalen Schmerzen, Krämpfen, Gewichtsverlust und wässrigem bis blutigem „himbeergeleeartigem“ Durchfall sowie typischerweise flaschenförmigen Ulzerationen<sup>3; 66; 67</sup>. Seltene, aber schwere Komplikationen in Zusammenhang mit der intestinalen Amöbiasis sind die nekrotische Kolitis, das toxische Megakolon oder die Formation von Amöbomen<sup>66; 68; 69</sup>. Die Trophozoiten können über den Blutstrom des Pfortadersystems (*Vena portae*) weitere Organe erreichen, was als extraintestinale Amöbiasis bezeichnet wird<sup>3; 66</sup>. Der häufigste Ort der Manifestation der extraintestinalen Amöbiasis ist die Leber, wo es in 3 - 9 % der Fälle zur Ausbildung von ALA kommen kann<sup>70; 71</sup>. Patienten mit ALA entwickeln Symptome wie Fieber und Schmerzen im rechten oberen Oberkörper, allerdings oft keine gastrointestinalen Beschwerden<sup>73</sup>. Neben der Leber können in seltenen Fällen weitere Organe wie die Lunge oder das Gehirn (0,1 % der ALA-Fälle) von einer Abszessbildung betroffen sein<sup>64; 74</sup>. Insbesondere schwere Verläufe der invasiven Amöbiasis führen ohne Behandlung in 40 - 89 % der Fälle zum Tod<sup>66; 75; 76; 77</sup>.

Zur Diagnose einer *E. histolytica* Infektion stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die mikroskopische Untersuchung von Stuhlproben ist ein einfaches und kostengünstiges Mittel zur Detektion von *E. histolytica* Zysten und Trophozoiten, weist aber einige Nachteile auf<sup>64</sup>. Zur Diagnose der extraintestinalen Amöbiasis ist sie ungeeignet, da diese Verlaufsform oft ohne eine intestinale Infektion auftritt<sup>64</sup>. Außerdem kann *E. histolytica* morphologisch nicht von anderen *Entamoeba* Spezies wie *E. dispar*, *E. bangladeshi* oder *E. moshkovskii* unterschieden werden. Die Detektion von Antigenen in Stuhlproben ist einfach in der Handhabung, variiert aber in der Sensitivität und Spezifität und erwies sich insbesondere zur Diagnose der extraintestinalen Amöbiasis als ungeeignet<sup>78; 79; 80</sup>. Die serologische Untersuchung von Blutproben wiederum ist ein geeignetes Verfahren zur Diagnose der extraintestinalen Amöbiasis, wobei nicht zwischen einer aktiven und bereits gelösten Infektion unterschieden werden kann, da Antikörper teilweise mehrere Jahre nach erfolgreicher Behandlung detektierbar sind<sup>64; 81; 82</sup>. Das Standardverfahren zur Diagnose der intestinalen und der extraintestinalen Amöbiasis ist die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), verlangt der Einsatz jedoch eine kostspielige Ausstattung und geschultes Personal, was den Gebrauch vor allem in einkommensschwächeren Regionen limitieren kann<sup>80; 83</sup>.

Aktuell ist kein Vakzin zur Prophylaxe der Amöbiasis verfügbar. Aufgrund der hohen Mortalitätsrate unbehandelter Amöbiasis empfiehlt das *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) symptomatische Patienten mit Antibiotika der Gruppe Nitroimidazol (Metronidazol oder Tinidazol) und an-

## 1 Einleitung

schließlich mit einem Kontaktamöbizid wie Paromomycin zu behandeln<sup>64; 84; 85</sup>. Infizierte Patienten ohne Symptome werden zum Schutz vor einer Gewebeinvasion und um eine weitere Ausbreitung des Parasiten zu verhindern mit Kontaktamöbiziden behandelt<sup>64</sup>. Da Nitroimidazole, insbesondere Metronidazol, aktuell die einzige Wirkstoffgruppe sind, mit der *E. histolytica* Infektionen behandelt werden, wäre eine Resistenzbildung fatal. Im Gegensatz zu anderen Humanpathogenen wie *Giardia (G.) intestinalis*, *Trichomonas (T.) vaginalis* und *Leishmania (L.) donovani* wurde eine Resistenz gegen Metronidazol bei *E. histolytica* bisher zwar nicht nachgewiesen, dennoch sollte die Suche nach Alternativen nicht vernachlässigt werden<sup>86; 87; 88; 89</sup>.

### 1.2.3 Epidemiologie

Schätzungsweise 50 Millionen Menschen weltweit sind mit *E. histolytica* infiziert<sup>90</sup>, wobei im Jahr 2016 mehr als 26.000 Menschen an den Folgen einer Infektion starben<sup>91</sup>. *E. histolytica* ist in tropischen und subtropischen Klimazonen in Regionen mit schlechten hygienischen Standards und unzureichendem Zugang zu sanitären Anlagen endemisch. Dazu zählen Teile Zentral- und Südamerikas, Asiens und Afrikas<sup>64; 92</sup>. Die Seroprävalenz von *E. histolytica* in ländlichen Gebieten Mexikos beispielsweise lag im Jahr 2007 bei über 42 % und 11 % der Kinder unter 5 Jahren, die zwischen 2007 und 2011 in einem dicht besiedelten Viertel unter ärmlichen Verhältnissen in Bangladesch lebten, hatten innerhalb des ersten Lebensjahres durch *E. histolytica* ausgelösten Durchfall<sup>93; 94</sup>. Außerhalb der Endemiegebiete treten Infektionen mit *E. histolytica* vor allem bei Rückreisenden aus endemischen Gebieten auf<sup>73; 95</sup>. Die durch *E. histolytica* ausgelöste Amöbenkolitis ist eine der weltweit häufigsten Gründe für schweren Durchfall, wobei Durchfallerkrankungen generell die dritthäufigste Todesursache bei Menschen sind<sup>64</sup>. Über 40 % der an schwerer Amöbenkolitis erkrankten und nicht behandelten Personen sterben, wobei insbesondere Kinder unter zwei Jahren von einem erhöhten Sterberisiko betroffen sind<sup>64; 96</sup>. Bei Kindern unter 5 Jahren ist *E. histolytica* einer der zehn häufigsten Auslöser für moderaten bis schweren Durchfall<sup>93</sup>. Bei Kindern sind Symptome einer *E. histolytica* Infektion in der Regel auf den Darm begrenzt, wohingegen mehr als 95 % der ALA bei erwachsenen Menschen auftreten<sup>97</sup>. Neben dem Altersdimorphismus zeigt die Manifestation von ALA einen Geschlechtsdimorphismus. Am häufigsten bilden sich ALA bei Männern im Alter zwischen 18 und 50 Jahren, wobei Männer achtmal häufiger von ALA betroffen sind als Frauen<sup>72; 98</sup>.

### 1.2.4 Wirt-Parasit-Interaktionen während der intestinalen Invasion

Bei der nicht-invasiven Form der *E. histolytica* Infektion besiedeln Trophozoiten den Dickdarm als Kommensale, ohne dass es zu Schädigungen des Wirtsorganismus kommt. Trophozoiten binden über das Oberflächenmolekül Galaktose/*N*-Acetylgalaktosamin (Gal/GalNAc) Lektin an Muzine des Mukus und ernähren sich von im Darm lebenden Bakterien<sup>3; 99; 100</sup>. Ausgelöst durch weitgehend unbekannte Faktoren, überwinden pathogene Trophozoiten die muko-epitheliale Barriere und invadieren in das

## 1 Einleitung

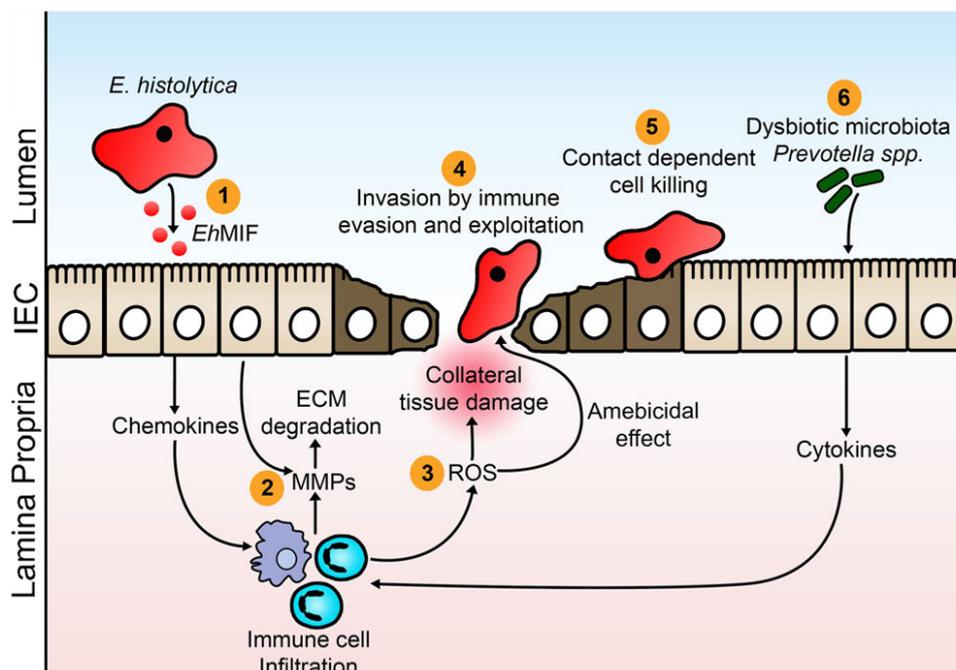
darunterliegende intestinale Gewebe (**Abbildung 3**). Die Degradierung der Epithelzellbarriere, die Invasion von Trophozoiten in tieferliegende Gewebeschichten und die Immunantwort des Wirts selbst sind dabei für die Schädigung des intestinalen Gewebes während der invasiven Amöbiasis verantwortlich<sup>5; 96</sup>.

Trophozoiten durchbrechen die schützende Mukusschicht, hauptsächlich bestehend aus glykolisierten Muzin 2-Polymeren, durch Freisetzung von Glykosidasen und Cysteinpeptidasen (CP)<sup>101; 102; 103</sup>. Glykosidasen spalten an das zentrale Muzin 2-Protein gebundene Kohlenhydratreste ab, was einen weiteren proteolytischen Abbau des Moleküls durch CP ermöglicht<sup>103</sup>. Die *E. histolytica* Cysteinpeptidase (EhCP-) A5 trägt zur Degradierung der Mukusbarriere bei, indem es die Cystein-reiche Domäne des Muzin 2 abspaltet<sup>102</sup>. Durch Interaktion mit  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen auf der Oberfläche von Goblet Zellen stimuliert EhCP-A5 zudem die massive Hypersekretion von Muzinen zum Wiederaufbau der Mukusschicht, was zu einem Zusammenfall der Goblet Zellen und daraus folgend einer erhöhten Sensitivität der Epithelzellschicht gegenüber invadierenden Trophozoiten führt<sup>104</sup>. CP tragen außerdem zur Lyse von EC sowie der Degradierung von TJ (EhCP112 und EhCP-A5) und der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) bei, einer Struktur, die den Zellen als Gerüst dient, gleichzeitig aber auch als Barriere gegen Pathogene fungiert<sup>105; 106; 107</sup>. Dabei bewirkt die Interaktion der EC mit EhCP-A5 eine erhöhte Sezernierung von Matrixmetallopeptidasen, die die ECM degradieren<sup>108</sup>. Wird die Expression von *ehcp-A5* im *severe combined immunodeficiency* murin-humanen intestinalen (SCID-hu-int) Xenotransplantat Modell herunterreguliert, reduziert das die Pathogenität der Trophozoiten<sup>109</sup>. CP sind darüber hinaus fähig, Immunglobulin (Ig) A2 zu spalten, das Pathogene vor der Anheftung an und dem Abbau der mukosalen Barriere schützt<sup>110; 111; 112</sup>. Über Gal/GalNAc Lektin binden Trophozoiten mit hoher Affinität an Gal oder GalNAc auf der Membran von EC, was die kontaktabhängige Apoptose der Zellen über die Aktivierung von Caspase 3 induziert<sup>113; 114; 115; 116</sup>. EC können von *E. histolytica* Trophozoiten phagozytiert oder trogozytiert werden. Trogozytose ist ein Prozess, bei dem Teile hauptsächlich lebender Zellen von den Trophozoiten aufgenommen werden, was zum Tod der Zellen führt<sup>117</sup>. Apoptotische Zellen werden vorwiegend durch Phagozytose aufgenommen, was neben der Nährstoffversorgung der Trophozoiten zur Verringerung pro-inflammatorischer Immunantworten des Wirts beiträgt<sup>115; 118</sup>.

Die intestinale Amöbiasis ist gekennzeichnet durch die Präsenz pro-inflammatorischer Zytokine und die Infiltration von Immunzellen in das Gewebe des Dickdarms<sup>96</sup>. Gewebeschäden werden dabei zu einem großen Teil durch die Immunantwort des Wirts selbst hervorgerufen<sup>5; 96</sup>. Bereits vor dem ersten direkten Kontakt zu intestinalen EC sezernieren Trophozoiten immunmodulierende Proteine, die die *nuclear-factor  $\kappa$ -light-chain enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B-) vermittelte Freisetzung pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  oder *interferon* (IFN-)  $\gamma$  durch intestinale EC stimulieren<sup>119; 120; 121; 122; 123</sup>. Insbesondere IL-8 fungiert als Chemoattraktant für Neutrophile und

## 1 Einleitung

Makrophagen, die das infizierte Gewebe infiltrieren und zur Abwehr der Trophozoiten unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) freisetzen, die neben den Trophozoiten auch umgebene Wirtszellen schädigen<sup>124; 125</sup>. Die Sezernierung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) durch *E. histolytica* verstärkt die IL-8 Freisetzung nach Bindung an den PGE<sub>2</sub> Rezeptor 4 (EP<sub>4</sub>) der EC<sup>126</sup>. *E. histolytica* sezerniert zudem ein Homolog des pro-inflammatorischen Zytokins *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), EhMIF, das die Freisetzung von IL-8 durch EC sowie die erhöhte Freisetzung von IL-6 und *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  durch Makrophagen induziert<sup>127</sup>. Die fäkale Konzentration von EhMIF korreliert mit dem Schweregrad der intestinalen Amöbiasis<sup>127</sup>. Werden Mäuse mit Trophozoiten infiziert, die *ehMIF* überexprimieren, führt das zu einem verstärkten Einstrom von Neutrophilen in das Gewebe und ausgeprägteren Schädigungen der intestinalen Mukosa<sup>127; 128</sup>.



**Abbildung 3: Übersicht über die Immunpathogenese bei intestinaler Amöbiasis.**

(1) Die Sezernierung von *Entamoeba histolytica* *macrophage migration inhibitory factor* (EhMIF) durch Trophozoiten führt zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine durch intestinale Epithelzellen (*intestinal epithelial cells*, IEC). (2) Die *E. histolytica*-induzierte Freisetzung von Matrixmetallopeptidasen (MMPs) führt zur Degradierung der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM). (3) Rekrutierte Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophile sekretieren unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die zur Schädigung der Trophozoiten und des Wirtsgewebes führen. (4) *E. histolytica* entgeht dem Immunsystem des Wirts über verschiedene Mechanismen wie der Expression antioxidativer Stoffe oder der Lyse von Immunzellen. (5) Der Kontakt von *E. histolytica* zu IECs über Galaktose/N-Acetylgalaktosamin Lektin führt zur kontaktabhängigen Apoptose der Wirtszellen. (6) Eine Dysbiose des intestinalen Mikrobioms kann das Risiko der invasiven Amöbiasis erhöhen. Abbildung aus Ghosh et al (2019)<sup>5</sup>.

*E. histolytica* verfügt über Mechanismen, um der Immunantwort des Wirtsorganismus zu entgehen. Neutrophile sind in der Lage, *E. histolytica* Trophozoiten in einem Verhältnis von 3.000:1 zu neutralisieren, jedoch töten *E. histolytica* Trophozoiten Neutrophile durch Sezernierung lytischer Enzyme

## 1 Einleitung

effektiver ab. Das führt zur Freisetzung weiterer lytischer Enzyme, ROS und RNS aus den lysierten Immunzellen, wodurch umliegende Wirtszellen kollateral geschädigt werden, während Peroxiredoxine, Oxidoreduktasen und die Superoxiddismutase *E. histolytica* vor oxidativen Schäden schützen<sup>129; 130; 131</sup>. Von Neutrophilen freigesetztes Cathepsin G wird von *E. histolytica* durch Serinproteaseinhibitoren unschädlich gemacht<sup>132</sup>. Durch Interaktion mit  $\beta$ 2-Integrinen auf der Oberfläche von Neutrophilen induziert *E. histolytica* zudem die ROS-abhängige Apoptose dieser Zellen, vermittelt über den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT-) Signalweg<sup>133</sup>. Makrophagen setzen zur Abwehr der Trophozoiten unter anderem Stickstoffmonoxid (NO) frei. Durch die Aufnahme von L-Arginin entziehen *E. histolytica* Trophozoiten den Makrophagen das Ausgangsprodukt zur NO-Synthese<sup>134</sup>.

In verschiedenen Studien wird die Präsenz bestimmter intestinaler Bakterien mit dem Schutz vor oder der Begünstigung von invasiver Amöbiasis assoziiert. Eine geringe Diversität im Mikrobiom, definiert durch einen niedrigen Shannon-Index, gilt als Risikofaktor für symptomatische Amöbiasis<sup>135</sup>. *Prevotella copri* wurde im Fäzes von Kindern aus Bangladesh und Südafrika mit symptomatischer *E. histolytica* Infektion in signifikant größeren Mengen gefunden<sup>136; 137</sup>. Wird eine Dysbiose des Mikrobioms bei Mäusen durch Behandlung mit Antibiotika induziert, reduziert das die Anzahl an Goblet Zellen und führt zu einer erhöhten Anzahl an Trophozoiten im Fäzes. Werden *E. histolytica* Trophozoiten *in vitro* zusammen mit enteropathogenen *Escherichia coli* (EHEC) oder *Shigella (S.) dysenteriae* inkubiert, führt das zu einer erhöhten Zytotoxizität bei MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) Zellen<sup>138</sup>.

Umweltbedingte sowie genetische Faktoren auf Wirt- und Parasitenseite stehen im Verdacht, den Wechsel vom kommensalen hin zum pathogenen Phänotyp zu beeinflussen. Unterernährung führt bei Kindern zu einem erhöhten Risiko, eine symptomatische *E. histolytica* Infektion zu entwickeln<sup>139; 140</sup>. Dieses Phänomen konnte mit einem gestörten Leptinmetabolismus bedingt durch Substitution einer einzelnen Aminosäure im Leptinrezeptor in Verbindung gebracht werden<sup>141</sup>. Leptin wird von Adipozyten produziert und ist an der Regulierung der Nahrungsaufnahme, des Energieverbrauchs sowie der Immunantwort als pro-inflammatorisches Cytokin beteiligt<sup>141</sup>. In unterernährten Kindern kommt es in niedrigeren Konzentrationen vor<sup>142</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass *E. histolytica* Genotypen auf Basis von *tandem repeat* Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) -Sequenzen bei Isolaten asymptomatischer Patienten stark polymorph waren, während bei Isolaten von Patienten mit Dysenterie und ALA derselbe Genotyp dominierte<sup>143; 144; 145</sup>. Die Zusammensetzung des Mikrobioms, die Verfügbarkeit von Glukose, die Trophozoitendichte oder die Anpassung der Genexpression an sich ändernde Umweltbedingungen sind weitere Faktoren, die das Ergebnis einer *E. histolytica* Infektion beeinflussen können<sup>146</sup>.

## 1 Einleitung

### 1.2.5 Pathogener und nicht-pathogener *E. histolytica* Klon

Die *E. histolytica* Zelllinien A und B gehen aus dem Isolat HM-1:IMSS hervor, das von einer Biopsie eines 1967 an Amöbenkolitis erkrankten, männlichen Patienten aus Mexiko stammt. Zelllinie HM-1:IMSS-B wurde 1991 von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen<sup>147</sup>. Zelllinie HM-1:IMSS-A wurde 2001 von Barbara Mann (Charlottesville, University of Virginia) an das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) gesendet und stammt wie Zelllinie HM-1:IMSS-B ursprünglich von ATCC<sup>147; 148</sup>. Genetisch sind beide Zelllinien hinsichtlich polymorpher *tandem repeat* DNA-Sequenzen identisch, zeigen aber Unterschiede im Transkriptom und Proteom<sup>143; 147; 149; 150</sup>. Die beiden Zelllinien unterschieden sich in ihrer Pathogenität, definiert als Fähigkeit der Trophozoiten im Mausmodell (*Mus musculus*) nach intrahepatischer Injektion ALA auszulösen, die mindestens sieben Tage bestehen<sup>147</sup>. Zelllinie HM-1:IMSS-A löst keine oder sehr kleine ALAs aus und wird als nicht-pathogen definiert. Zelllinie HM-1:IMSS-B hingegen führt zur Formierung von ALA und wird als pathogen definiert<sup>147; 151</sup>. Zur Sicherstellung der Homogenität beider Zelllinien wurden jeweils zwölf Klone generiert und deren Fähigkeit zur ALA-Bildung untersucht<sup>151; 152</sup>. Alle Klone der Zelllinie HM-1:IMSS-A zeigten einen nicht-pathogenen Phänotyp<sup>152</sup>. Die Klone der Zelllinie HM-1:IMSS-B waren heterogen in ihrer Fähigkeit zur Induktion von ALA, wobei alle Replikate des HM-1:IMSS-B2 Klons große ALA induzierten<sup>152</sup>. Der Klon B2 wurde als pathogener (p) Klon und der Klon A1 als nicht-pathogener (np) Klon weiter untersucht.

### 1.3 Modelle zur Erforschung der invasiven Amöbiasis

Zahlreiche Modelle zur Erforschung intestinaler Amöbiasis wurden etabliert, wobei sich viele der Modelle immortalisierter Zelllinien wie *Cancer coli* (Caco-) 2 oder HT-29, einer Zelllinie aus humanem kolorektalem Adenokarzinom, bedienen<sup>153; 154; 155</sup>. Neben einem veränderten Phäno- und Genotyp ist die verminderte Fähigkeit dieser Zellen in dem standardmäßig für die *E. histolytica* Kultur verwendeten TYI-S-33 (TY)-Medium zu überleben ein großer Nachteil<sup>156</sup>. Co-Inkubationen mit Zelllinien werden oft in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) oder einer Mischung aus DMEM und TY-Medium durchgeführt. Untersuchungen der Wirt-Parasit-Interaktionen mit Hilfe von *in vivo* Modellen unter Verwendung von Hausmäusen (*Mus musculus*) oder Mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*) sind auf die frühe Phase der Infektion limitiert, da intestinale Ulzerationen spontan vollständig ausheilen<sup>157</sup>. Unterschiedliche Mausstämme weisen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Anfälligkeit für eine *E. histolytica* Infektion auf. Mäuse der Linie C57BL/6 sind beispielsweise resistent gegenüber einer intrazökalen Infektion mit Trophozoiten, wohingegen C3H/HeJ Mäuse eher anfällig sind<sup>158</sup>. Unter Verwendung genetisch modifizierter C57BL/6 Mäuse konnte die Beteiligung von IL-10 an der Resistenzbildung nachgewiesen werden<sup>159</sup>. Als komplexes humanes *ex vivo* Modell zur Untersuchung der frühen Phase der intestinalen Wirt-Parasit-Interaktionen wurde die Infektion

## 1 Einleitung

von humanen Kolonexplantaten mit *E. histolytica* Trophozoiten etabliert<sup>120</sup>. Explantate haben eine kurze Lebensdauer, sodass sie zur Untersuchung chronischer Infektionen nicht geeignet sind. Ein weiterer Nachteil ist die limitierte Verfügbarkeit der Explantate. Bei dem *ex vivo* SCID-hu-int Xenotransplantat Modell wird humanes intestinales Gewebe subkutan in SCID Mäuse implantiert. Die intestinalen Xenotransplantate zeigen die typische intestinale Morphologie, sind vaskularisiert und produzieren Mukus<sup>122</sup>. Nach direkter luminaler Infektion des Xenotransplantats mit *E. histolytica* Trophozoiten sind starke Schäden der Mukosa und Immunzellen, hauptsächlich Neutrophile, detektierbar<sup>109; 160</sup>. Neben der Nachbildung eines komplexen Systems, das viele Komponenten der *in vivo* Situation aufweist, fehlen den immunodefizienten Mäusen Lymphozyten und die adaptive Immunantwort kann mit diesem Modell nicht untersucht werden<sup>146</sup>.

### 1.3.1 Organoide und Organoid-assoziierte Modelle zur Untersuchung der invasiven Amöbiasis

Organoide sind organisierte dreidimensionale (3D) Zellcluster bestehend aus differenzierten Zellen, mit strukturellen und funktionellen Charakteristika ihres Ursprungsgewebes<sup>161</sup>. Sie können aus embryonalen Stammzellen, induzierten pluripotenten Stammzellen oder adulten Stammzellen generiert werden<sup>161</sup>. Mittlerweile wurden zahlreiche Protokolle zur Generierung von Organoiden verschiedener Organe wie Leber, Gehirn, Lunge, Darm oder Niere etabliert<sup>162; 163</sup>.

Die ersten intestinalen Organoide wurden aus einzelnen LGR5<sup>+</sup>-Stammzellen generiert, wobei auch komplette Krypten aus intestinale Gewebe isoliert und verwendet werden können<sup>164</sup>. Intestinale Organoide bilden die typische Kryptstruktur mit innerem apikalem Lumen aus, beherbergen differenzierte Zelltypen und entwickeln ein polarisiertes, kolumnares Epithel<sup>164</sup>. Apoptotische Zellen werden in das Organoidlumen abgegeben<sup>164</sup>. Intestinale Sphäroide bestehen hauptsächlich aus LGR5<sup>+</sup>-Stammzellen und weisen keine Zeichen der Differenzierung auf. Sie haben eine zystische Struktur, ein dünnes Epithel und bilden ebenso wie intestinale Organoide ein inneres Lumen aus<sup>165</sup>. Für die Langzeitkultur werden intestinale Sphäroide in einem Medium kultiviert, das die intestinale Stammzellnische nachbildet um die Proliferationsfähigkeit der Stammzell-Population aufrechtzuerhalten<sup>166</sup>. Das Einbetten in eine extrazelluläre Matrix ist für die Ausbildung der 3D-Struktur notwendig<sup>166</sup>.

Aufgrund des limitierten Zugangs des Organoidlumens wurden alternative Modelle wie z.B. *apical-out* Organoide, deren apikale Seite durch Kultivierung ohne ECM nach außen zeigt, oder die Kultur intestinaler Epithelzellen als Monolayer im Transwellsystem, generiert aus Sphäroiden etabliert<sup>167; 168</sup>. SDM-Kulturen weisen differenzierte Zelltypen auf, polarisieren und bilden eine elektrophysiologisch dichte Epithelzellschicht aus. Die apikale Seite der Zellen ist auch für Infektionsexperimente mit größeren Parasiten wie z.B. *E. histolytica* leicht zugänglich. Durch die Kultivierung im *transwell* ist es zudem möglich, apikal und basal verschiedene Kulturmedien einzusetzen, die sich nicht miteinander

## 1 Einleitung

vermischen. Durch den Einsatz bestimmter Medienzusätze, die Entfernung des apikalen Mediums oder mechanische Stimuli kann die Bildung einer Mukusschicht induziert werden<sup>169</sup>. Das Modell kann außerdem erweitert werden, indem beispielsweise Immunzellen oder Bakterien integriert werden, um die *in vivo* Bedingungen besser nachzubilden.

### 1.4 Zielstellung der Arbeit

Das Wissen über mögliche Auslöser der invasiven Amöbiasis ist aktuell noch lückenhaft und bedarf weiterer Untersuchungen. In vielen Studien wurde dazu das pathogene *E. histolytica* HM-1:IMSS Isolat mit dem nicht-pathogenen *E. histolytica* Rahman Isolat oder der nicht-pathogenen Spezies *E. dispar* verglichen, wobei die Differenzierung zwischen Virulenz-assoziierten Unterschieden und Unterschieden als Resultat genetischer Variation schwer ist<sup>130; 170; 171; 172</sup>.

In dieser Arbeit wurden zwei auf Basis von hochpolymorphen *tandem repeat* DNA-Sequenzen genetisch nicht voneinander unterscheidbare Klone des HM-1:IMSS Isolats verwendet, die sich in ihrer Pathogenität unterschieden<sup>147</sup>. Das Hauptziel dieser Arbeit war, die Interaktionen der beiden *E. histolytica* Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> mit aus intestinalen Sphäroiden generierten primären Epithelzellschichten zu untersuchen um mögliche Unterschiede zwischen den Klonen zu identifizieren.

Dazu sollte im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Kultur primärer intestinaler Sphäroide aus Kolon- und Dünndarmgewebe verschiedener Spezies etabliert werden. Die Sphäroide sollten als Ausgangsmaterial für die Etablierung differenzierter SDM-Kulturen im *transwell*-System verwendet werden, die hinsichtlich ihrer Barrierefunktion sowie präsender Zelltypen charakterisiert wurden.

Im zweiten Abschnitt sollten SDM-Kulturen für Co-Inkubationsexperimente mit *E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten verwendet werden und der Effekt auf die Barrierefunktion der Epithelzellen sowie auf das Transkriptom der Zellen und Parasiten untersucht werden. Zusammengefasst waren die Ziele dieser Arbeit:

1. Etablierung intestinaler Sphäroidkulturen
2. Generierung und Charakterisierung intestinaler SDM-Kulturen
3. Co-Inkubation intestinaler SDM-Kulturen mit *E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten zur:
  - Untersuchung des Effekts der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der intestinalen Epithelzellen mittels Messung des TEER und Immunofluoreszenztests (*immunofluorescence assay*, IFA)
  - Analyse des Effekts der Co-Inkubation auf das Wirts- und Parasitentranskriptom mittels dualer RNA-Sequenzierung

## 1 Einleitung

Mit Hilfe des SDM-Modells sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

1. A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten degradieren die Barriere der intestinalen Epithelzellschichten ähnlich effektiv.
2. *E. histolytica* Trophozoiten degradieren Epithelzellschichten aus Kolon- und Dünndarmsphäroiden in ähnlicher Weise.
3. Intestinale Epithelzellen reagieren unterschiedlich auf den Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten. B2<sup>p</sup> Trophozoiten induzieren eine stärkere Immunreaktion des Wirts als A1<sup>np</sup> Trophozoiten.
4. Epithelzellen aus Kolon- und Dünndarmsphäroiden reagieren in ähnlicher Weise auf den Kontakt zu *E. histolytica* Trophozoiten. Beide Modelle können zur Erforschung der intestinalen Amöbiasis verwendet werden.

## 2 Material und Methoden

**2 Material und Methoden****2.1 Material****2.1.1 Organismen und Zelllinien**

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Organismen.

Organismus	Klon/Stamm	Herkunft/Referenz
<i>Entamoeba histolytica</i>	HM-1:IMSS, Klon A1 <sup>np</sup>	Meyer <i>et al.</i> (2016) <sup>152</sup>
<i>Entamoeba histolytica</i>	HM-1:IMSS, Klon B2 <sup>p</sup>	Meyer <i>et al.</i> (2016) <sup>152</sup>
<i>Mus musculus</i>	C57/Bl6	Tierhaus BNITM, Tierversuchslizenz T-008
<i>Escherichia coli</i>	One Shot TOP10 chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i>	Thermo Fisher Scientific (#C404010)

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft
Humane Enteroide Duodenum, männlich, 30 Jahre, gesund	Robert Koch-Institut (RKI), Biopsie <sup>173</sup> (#CBF1)
Humane Enteroide Duodenum, weiblich, 33 Jahre, gesund	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (#SCC324)
Humane Kolonoide Kolon, männlich	RKI, Biopsie (#huK1)
Humane Kolonoide Kolon, weiblich, 33 Jahre, gesund	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (#SCC323)
Murine Kolonoide Kolon, männlich, 10-12 Wochen	C57/Bl6 Wildtypmaus (#muK1)
<i>Roof plate-specific-Spondin-1</i> -exprimierende 293T-Zellen (R-Spondin-Zellen)	R&D Systems (# 3710-001-01)
<i>Wingless-related integration site</i> (WNT) 3a-, R-Spondin 3- und Noggin-exprimierende L-Zellen (L-WRN-Zellen)	ATCC (#CRL-3276)
<i>Human Embryonic Kidney</i> (HEK)293T Zellen	ATCC (#CRL-3216)

## 2 Material und Methoden

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Ammoniumeisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
D(+)-Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific
D-Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
Ethanol	Merck KGaA
Glyzin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck KGaA
L(+)-Ascorbinsäure	VWR International, LLC
L-Cystein-Hydrochlorid, wasserfrei	US Biological Life Sciences
<i>Lipofectamine 3000 Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG
Paraformaldehyd	Electron Microscopy Sciences
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton-X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG
TRIzol	Ambion
Tween-20	Merck KGaA

## 2 Material und Methoden

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkulturflasche, ohne Filter	Falcon/ Corning (12,5 cm <sup>2</sup> ) Sarstedt AG & Co. KG (25 cm <sup>2</sup> )
Zellkulturflasche, mit Filterkappe	Sarstedt AG & Co. KG (25/ 75 cm <sup>2</sup> ) Thermo Scientific (175 cm <sup>2</sup> )
12-/ 24- <i>well</i> -Platte für adhärenente Zellen	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Plastikpipetten (5/ 10/ 25 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen mit und ohne Filter (10/ 20/ 200/ 1.000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG
Schraubröhren (15/ 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
Kryotubes (2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
RNAse-freie Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
Rundboden-Polypropylenröhrchen (14 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Rotor-Gene Strip-Tubes (0,1 ml)	LTF-Labortechnik
Steritop Flaschenaufsatzfilter (0,22 µm)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm)	Sarstedt AG & Co. KG
Einmalspritzen (5 ml/20 ml)	B. Braun Melsungen AG
18G Einmal-Injektions-Kanüle	Becton, Dickinson
<i>transwell</i> Einsätze (0,6 cm <sup>2</sup> , PCF)	Merck Millipore Ltd.
96- <i>well</i> -Mikrotestplatten, weiß	greiner
Objektträger (76 x 26 mm)	Engelbrecht
Deckgläschen (0,17 mm)	Fisher Scientific Inc.
Skalpell	B. Braun Melsungen AG
EASYstrainer Zellsieb (70 µM)	greiner

### 2.1.4 Geräte

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Geräte.

Gerät	Hersteller
Einkanalpipette (2/ 10/ 20/ 200 /1.000 µl)	Rainin
<u>Zellkultur-Inkubatoren:</u> Heratherm IGS750	Thermo Scientific Inc.

## 2 Material und Methoden

Innova co-170	New Brunswick Scientific
<u>Mikroskope:</u> Konfokales Mikroskop FLUOVIEW FV3000 Mikroskop EVOS FL Auto Mikroskop Eclipse TS100 Mikroskop BZ-9000	Olympus Europa SE & Co. KG Thermo Fisher Scientific Inc. Nikon Instruments Inc. Keyence
pH-Meter Lab 850	Si AnalyticsTM, Xylem Analytics GmbH & Co. KG
Wasserbad	GFL
Elektrische Pipettierhilfe	ThermoScientific
<u>Zentrifugen:</u> Tischzentrifuge Megafuge 1.0 Zentrifuge 5415 D Zentrifuge 5424 R Zentrifuge 5810 R Zentrifuge J2-21	Labnet International Inc. Heraeus Eppendorf SE Eppendorf SE Eppendorf SE Beckman Coulter GmbH
Sicherheitswerkbank <i>Hera Safe</i> HS 18	Heraeus, Kendro Laboratory Products
<i>Millicell</i> ERS-2 Volt-Ohm-Messgerät	Merck Millipore
<i>Millicell</i> MERSSTX01 Elektrode	Merck Millipore
Plattenheizblock MHR-11	HLC
<i>Agilent 2100 Bioanalyser</i>	Agilent Technologies Inc.
Vortexmischer VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
<u>Waagen:</u> Feinwaage KERN <sub>410</sub> Waage BCE2202I-1S Waage TP2KS	KERN & SOHN GmbH Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG OHAUS Corporation
<i>NanoDrop</i> 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Rotor-Gene</i> 3000	Corbett Research Limited
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument
<i>GloMax Navigator</i> Mikroplatten-Luminometer	Promega
Schwenkplatte PMR-30	Hassa Laborbedarf
Heizblock MHR 11	DIBATIS AG
Schüttelinkubator Certomat HK	B. Braun Biotech International

## 2 Material und Methoden

## 2.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Medien.

Medien	Zusammensetzung
<i>Advanced</i> DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific Inc.
Dissoziationsmedium	10 $\mu$ M Y-27632  In TrypLE Express
DMEM	ATCC
DMEM <i>high glucose</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Fluorescent mounting medium</i>	DAKO
HEK293T-Medium	10 % FBS, hi**  1x Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x  1x GlutaMAX  In DMEM
HEPES-Puffer, 1 M	Thermo Fisher Scientific Inc.
LB-Medium	20 g/l LB Broth (Lennox)  In ddH <sub>2</sub> O, pH 7, autoklavieren
L-WRN-Medium	10 % FBS, hi**  1x Penicillin/Streptomycin, 100x  0,5 bzw. 1 mg/ml G-418  0,5 bzw. 1 mg/ml Hygromycin B  In DMEM <i>high glucose</i> , stable Glutamine
R-Spondin-Medium	10 % FBS, hi**  1x Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x  300 $\mu$ g/ml Zeocin  In DMEM <i>high glucose</i>
<i>Serum-deprived</i> HEK293T-Medium	2 % FBS, hi**  1x Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x  L-WRN CM***

## 2 Material und Methoden

	In DMEM
<i>Super optimal broth with catabolite repression (SOC)-Medium</i>	Takara Bio
Sphäroid-Basismedium	1x Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x 1x GlutaMAX <i>supplement</i> , 100x 1 mM HEPES Puffer  In <i>Advanced</i> DMEM/F12
<i>Spheroid-derived monolayer (SDM)</i> 0/5/50-Medium	0/5/50 % 3dGRO L-WRN- <i>conditioned</i> Medium (CM) 20 % R-Spondin1-CM 1x Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x 1x GlutaMAX <i>supplement</i> , 100x 1 mM HEPES Puffer 1x B27 <i>supplement</i> , 50x 1x N2 <i>supplement</i> , 100x 100 ng/ml Noggin 50 ng/ml <i>epidermal growth factor</i> (EGF) 1 mM <i>N</i> -Acetylcystein (NAC) 10 mM Nikotinamid (NIC) 10 µM Y-27632*  In <i>Advanced</i> DMEM/F12
TYI-S-33 (TY)-Medium, inkomplett <sup>156</sup>	20 g/l Tryptikase 10 g/l Hefeextrakt 55,5 mM Glukose 34,2 mM NaCl 4,7 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM L-Cystein 1,1 mM Ascorbinsäure 87 µM Ammoniumeisen(III)-citrat  In ddH <sub>2</sub> O, pH 6,8, autoklavieren*
TY-Medium, komplett <sup>156</sup>	10 % Adultes Rinderserum, hi** 3 % <i>Diamond Vitamin Tween 80</i> Lösung, 40x

## 2 Material und Methoden

	1 % Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x  In TY-Medium (inkomplett), sterilfiltrieren (0,2 µm)
WERN-Medium	50 % 3dGRO L-WRN-CM  20 % R-Spondin1-CM  1x Penicillin/Streptomycin Lösung, 100x 1x GlutaMAX <i>supplement</i> , 100x  1 mM HEPES Puffer  1x B27 <i>supplement</i> , 50x 1x N2 <i>supplement</i> , 100x  100 ng/ml Noggin  50 ng/ml EGF  1 mM NAC  10 mM NIC  500 nM A83-01  1 µM SB202190  10 µM Y-27632*  In <i>Advanced</i> DMEM/F12

\* Alle Bestandteile wurden vor der Zugabe des adulten Rinderserums, der *Diamond Vitamin Tween 80* Lösung und der Penicillin/Streptomycin Lösung im Dampfkochtopf für 30 min bei 120 °C und 1,4 bar autoklaviert.

\*\* Adultes und fötales Rinderserum wurde zweimal für je 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert (hi).

\*\*\* L-WRN-CM wurde je nach Fragestellung in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

**Tabelle 7: Auflistung verwendeter Mediumszusätze.**

Mediumszusatz	Hersteller
3dGRO L-WRN-CM	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
A83-01	Sigma-Aldrich, Merck KGaA  <u>500 µM stock</u>  5 mM A83-01 in DMSO lösen und auf 60 °C erhit-

## 2 Material und Methoden

	zen 500 µM A83-01 in ddH <sub>2</sub> O (60 °C), sterilfiltrieren (0,2 µm)
Adultes Rinderserum	Capricorn Scientific GmbH
B27 <i>supplement</i> , 50x	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Basement Membrane Extract</i> (BME)	RnD Systems
<i>Diamond Vitamin Tween 80</i> Lösung, 40x	BioConcept Ltd.
<i>Difco™ Tryptone Peptone</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
EGF	Peprotech  <u>50 µg/ml stock</u> In 1 % BSA in PBS
FBS	Capricorn Scientific GmbH
GlutaMAX <i>supplement</i> , 100x	Thermo Fisher Scientific Inc.
Hefeextrakt	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Lysogeny broth</i> (LB)	Carl Roth GmbH & Co. KG
N2 <i>supplement</i> , 100x	Thermo Fisher Scientific Inc.
N-Acetyl-L-cystein	Sigma-Aldrich, Merck KGaA  <u>500 mM stock</u> In doppelt destilliertem (dd)H <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren (0,2 µm)
Nikotinamid	Sigma-Aldrich, Merck KGaA  <u>1 M stock</u> In ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltrieren (0,2 µm)
Noggin	Peprotech  <u>100 µg/ ml stock</u> In 0,1 % BSA in PBS
<i>Normal goat serum</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
R-Spondin1-CM	Selbst produziert (Abschnitt 2.2.1.2)
SB202910	Cayman Chemicals, Biomol

## 2 Material und Methoden

	<u>30 mM</u> In DMSO
L-WRN-CM	Selbst produziert (Abschnitt 2.2.1.5)
Y-27632	Cayman Chemicals, Biomol  <u>10 mM stock</u> In PBS (pH 7,2), sterilfiltrieren (0,2 µm)

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
<i>Chelation stock-Puffer, 5x</i>	28 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 480 mM NaCl 8 mM KCl 220 mM Saccharose 274 mM D-Sorbitol  In ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4, sterilfiltrieren (0,2 µm)
<i>Crypt isolation-Puffer</i>	1x <i>Chelation stock-Puffer</i> 100 mM DTT* 500 mM EDTA*  In ddH <sub>2</sub> O
<i>FastDigest Green buffer, 10x</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
HEPES-Puffer	PAN Biotech
IFA-Blockierpuffer	3 % BSA 1 % <i>normal goat serum</i> 0,2 % Triton-X 100** 0,1 % Tween-20**  In 1x TBS
IFA-Permeabilisierungspuffer	0,1 M Glyzin 0,2 % Triton-X 100 0,1 % Tween-20

## 2 Material und Methoden

	In 1x TBS
IFA-Waschpuffer	0,1 % Triton X-100** 0,05 % Tween-20**  In 1x TBS
Natrium (Na)-PBS, 10x	6,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 140 mM NaCl  In ddH <sub>2</sub> O, pH 7,2, autoklavieren
<i>Passive lysis buffer</i>	Promega
PBS, 10x	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  In ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4, autoklavieren
TBS, 10x	200 mM Tris 1.500 mM NaCl  In ddH <sub>2</sub> O, pH 7,6, sterilfiltrieren (0,2 µm)

\*Direkt vor Gebrauch zufügen

\*\*Nur hinzufügen, wenn Zellen permeabilisiert werden sollen

**Tabelle 9: Auflistung verwendeter Antibiotika.**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG
G-418	Sigma-Aldrich, Merck KGaA
Hygromycin B	Carl Roth GmbH & Co. KG
Penicillin/ Streptomycin Lösung, 100x	Capricorn Scientific GmbH
Zeocin	Invivogen

## 2 Material und Methoden

### 2.1.6 Reaktionskits

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Reaktionskits.

Reaktionskit	Hersteller
<i>Agilent RNA 6000 Pico Kit</i>	Agilent Technologies Inc.
<i>Direct-zol RNA MiniPrep Kit</i>	Zymo Research
<i>Dual-Luciferase Reporter Assay System</i>	Promega
<i>FastSelect RNA Removal Kit</i>	QIAseq
<i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Luna Universal qPCR Master Mix</i>	NEB
<i>NextSeq 500/550 Midi Output Kit v2.5 (150 Zyklen)</i>	QIAseq
<i>NucleoBond Xtra Midi Plus Kit</i>	Macherey und Nagel
<i>Stranded mRNA Library Kit</i>	QIAseq
<i>SuperScript III First-Strand Synthesis Kit</i>	Invitrogen

### 2.1.7 Enzyme

Tabelle 11: Auflistung verwendeter Enzyme.

Enzyme	Hersteller
<i>FastDigest BamHI Restriktionsenzym</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>FastDigest HindIII Restriktionsenzym</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>FastDigest KpnI Restriktionsenzym</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>TrypLE Express Enzym, phenolrot</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.

### 2.1.8 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 12: Auflistung verwendeter Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.

Antikörper/ Farbstoff	Verdünnung	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	2 µg/ ml	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Goat anti-rat Alexa Fluor 488</i>	1:1.000	Abcam Limited
<i>Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488</i>	1:500	Invitrogen
Phalloidin-iFluor 488	1x	Abcam Limited
<i>Rabbit anti-LYZ</i>	1:100	Invitrogen
<i>Rabbit anti-MUC2</i>	1:300	GeneTex
<i>Rabbit anti-NHE3</i>	1:100	Novus Biologicals
<i>Rabbit anti-SOX9</i>	1:500	EMD Millipore

## 2 Material und Methoden

Rat anti-ZO-1	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc.
---------------	-------	-------------------------------

### 2.1.9 Plasmide und Oligonukleotide

Tabelle 13: Auflistung verwendeter Plasmide.

Plasmide	Hersteller
M50 Super 8x TOPFlash (Firefly Luciferase)	Addgene (#12456)
pRL-SV40 ( <i>Renilla</i> Luciferase)	Addgene (#27163)

Tabelle 14: Auflistung verwendeter Oligonukleotide.

Zielgen	Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
<i>Eh127670</i>	<i>forward</i>	AGAGAGCTACTCAACATGG
	<i>reverse</i>	CATATTCATCACACTCTTCC
<i>EhActin</i>	<i>forward</i>	AAGCTGCATCAAGCAGTGAA
	<i>reverse</i>	GGAATGATGGTTGGAAGAGG

### 2.1.10 Webseiten und Datenbanken

Tabelle 15: Auflistung verwendeter Websites, Software und Datenbanken.

Software, Websites, Databases	Hersteller
2100 Expert Software	Agilent Technologies Inc.
AmoebaDB Release 68	<a href="https://amoebadb.org/amoeba/app">https://amoebadb.org/amoeba/app</a>
ChatGTP-4	<a href="https://chatgpt.com/">https://chatgpt.com/</a>
CLC Genomics Workbench 21	QIAgen
Evos FL Auto Imaging System	Thermo Fisher Scientific Inc.
Fiji Version 2.15.1	Wayne Rasband
FV315-SW	Olympus Europa SE & Co. KG
Galaxy Europe Server Version 24.1 <sup>4</sup>	<a href="https://usegalaxy.eu/">https://usegalaxy.eu/</a>
GlowMax Navigator Software Version 3.0.0	Promega
Graphpad Prism Version 10.1.0	GraphPad Software
Heatmapper <sup>1</sup>	<a href="http://heatmapper.ca/expression/">http://heatmapper.ca/expression/</a>
InteractiVenn <sup>2</sup>	<a href="https://www.interactivenn.net/">https://www.interactivenn.net/</a>
Bildanalyse-Software BZ-II-Analyzer	Keyence

## 2 Material und Methoden

<i>Microsoft Office Version 16.77.1</i>	Microsoft Corporation
<i>NanoDrop2000 Operating Software</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.
<i>Rotor-Gene real time Analysis 6.0</i>	Corbett Research Limited
<i>ShinyGO 0.77<sup>174</sup></i>	<a href="http://bioinformatics.sdstate.edu/go/">http://bioinformatics.sdstate.edu/go/</a>

## 2 Material und Methoden

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Etablierung von aus intestinalen Sphäroiden generierten Epithelzellkulturen

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen *E. histolytica* Trophozoiten mit primären intestinalen Epithelzellen wurde zunächst die Kultur intestinaler Sphäroide etabliert, aus denen im Anschluss Epithelzellschichten im *transwell* System generiert wurden.

##### 2.2.1.1 Kultivierung von *Roof plate-specific Spondin 1*-exprimierenden 293T-Zellen

*Roof plate-specific-Spondin-1*-exprimierende 293T-Zellen (R-Spondin-Zellen) sind stabil transfizierte 293T-Zellen, die murines R-Spondin 1 exprimieren und mit Zeocin selektiert werden können. R-Spondin-Zellen wurden zur Herstellung von R-Spondin 1-*conditioned* Medium (R-Spondin-CM) verwendet, das als Bestandteil des WERN-Mediums für die intestinale Sphäroidkultur eingesetzt wurde (Abschnitt 2.2.1.11). Die Kultur von R-Spondin-Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle 2-3 d wurde die Kultur bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert. Dazu wurde das alte Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und adhärente Zellen durch Inkubation in 1 ml TrypLE Express Enzym für 5-10 min bei 37 °C von der Wachstumsoberfläche gelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in 4 ml frischem R-Spondin-Medium aufgenommen und ein bestimmtes Volumen, entsprechend dem Wachstumsverhalten der Zellen, in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 12 ml frischem R-Spondin-Medium versorgt.

##### 2.2.1.2 Produktion von R-Spondin 1-*conditioned* Medium

Für die Produktion von R-Spondin 1-CM wurden jeweils 2 x 10<sup>7</sup> R-Spondin-Zellen bei 37 °C in einem Wasserbad innerhalb von 2 min aufgetaut und in eine 50 ml Schraubröhre überführt. Sofort wurden 10 ml R-Spondin-Medium ohne Zeocin tropfenweise und unter vorsichtigem Schwenken zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden weitere 10 ml R-Spondin-Medium ohne Zeocin zu den Zellen gegeben und die Suspension für 5 min bei 500 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 ml R-Spondin-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis die R-Spondin-Zellen eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten (ca. 3 d). Die Zellen wurden daraufhin einmal unter Selektionsdruck passagiert. Dazu wurden 5 x 10<sup>6</sup> R-Spondin-Zellen in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gesät und in 40 ml R-Spondin-Medium kultiviert, bis sie wiederum eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten (ca. 4 d). Anschließend wurden jeweils 5 x 10<sup>6</sup> R-Spondin-Zellen in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und in 40 ml R-Spondin-Medium ohne Zeocin kultiviert. Sobald die Kultur eine Konfluenz von 100 % erreicht hatte (ca. 4 d), wurde das R-Spondin-Medium entfernt und die Zellen in 40 ml Sphäroid-Basismedium kultiviert. Nach einigen Tagen lösen sich die R-Spondin-Zellen von der Wachstumsoberfläche und beginnen in Suspension zu wachsen. Nach 8 d wurde der Zellkulturüberstand (= R-

## 2 Material und Methoden

Spondin-CM) geerntet, in 50 ml Schraubröhren überführt und für 5 min bei 500 x *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint, sterilfiltriert (0,2 µm), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.1.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen sind leicht transfizierbare Zellen und wurden für die transiente Co-Transfektion im Rahmen des Luciferase-Reporter-Tests verwendet (Abschnitt 2.2.1.6). HEK293T-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 5 ml HEK293T-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2-3 d wurde die Kultur bei einer Konfluenz von mindestens 80 %, wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, passagiert.

### 2.2.1.4 Kultivierung von *Wingless-related integration site 3a*-, R-Spondin 3- und Noggin-exprimierenden L-Zellen

*Wingless-related integration site* (WNT) 3a-, R-Spondin 3- und Noggin-exprimierende L-Zellen (L-WRN-Zellen) wurden zur Produktion von L-WRN-CM verwendet, das als Bestandteil des WERN-Mediums für die intestinale Sphäroidkultur eingesetzt werden kann (Abschnitt 2.2.1.11). L-WRN-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 20 ml L-WRN-Medium, versetzt mit 0,5 mg/ ml G-418 und 0,5 mg/ ml Hygromycin B zur Selektion, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultur wurde alle 2-3 d, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, bei einer Konfluenz von 80-90 % passagiert.

### 2.2.1.5 Produktion von L-WRN-conditioned Medium

Für die Produktion von L-WRN-CM wurden ausschließlich L-WRN-Zellen verwendet, die mindestens sieben Tage unter Selektionsdruck kultiviert wurden (Abschnitt 2.2.1.4). L-WRN-Zellen einer 90 % bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden auf drei 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen aufgeteilt und in jeweils 25 ml L-WRN-Medium ohne G-418 und Hygromycin B (-G/-H) kultiviert, bis sie eine Konfluenz von über 100 % erreicht hatten und Zellaggregate sichtbar wurden (ca. 4 d). Anschließend wurde das alte Medium entfernt, der Zellrasen mit 10 ml L-WRN-Medium (-G/-H) gewaschen und 25 ml frisches L-WRN-Medium (-G/-H) zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand (= L-WRN-CM) geerntet, in eine 50 ml Schraubröhre überführt und für 5 min bei 2.000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Die L-WRN-Zellen wurden erneut mit 25 ml frischem L-WRN-Medium (-G/-H) versorgt und über 24 h kultiviert, woraufhin der Überstand wiederum geerntet und zentrifugiert wurde. Die Ernte konnte bis zu dreimal wiederholt werden. Alle Überstände wurden in einer sterilen 500 ml Glasflasche vereint, sterilfiltriert (0,2 µl), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Vor dem Einsatz des L-WRN-CM für die Sphäroidkultur wurde die Aktivität des Wnt3a mit dem Luciferase-Reporter Test bestimmt (Abschnitt 2.2.1.6).

## 2 Material und Methoden

### 2.2.1.6 Bestimmung der WNT3a-Aktivität im L-WRN-*conditioned* Medium

Um die WNT3a-Aktivität im produzierten L-WRN-CM zu bestimmen (Abschnitt 2.2.1.5), wurde der Luciferase-Reporter-Test verwendet. Pro Bedingung wurde die Aktivität von drei biologischen Replikaten im Doppelansatz bestimmt. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  HEK293T-Zellen (Abschnitt 2.2.1.3) in 500  $\mu$ l HEK293T-Medium in eine 24-*well*-Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Kontrollplasmid, das das Gen für die *Renilla* Luciferase enthält (Abschnitt 2.2.1.7 und 2.2.1.8, Abbildung A29), und dem Reporterplasmid, das das Gen für die Firefly Luciferase unter der Kontrolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-abhängigen *T cell factor/ lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF)-Transkriptionsfaktors enthält (Abschnitt 2.2.1.7 und 2.2.1.8, Abbildung A29), transient co-transfiziert. Dazu wurde der Transfektionsansatz (Tabelle 16) zunächst für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden pro *well* 50  $\mu$ l des Transfektionsansatzes tropfenweise und unter vorsichtigem Schwenken zu den HEK293T-Zellen pipettiert, die daraufhin für 24 h inkubiert wurden.

Tabelle 16: Ansatz für die transiente Co-Transfektion von HEK293T-Zellen.

Substanz	Volumen/Menge
<i>Renilla</i> Luciferase Plasmid-DNA	8 ng
Firefly Luciferase Plasmid-DNA	400 ng
<i>Lipofectamine 3000 Reagent</i>	0,75
DMEM	ad 50 $\mu$ l

Nach 24 h wurde das alte Medium entfernt und die HEK293T-Zellen in 500  $\mu$ l *serum-deprived* HEK293T-Medium mit unterschiedlichen L-WRN-CM Konzentrationen für 24 h stimuliert. Als Positivkontrolle diente L-WRN-CM mit bekannter und für die Sphäroidkultur ausreichender WNT3a-Aktivität. Als Negativkontrolle wurde *serum-deprived* HEK293T-Medium ohne L-WRN-CM verwendet. Ist aktives WNT3a im L-WRN CM vorhanden, bewirkt es die Transkription des Gens für die Firefly Luciferase über die Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Dabei verhindert WNT3a durch Bindung an den Frizzled-Rezeptor den Abbau von  $\beta$ -Catenin, das durch Interaktion mit dem TCF/LEF-Transkriptionsfaktor die Transkription des Gens für die Firefly Luciferase aktiviert. Das Gen für die *Renilla* Luciferase wird WNT3a-unabhängig transkribiert. Die Messung der Aktivität der *Renilla* Luciferase diente zur Normalisierung der Aktivität der Firefly Luciferase, um die Variabilität zwischen den Proben, unter anderem bedingt durch unterschiedliche Überlebensfähigkeit der HEK293T-Zellen oder Transfektionseffizienzen, zu minimieren.

Die Bestimmung der WNT3a-Aktivität erfolgte mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von Promega nach Herstellerangaben. Zunächst wurden die co-transfizierten HEK293T-Zellen lysiert,

## 2 Material und Methoden

indem jeweils 100 µl *passive lysis buffer* zu den Zellen pipettiert wurden. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min bei RT auf einer Schwenkplatte inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte in einer weißen 96-well-Platte am *GloMax Navigator* Mikroplatten-Luminometer von Promega, ausgestattet mit der *GloMax Navigator Software Version 3.0.0* von Promega. Dabei wurde innerhalb einer Probe sowohl die WNT3a-abhängige Aktivität der Firefly Luciferase als auch die Aktivität der *Renilla* Luciferase gemessen. Luciferasen katalysieren die Reaktion von Luciferinen und Sauerstoff zu instabilen Produkten, bei deren Zerfall Biolumineszenz entsteht<sup>175; 176</sup>. Die *Renilla* Luciferase und die Firefly Luciferase benötigen für ihre Reaktion unterschiedliche Substrate, was die separate Messung der Lumineszenzsignale innerhalb einer Probe ermöglicht<sup>175; 176</sup>.

### 2.2.1.7 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen durch Hitzeschock

Mit Hilfe der Hitzeschock-Transformation wurde Plasmid-DNA in kompetente *Escherichia coli* Zellen eingebracht. Dazu wurden kompetente *Escherichia coli* Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend zusammen mit 100 ng DNA für 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte die Transformation durch Hitzeschock, indem der Ansatz für 30 s bei 42 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden 300 µl der Zellsuspension auf eine vorgewärmte *lysogeny broth* (LB-)Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.1.8 Plasmid-Medipräparation aus *Escherichia coli* Zellen

Um größere Mengen Plasmid-DNA aus kompetenten *Escherichia coli* Zellen zu isolieren, wurde am Vortag eine Flüssigkultur angesetzt, indem 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion mit einer Einzelkolonie transformierter *Escherichia coli* Zellen (Abschnitt 2.2.1.7) angeimpft wurden. Die Flüssigkultur wurde für 8 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 300 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit der gesamten Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den *Escherichia coli* Zellen wurde das *NucleoBond Xtra Medi Plus Kit* von Macherey und Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA erfolgte am *NanoDrop 2000* Spektrophotometer. Vor Verwendung der Plasmid-DNA für die Transfektion (Abschnitt 2.2.1.6) wurde die Qualität durch einen Restriktionsverdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abschnitt 2.2.1.9).

### 2.2.1.9 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Im Rahmen des Restriktionsverdau wurde isolierte Plasmid-DNA (Abschnitt 2.2.1.8) mithilfe von Restriktionsenzymen in Bruchstücke mit bekannter Größe geschnitten. Pro Restriktionsansatz wurden 1 µl *10x FastDigest Green buffer* von Thermo Fisher mit jeweils 0,5 µl *FastDigest* Restriktionsenzym von

## 2 Material und Methoden

ThermoFisher mit  $< 1 \mu\text{g}$  DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit ddH<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Größe der Bruchstücke wurde durch Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel überprüft unter Verwendung der *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* als Marker bestimmt.

### 2.2.1.10 Isolierung von Krypten aus intestinalem Gewebe

Murines Gewebe stammt von männlichen, 10-12 Wochen alten C57BL/6-Wildtypmäusen aus der Hauszucht des BNITM (Tierversuchslizenz T-008). Humane Sphäroide wurden kommerziell erworben oder extern aus Biopsien generiert (für weitere Informationen siehe Abschnitt 2.1.1, Tabelle 1).

Intestinale Krypten wurden nach Sato *et al.* (2011), mit Modifikationen, aus murinem Kolongewebe isoliert<sup>166</sup>. Alle Plastikoberflächen wurden mit 0,1 % BSA in PBS beschichtet, um ein Anhaften der Krypten und des Gewebes zu verhindern. Alle Schritte wurden auf Eis und unter Verwendung von eiskalten Puffern durchgeführt. Zunächst wurde der Dickdarm einer C57BL/6 Wildtypmaus isoliert und vom Zäkum getrennt. Der isolierte Kolon wurde von Binde- und Fettgewebe befreit und longitudinal mit einer Schere geöffnet. Nach mehreren Waschschrritten in PBS wurde das Kolongewebe in 2 mm große Stücke geschnitten. Die Gewebefragmente wurden in eine 50 ml Schraubröhre mit 20 ml PBS überführt und gewaschen, bis der Überstand klar war. Um die Krypten aus dem Gewebe zu lösen, wurden die Fragmente für 30 min bei 4 °C in 20 ml *crypt isolation* Puffer auf einem Rollenmischer inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Gewebestücke in 4 ml PBS aufgenommen und mit einer 10 ml Stripette zehnmal kräftig auf- und abpipettiert. Der Überstand wurde durch ein 70  $\mu\text{m}$  Zellsieb in eine 50 ml Schraubröhre überführt (Fraktion 1). Das Lösen der Krypten durch Auf- und Abpipettieren wurde bis zu fünfmal wiederholt und die Überstände in jeweils einer neuen 50 ml Schraubröhre gesammelt (Fraktion 2-6). Fraktionen, die viele Krypten und wenig Zelldebris enthielten, wurden vereint, für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert und in Sphäroid-Basismedium, supplementiert mit 5 % FBS, aufgenommen.

Die Krypten-Suspension wurde 1:1 mit BME gemischt und als 40  $\mu\text{l}$  Tropfen mit je 500 Krypten in eine vorgewärmte 24-well-Platte pipettiert. Zur Polymerisierung des BME wurde die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Krypten anschließend in 500  $\mu\text{l}$  warmem WERN-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die ersten 24 h nach der Aussaat wurden dem Medium 10  $\mu\text{M}$  Y-27632 zugesetzt. Das Medium wurde alle 2-3 d gewechselt und die initiale Kultur nach 7-10 d passagiert (Abschnitt 2.2.1.11).

### 2.2.1.11 Kultivierung intestinaler Sphäroide

Nach der initialen Passage wurden die Sphäroidkulturen alle 5-6 d wie in Mahe *et al.* (2015) beschrieben, mit Modifikationen, passagiert<sup>177</sup>. Humane Dünndarmsphäroide wurden in einem Ver-

## 2 Material und Methoden

hhältnis von 1:3 und humane und murine Kolonsphäroide in einem Verhältnis von 1:1,5 expandiert. Vorab wurden alle Plastikoberflächen mit 0,1 % BSA in PBS beschichtet, um ein Anhaften der Sphäroide zu verhindern. Durch Inkubation der Sphäroidkultur für 5 min auf Eis, wurde der BME-Tropfen mit den Sphäroiden verflüssigt. Die Suspension wurde anschließend in eine 15 ml Schraub- röhre überführt und für 5 min bei 200 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl Dissoziationsmedium aufgenommen und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Sphäroide wurden daraufhin mechanisch durch Auf- und Abpipettieren (7-10 x) mithilfe einer 18G Kanüle in Bruchstücke zerteilt und nach Zugabe von 14 ml Sphäroid-Basismedium für 5 min bei 500 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in WERN-Medium aufgenommen, 1:1 mit BME gemischt und, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, ausgesät und kultiviert.

### 2.2.1.12 Beschichtung von *transwell*-Einsätzen

Um die Zellen intestinaler Sphäroide als *monolayer* zu kultivieren, wurden die Filter von 0,6 cm<sup>2</sup> *transwell*-Einsätzen mit BME beschichtet. Dazu wurden die *transwell*-Einsätze mit einer Pinzette in einer 24-*well*-Platte platziert und für 20 min bei -20 °C inkubiert. Pro *transwell*-Einsatz wurden 150 µl BME in SDM0-Medium in einem Verhältnis von 1:10 in die Mitte des Filters pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Direkt vor Aussaat der Sphäroidzellen (Abschnitt 2.2.1.11) wurde der Überstand entfernt und die Filter zur Polymerisierung des BME für 30 min bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.1.13 Kultivierung von aus intestinalen Sphäroiden generierten Epithelzellkulturen

Da das Lumen intestinaler Sphäroide für große Pathogene wie *E. histolytica* Trophozoiten nur begrenzt zugänglich ist, stellt eine aus Sphäroiden generierte Epithelzellschicht (SDM-Kultur) ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktionen dar. SDM-Kulturen wurden, wie in Holthaus *et al.* (2021) und Warschkau *et al.* (2022) beschrieben, generiert<sup>178; 179</sup>. Sphäroide wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.11 beschrieben, geerntet und in kleinere Fragmente zerteilt. Die Zellen von zwei *wells* der Sphäroidkultur wurden in 400 µL SDM50-Medium auf die apikale Seite eines beschichteten *transwell*-Filters (Abschnitt 2.2.1.12), platziert in einer 12-*well*-Platte, ausgesät. 800 µl SDM50-Medium wurden auf die basale Seite des Filters pipettiert. In den ersten 24 h nach der Aussaat wurde das Medium mit 10 µM Y-27632 supplementiert. Der Gehalt an L-WRN-CM wurde am zweiten Tag auf 5 % (SDM5-Medium) und ab dem dritten Tag auf 0 % (SDM0-Medium) reduziert, um die Differenzierung der LGR5<sup>+</sup>-Stammzellen einzuleiten. Das Medium wurde alle 2-3 d gewechselt. Innerhalb von 9 d bildete sich eine differenzierte und elektrophysiologisch dichte Epithelzellschicht, bestimmt durch Messung des TEER (Abschnitt 2.2.1.14) und IFA (Abschnitt 2.2.3.1).

### 2.2.1.14 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Messung des TEER wurde verwendet, um die Integrität der SDM-Kulturen zu beurteilen. TEER-Messungen wurden mit dem *Millicell ERS-2* Volt-Ohm-Messgerät, ausgestattet mit der *STX01* Elekt-

## 2 Material und Methoden

rode, auf einem Heizblock für Platten bei 37 °C durchgeführt. Der TEER jeder Probe wurde zweimal an gegenüberliegenden Seiten des *transwell*-Einsatzes gemessen und der Mittelwert für weitere Berechnungen verwendet. Der TEER beschichteter *transwell*-Einsätze ohne Zellen diente als Blankwert und wurde von den gemessenen TEER-Werten abgezogen. Anschließend wurden die TEER-Werte auf 1 cm<sup>2</sup> Wachstumsoberfläche normalisiert.

### 2.2.2 Methoden zur Kultivierung und Vorbereitung von *E. histolytica* Trophozoiten

#### 2.2.2.1 Kultivierung von *E. histolytica* Trophozoiten

*E. histolytica* Trophozoiten wurden in 12,5 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in komplettiertem TY-Medium<sup>156</sup> bei 37 °C unter axenischen, mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Alle 2-3 d wurde die Kultur passagiert. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mechanisch durch Schütteln von der Wachstumsoberfläche gelöst. Abhängig vom Wachstumsverhalten wurde eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche überführt und diese anschließend mit frischem, komplettiertem TY-Medium versorgt. Wenn nicht anders angegeben, wurden *E. histolytica* Trophozoiten 24 h vor Versuchsbeginn passagiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät, um am Versuchstag ein Wachstum in der logarithmischen Phase sicherzustellen.

#### 2.2.2.2 Ernte von *E. histolytica* Trophozoiten

Das alte Medium der *E. histolytica* Kultur (Abschnitt 2.2.2.1) wurde entfernt. Die Trophozoiten wurden mechanisch durch Schütteln in 10 ml eiskaltem NaPBS von der Wachstumsoberfläche der Zellkulturflasche gelöst, in eine 15 ml Schraubrohre überführt und für 5 min bei 400 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml eiskaltem NaPBS resuspendiert und erneut für 5 min bei 400 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Die Trophozoiten konnten für weitere Versuche verwendet werden.

#### 2.2.2.3 Herstellung von Lysat aus *E. histolytica* Trophozoiten

Zur Herstellung von *E. histolytica* Lysat wurden geerntete Trophozoiten (Abschnitt 2.2.2.2) durch insgesamt fünf Einfrier-Auftau-Zyklen aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend für 1 min bei 37 °C aufgetaut und für 10 s gevortext. Das Lysat (= lösliche Fraktion) wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x *g* und 4 °C von der unlöslichen Fraktion getrennt und für weitere Experimente eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.2.4 Bestimmung der Überlebensfähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten unter aeroben Bedingungen

Die Überlebensfähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten unter aeroben Bedingungen wurde vor den Co-Inkubationsexperimenten mit den SDM-Kulturen (Abschnitt 2.2.3) getestet. B2<sup>p</sup> Trophozoiten wurden 24 h vor dem Versuch in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät (Abschnitt 2.2.2.1). Außerdem wurde eine 24-*well*-Platte für 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen

## 2 Material und Methoden

der wells mit jeweils 300 µl BME in TY-Medium im Verhältnis 1:10 gleichmäßig beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Versuchstag wurde überschüssige Beschichtungslösung aus den wells entfernt. Die 24-well-Platte wurde zur Polymerisierung des BME für 30 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden *E. histolytica* Trophozoiten, wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, geerntet und in TY-Medium resuspendiert. Anschließend wurden insgesamt  $1 \times 10^4$  Trophozoiten in einem Volumen von 2 ml vorgewärmten TY-Medium pro well im Dreifachansatz pipettiert und für 8 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 8 h Inkubation wurde ein Video (1 Bild/3 s) mit dem EVOS FL Auto Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurde der Überstand von den Trophozoiten entfernt und die 24-well-Platte für 5 min auf Eis inkubiert, um adhärente Trophozoiten zu lösen. Gelöste Trophozoiten wurden in 1 ml eiskaltem TY-Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl TY-Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Trophozoiten gezählt. Die Überlebensfähigkeit unter aeroben Bedingungen wurde als prozentualer Anteil überlebender Trophozoiten in Relation zu der Anzahl ursprünglich ausgesäter Trophozoiten definiert.

### 2.2.3 Co-Inkubation von intestinalen Epithelzellen mit *E. histolytica* Trophozoiten

SDM-Kulturen wurden, wie in Abschnitt 2.2.1.13 beschrieben, generiert. 24 h vor der Co-Inkubation wurde das apikale Medium durch serumfreies TY-Medium ersetzt. Am Tag der Co-Inkubation wurden die Trophozoiten in serumfreiem TY-Medium geerntet (Abschnitt 2.2.2.2) und das Zellpellet in serumfreiem TY-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und auf  $1 \times 10^7$  Trophozoiten/ml eingestellt. Die jeweilige Anzahl Trophozoiten wurde in 400 µl serumfreiem TY-Medium apikal zu den SDM-Kulturen pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> co-inkubiert. Basal wurden die Zellen mit 800 µl frischem SDM0-Medium versorgt. Als Kontrollen dienten SDM-Kulturen, die ohne Trophozoiten oder mit *E. histolytica* Lysat (Abschnitt 2.2.2.3) inkubiert wurden. Für die Analyse der Parasitentranskriptome wurden zusätzlich Trophozoiten ohne Zellen als Kontrollen inkubiert.

Zur Verfolgung der Zerstörung der Epithelzellschichten durch *E. histolytica* Trophozoiten wurde der TEER zweier identisch angesetzter Platten im Rotationsprinzip über einen Zeitraum von 24 h gemessen (Abschnitt 2.2.1.14). Im Anschluss daran wurden die Zellen fixiert und die Zerstörung durch immunfluoreszente Färbung des *tight junction* (TJ) Proteins *Zonula occludens-1* (ZO-1) visualisiert (Abschnitt 2.2.3.1). Die Epithelzellschichten wurden mit einer Anzahl von 250 und 500 Trophozoiten co-inkubiert.

Für die Analyse der Transkriptome wurden die Epithelzellschichten mit einer Anzahl von 10.000 Trophozoiten für 4 h und 8 h co-inkubiert. Der TEER wurde vor Beginn des Experiments und vor der Ernte der Zellen gemessen. Die Co-Inkubation der Dünndarmepithelzellen mit 10.000 Trophozoiten,

## 2 Material und Methoden

wurden im Rahmen der Dissertation von C. König etabliert und durchgeführt<sup>180</sup>. Mit Ausnahme der Co-Inkubation über 4 h mit Dünndarmepithelzellen wurden pro Bedingung drei Replikate angesetzt. Für die Co-Inkubation mit Dünndarmepithelzellen über 4 h wurden jeweils drei Replikate an zwei verschiedenen Versuchstagen (= Tag der Probennahme) angesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit und Messung des TEER wurde das Medium von den EC entfernt, für 5 min bei 2.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Die 24-well-Platte mit den Zellen wurde auf Eis gestellt. Zur Ernte und Lyse der Zellen wurden pro *transwell*-Einsatz je 400 µl TRIzol in zwei Durchläufen pipettiert (Gesamtvolumen 800 µl). Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung von Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden

Zur Immunfluoreszenzfärbung von SDM-Kulturen (Abschnitt 2.2.1.13) wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Abhängig vom verwendeten primären Antikörper (Abschnitt 2.1.8, Tabelle 12) wurden die SDM-Kulturen entweder mit 400 µl vorgekühltem 100 %igem Methanol für 20 min bei -20 °C oder mit 400 µl vorgewärmtem 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 20 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit PBS gewaschen und, falls nötig, durch Inkubation in Immunofluoreszenztest (IFA)-Permeabilisierungspuffer für 30 min bei RT permeabilisiert.

Für die Färbung von filamentösem (F-)Aktin wurden fixierte Zellen mit iFluor488-konjugiertem Phalloidin zusammen mit 0,2 µg/ml DAPI in TBS für 1 h bei RT inkubiert.

Für alle anderen Immunofluoreszenzfärbungen mit separaten primären und sekundären Antikörpern wurden die Proben zunächst für 3 h bei RT in IFA-Blockierpuffer inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit den primären Antikörpern in IFA-Blockierpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Proben ohne Behandlung mit primären Antikörpern wurden als Kontrollen verwendet und in IFA-Blockierpuffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sechsmal mit IFA-Waschpuffer für jeweils 10 min bei RT gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit den sekundären Antikörpern (Abschnitt 2.1.8, Tabelle 12) zusammen mit 0,2 µg/ml DAPI in TBS für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachdem die SDM-Kulturen sechsmal mit IFA-Waschpuffer für jeweils 10 min bei RT und anschließend einmal mit ddH<sub>2</sub>O für 10 min bei RT gewaschen wurden, wurde der Filter mit den Zellen mithilfe eines Skalpell aus dem *transwell*-Einsatz geschnitten. Anschließend wurde der Filter möglichst „faltenfrei“ auf einem Objektträger platziert und mit 1-2 Tropfen *DAKO fluorescent mounting medium* überschichtet. Ein 0,17 mm Deckgläschen wurde luftblasenfrei aufgelegt und die Probe für mindestens 10 min getrocknet. IFAs wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert oder sofort mikroskopiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.2.4 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Mikroskopische Bilder wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop *FLUOVIEW FV3000* von Olympus, ausgestattet mit der *FV315-SW* Software, am Fluoreszenzmikroskop *EVOS FL Auto* von Thermo Fisher Scientific, ausgestattet mit der *Evos FL Auto Imaging System* Software, oder am Fluoreszenzmikroskop *BZ-9000* von Keyence, ausgestattet mit der *BZ-II-Analyzer* Bildanalyse-Software, aufgenommen. Die Analyse und Nachbearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe von *Fiji Version 2.15.1*. Dazu wurde der Hintergrund subtrahiert und der Kontrast sowie die Helligkeit der Bilder angepasst.

### 2.2.5 Methoden zur RNA-Analyse

#### 2.2.5.1 Isolierung von RNA aus *E. histolytica* Trophozoiten und humanen Epithelzellen

Trophozoiten wurden, wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, geerntet und gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml NaPBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 13.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Rückfluss resuspendiert. Die Trophozoiten wurden in 800 µl TRIzol aufgenommen, 10 s gevortext und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Aufnahme der SDM-Kulturen in TRIzol ist in Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

Zunächst wurden die Proben für 2 min bei 16.000 x *g* zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der RNA unter Verwendung des *Direct-Zol RNA Mini Prep Kit* von Zymo Research nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde aus Trophozoiten isolierte RNA in 25 µl RNase-freiem Wasser und aus Epithelzellen isolierte RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration und Reinheit der Proben wurden mithilfe des *NanoDrop 2000* Spektrophotometers bestimmt. Vor dem Einsatz der RNA für das *next generation sequencing* (NGS) wurde die Qualität der RNA überprüft (Abschnitt 2.2.5.4).

#### 2.2.5.2 cDNA-Synthese

Zur Quantifizierung der Expression bestimmter Gene mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR, Abschnitt 2.2.5.3) wurde isolierte RNA (Abschnitt 2.2.5.1) mithilfe einer Reversen Transkriptase in *complementary* (c)DNA umgeschrieben. Die Synthese von cDNA wurde mit Hilfe des *SuperScript III First-Strand Synthesis System Kit* von Invitrogen nach Herstellerangaben unter Einsatz von 1 µg RNA pro Reaktion durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die Konzentration und Reinheit der Proben wurde mithilfe des *NanoDrop 2000* Spektrophotometers überprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.5.3 Quantitative *real-time* PCR

Um zu ermitteln, wie stark ein bestimmtes Gen exprimiert ist, wurde die qPCR verwendet. Die Expression von Markergenen der A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten wurde in regelmäßigen Ab-

## 2 Material und Methoden

ständen überprüft, um die Integrität der beiden Kulturen sicherzustellen. Dazu wurde vorab die RNA aus den Trophozoiten isoliert (Abschnitt 2.2.5.1) und in cDNA umgeschrieben (Abschnitt 2.2.5.2), die für die Analyse mittels qPCR unter Verwendung des *Luna Universal qPCR Master Mix* von NEB nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Pro Reaktionsansatz wurden 9 µl *Luna Universal qPCR Master Mix*, jeweils 5 pmol/ µl *forward* und *reverse* Primer in einem Volumen von 2 µl, 1 µl cDNA und 6 µl RNase-freies Wasser in ein 0,1 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Als Negativkontrolle wurde für jedes Primerpaar die cDNA durch RNase-freies Wasser ersetzt. Die Amplifikation der Gene erfolgte am *Corbett Research Rotor-Gene 3000* im Doppelansatz. Der Ablauf der RT-qPCR ist in Tabelle 17 zu finden.

**Tabelle 17: Ablauf der RT-qPCR.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	60 s	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
<i>Annealing</i>	58 °C	20 s	
Elongation	68 °C	20 s	

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Schmelzkurven durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur auf 95 °C. Unterschiedlich lange Amplifikate haben unterschiedliche Schmelztemperaturen, sodass ein einzelner Peak in der Schmelzkurve das Vorhandensein eines spezifischen Amplifikats induziert.

Während der qPCR wird die Amplifikation von DNA in Echtzeit quantifiziert. Dabei wird das Signal eines Farbstoffs, der durch Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszent leuchtet, detektiert. Die Fluoreszenzintensität nimmt folglich proportional zur Menge amplifizierter DNA zu. Je früher ein Signal detektiert wird, desto stärker wird ein Gen exprimiert. Der *cycle of threshold* (CT) beschreibt den Zyklus, in dem das detektierte Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der *Rotor-Gene real time Analysis 6.0* Software. Im ersten Schritt wurde der CT-Wert des Zielgens (GOI) auf den CT-Wert eines Referenzgens normalisiert:

$$\Delta CT = CT_{GOI} - CT_{Referenzgen}$$

Geeignete Referenzgene zeichnen sich durch eine gleichmäßige und stabile Expression unabhängig von äußeren Einflüssen aus. Für *E. histolytica* Trophozoiten wurde *β-actin* als Referenzgen verwendet. Im nächsten Schritt wurde der CT-Wert des GOI in der Testprobe auf den CT-Wert des GOI in der Kontrollprobe normalisiert:

## 2 Material und Methoden

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Testprobe}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$$

Im letzten Schritt wurde die relative Genexpression berechnet, die die Expression des Zielgens der Testprobe relativ zur Expression des Zielgens in der Kontrollprobe angibt:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 2.2.5.4 Überprüfung der Qualität isolierter RNA

Vor dem Einsatz von RNA-Proben im NGS, wurde die Integrität der isolierten RNA (Abschnitt 2.2.5.1) mit dem *Agilent 2100* Bioanalyser ausgestattet mit der *2100 Expert* Software unter Verwendung des *Agilent RNA 6000 Pico Kit* nach Herstellerangaben überprüft. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. Unter Berücksichtigung verschiedener Parameter des Elektropherogramms, wie der 18S und 28S ribosomalen (r)RNA-Banden, wird die *RNA integrity number* (RIN) berechnet. Der RIN-Wert gibt Informationen über die Qualität der RNA. Ein RIN-Wert von 1 bedeutet, dass die vorliegende RNA vollständig degradiert ist. Ein RIN-Wert von 10 bedeutet, dass vollständig intakte RNA vorliegt. Für die Messung wurden maximal 5 ng RNA in 1  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eingesetzt. Alle Proben sowie die rekonstituierte RNA *ladder* wurden vorab für 2 min bei 70 °C denaturiert.

### 2.2.5.5 Transkriptomanalyse

Alle Schritte zur Vorbereitung und Sequenzierung der Proben mithilfe von NGS wurden am BNITM unter der Leitung von Dr. Dániel Cadar durchgeführt. Zunächst wurde rRNA mit dem *FastSelect RNA Removal Kit* von QIAseq nach Herstellerangaben aus den Proben (Abschnitt 2.2.5.1) entfernt. NGS-Bibliotheken wurden mit dem *Stranded mRNA Library Kit* von QIAseq nach Herstellerangaben erstellt und anschließend mit dem *NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5* (150 Zyklen) von QIAseq nach Herstellerangaben sequenziert, wodurch 75 bp *paired-end reads* mit einer Sequenziertiefe von 10-12 Millionen generiert wurden.

Die Qualität der Sequenzierdaten wurde mit FastQC überprüft. Die Daten wurden mit der *CLC genomics Workbench 21* Software weiterverarbeitet. Zunächst wurden die *reads* getrimmt und anschließend mit der RNA-Seq Funktion gegen das *E. histolytica* HM-1:IMSS Genom, bezogen von *AmoebaDB*, oder das humane Genom GrCH38 gemappt. Die Funktion „*differential expression in two groups*“ wurde zur Identifizierung aller differenziell exprimierten Gene (DEG) zwischen zwei Datensätzen genutzt. Alle Gene mit einem *fold change* (FC)  $\leq -2$  und  $\geq 2$  (*E. histolytica*) bzw.  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$  (human) und einem FDR *p*-Wert  $\leq 0,05$  wurden als differenziell exprimiert definiert.

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurden mit Hilfe der *CLC Genomics Workbench 21* Software generiert. Zur Erstellung von *volcano plots* wurde der *Galaxy Europe Server* verwendet<sup>4</sup>. Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. *Heatmaps transcripts per million* (TPM) normalisierter Expressionswerte wurden mit *Heatmapper* erstellt<sup>1</sup>. *Gene Ontology* (GO)

## 2 Material und Methoden

*term enrichment* und Analysen der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Stoffwechselwege von *E. histolytica* DEG wurden mit *AmoebaDB* und humaner DEG mit *ShinyGO 0.77* durchgeführt<sup>174</sup>.

### 2.2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit *GraphPad Prism Version 10.1.0* durchgeführt. Mit Ausnahme der Transkriptomdaten wurde je nach Beschaffenheit des Datensatzes der *t*-Test für unabhängige Stichproben, die einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit anschließendem *post-hoc* Tukey Test oder die zweifaktorielle ANOVA mit *post-hoc* Dunnett's Test verwendet. Um den geeigneten statistischen Test zu identifizieren, wurde vorab die Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests überprüft. Folgende Signifikanzlevel wurden festgelegt:

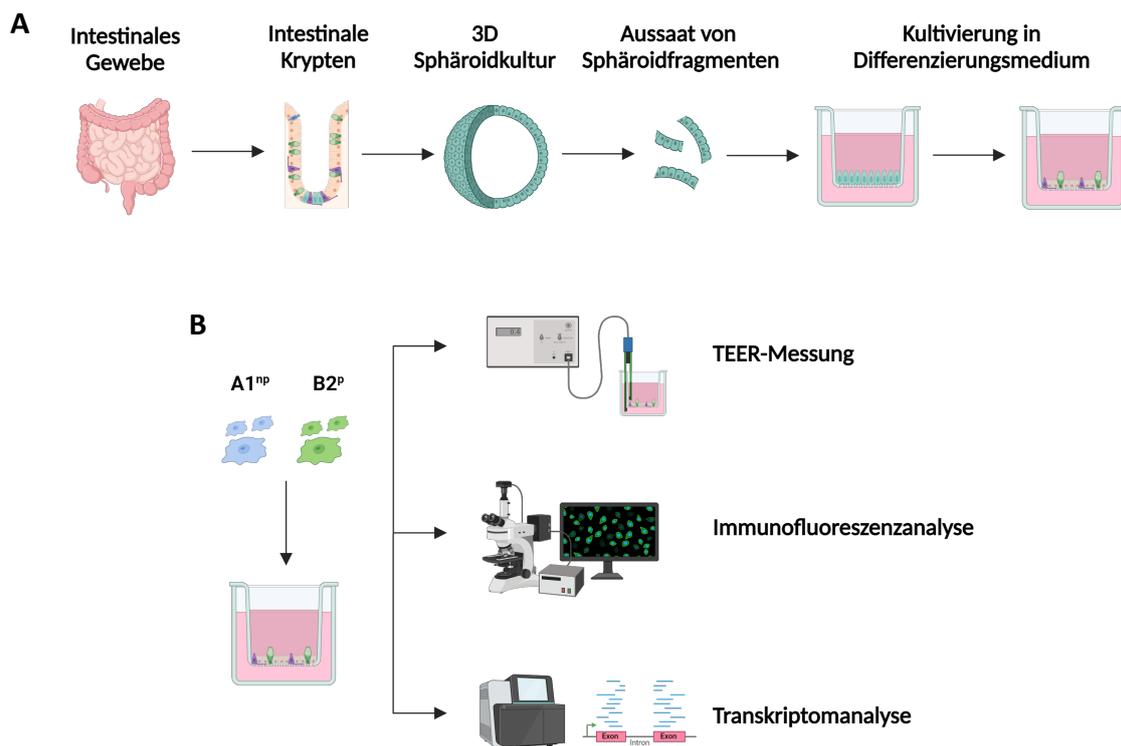
\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Arbeitsablauf zur Untersuchung der Interaktion zwischen *E. histolytica* Trophozoiten und Epithelzellen aus intestinalen Sphäroiden

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen primären intestinalen Epithelzellen (EC) und *E. histolytica* Trophozoiten untersucht. Dazu wurden Epithelzellschichten aus dreidimensionalen Sphäroiden (SDM-Kulturen) verschiedener Spezies und Gewebe im *transwell*-System erzeugt (Abbildung 4A). Sphäroide entwickeln sich aus Krypten, die aus intestinale Gewebe isoliert und in einer extrazellulären Matrix (ECM) eingebettet wurden. Um SDM-Kulturen zu generieren, wurden Sphäroidfragmente in *transwell*-Einsätze ausgesät und in Differenzierungsmedium kultiviert<sup>178; 179</sup>. Differenzierte SDM-Kulturen wurden mit zwei *E. histolytica* Klonen, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden (A1<sup>np</sup> = nicht pathogen, B2<sup>p</sup> = pathogen), co-inkubiert (Abbildung 4B). Um mögliche Unterschiede im Zusammenhang mit der intestinalen Gewebeinvasion zwischen den beiden Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> zu identifizieren, wurden verschiedene *downstream* Experimente durchgeführt. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde gemessen, um Trophozoiten-bedingte Veränderungen in der Barrierefunktion der Epithelzellschichten zu erfassen. Der Grad der Zerstörung der Epithelzellschicht wurde mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen (IFA) visualisiert. Weiterhin wurden Veränderungen in der Genexpression der Klone nach Kontakt zu intestinalen Zellen einerseits, sowie der intestinalen Zellen nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten andererseits, untersucht.

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 4: Schematischer Überblick über die Generierung von Epithelzellschichten aus intestinalen Sphäroiden und downstream Anwendungen.**

(A) Um dreidimensionale Sphäroidkulturen zu generieren, wurden Krypten aus intestinalem Gewebe isoliert und in einer extrazellulären Matrix (ECM) eingebettet. Sphäroidfragmente wurden auf einen mit ECM-Lösung beschichteten Filter im *transwell*-System ausgesät und in Differenzierungsmedium kultiviert (SDM-Kultur). (B) Differenzierte SDM-Kulturen wurden mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten co-inkubiert, um die Wirt-Parasit-Interaktionen mittels verschiedener *downstream* Experimente wie der Messung des transepithelialen Widerstandes (TEER), Immunofluoreszenzfärbungen und der Transkriptomanalyse zu untersuchen. Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

### 3.2 Kultur von intestinalen Sphäroiden

Murine intestinale Krypten wurden aus Kolongewebe isoliert und in einer ECM als Gerüst für dreidimensionales Wachstum eingebettet (Abschnitt 2.2.1.11)<sup>166</sup>. Humane Sphäroide wurden kommerziell erworben oder in der Arbeitsgruppe von A. Aebischer (Robert-Koch-Institut, Berlin) aus Biopsien oder Resektionen erzeugt (Abschnitt 2.1.1, Tabelle 1 für mehr Informationen zu den Spendern)<sup>173</sup>. Für die Langzeitkultur wurden die Sphäroide in einem proliferationsfähigen zystischen Stadium gehalten (Abbildung 5), wobei die richtige Zusammensetzung des Kulturmediums zur Nachbildung der Stammzellennische essenziell war. *Conditioned* Medium (CM) zweier verschiedener Zelllinien diente als Quelle für WNT3a, R-Spondin 1 und 3 (aktivieren den kanonischen Wnt/ $\beta$  Catenin-Signalweg) und Noggin (blockiert den BMP-Signalweg, Abschnitt 2.1.1.2 und 2.1.1.5)<sup>181</sup>. Die Qualität des produzierten R-Spondin 1-CM aus R-Spondin 1 exprimierenden 293T-Zellen wurde zunächst an wenigen Sphäroidkulturen getestet, bevor es im großen Maßstab im Kulturmedium eingesetzt wurde. Die Eigenpro-

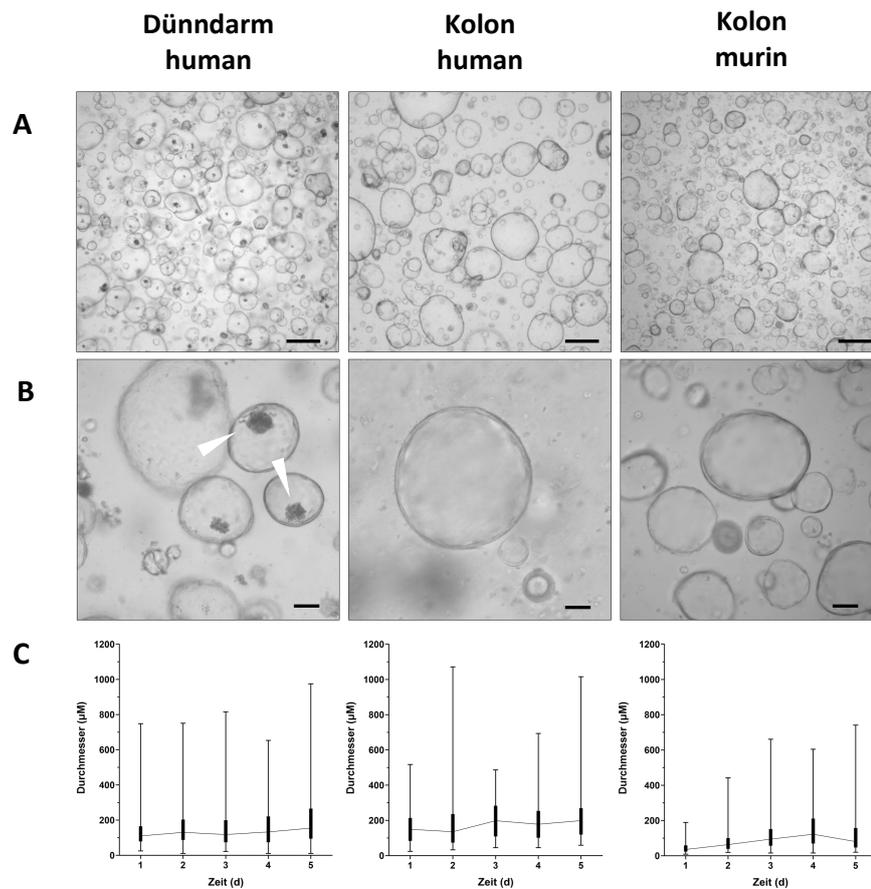
### 3 Ergebnisse

duktion von L-WRN-CM aus L-WRN-Zellen war nicht erfolgreich (Abbildung 7D), sodass es durch kommerzielles L-WRN-CM ersetzt wurde. Zusätzlich wurde das Medium mit rekombinantem Noggin, rekombinantem EGF, Nikotinamid (erhöht die mögliche Anzahl an Passagen), A83-01 (*transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  Inhibitor) und SB202910 (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitor) supplementiert<sup>173; 181; 182</sup>. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) wurde dem Kulturmedium humaner Sphäroide zugesetzt und förderte die Proliferationsfähigkeit der Zellen, sodass die Kulturen in höherem Maße expandiert werden konnten<sup>183</sup>. Zur Prävention von Anoikis während des Passagierens wurde der Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK)-1 Inhibitor Y-27632 verwendet.

Ebenso wichtig für den Erhalt proliferationsfähiger Sphäroidkulturen war der richtige Zeitpunkt des Passagierens, der zwischen vier und fünf Tagen nach der letzten Passage lag. Eine zu späte Subkultivierung führte durch den Abbau der ECM zur Differenzierung der Zellen (Abbildung 6) und folglich zu einem Verlust der Stammzeleigenschaften sowie zu einer verminderten Proliferationsfähigkeit der Zellen. Differenzierte Sphäroide waren an der Ausbildung kryptenartiger Strukturen (*budding*), der Verdickung der Epithelzellschicht und der Zunahme von ins Lumen abgegebener apoptotischer Zellen erkennbar (Abbildung 6).

Die Sphäroidkulturen wiesen die typisch zystische Form mit einer dünnen einlagigen Epithelzellschicht auf. Intestinale Sphäroide aus Kolon und Dünndarm sowie der verschiedenen Spezies waren optisch nicht voneinander zu unterscheiden (Abbildung 5A und Abbildung 5B).

## 3 Ergebnisse



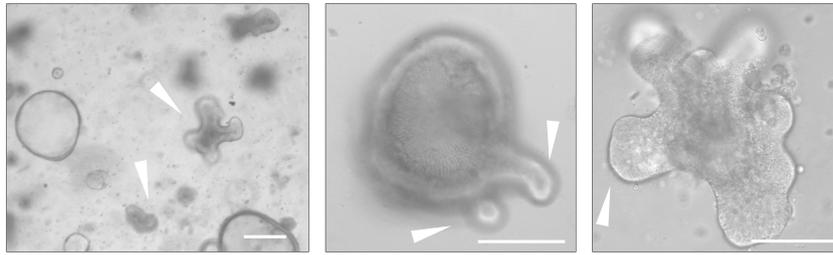
**Abbildung 5: Charakterisierung intestinaler Sphäroidkulturen.**

Gezeigt ist die Kultur intestinaler Sphäroide aus murinem Kolongewebe (#muK1), humanem Kolongewebe (#SCC323) und humanem Dünndarmgewebe (#SCC324). (A, B) Alle Sphäroidkulturen zeigten den charakteristischen Phänotyp, der durch eine zystische Form und eine dünne einlagige Epithelzellschicht gekennzeichnet ist. Die beginnende Abgabe apoptotischer Zellen ins Lumen war als dunkler Bereich im Inneren der Sphäroide erkennbar (B, gekennzeichnet durch weiße Pfeile). Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop *EVOS FL Auto* von Thermo Fisher Scientific, ausgestattet mit der *Evos FL Auto Imaging System* Software (A: alle, B: Dünndarm human und Kolon murin), oder am Fluoreszenzmikroskop *BZ-9000* von Keyence, ausgestattet mit der *BZ-II-Analyzer* Bildanalyse-Software (B: Kolon human), drei bis fünf Tage nach der letzten Passage aufgenommen. *Scale bar* = 600 µM (A) und 100 µM (B). (C) Gezeigt sind die Wachstumskurven muriner und humaner Dünndarm- und Kolonsphäroide über fünf Tage nach der letzten Passage im Vergleich. Dargestellt sind *box and whisker plots* mit Minimum und Maximum. Gemessen wurden die Durchmesser von Sphäroiden aus mindestens drei Passagen je eines Spenders (n = 53-488).

Alle Sphäroidkulturen waren heterogen in ihrer Größe, wobei murine Kolonsphäroide durchschnittlich den kleinsten und humane Kolonsphäroide durchschnittlich den größten Durchmesser aufwiesen. Der Durchmesser humaner Dünndarmsphäroide stieg über fünf Tage von 138 µM auf 194 µM (28,9 % Zunahme) und der humaner Kolonsphäroide von 166 µM auf 234 µM (29,1 % Zunahme, Abbildung 5C). Das größte humane Kolonsphäroid erreichte einen Durchmesser von 1.072 µM und das größte humane Dünndarmsphäroid von 975 µM. Der Durchmesser muriner Kolonsphäroide stieg im Mittel von 46 µM an Tag 1 auf 117 µM an Tag 5, was einer Zunahme von 60,7 % entspricht. Im Vergleich zu humanen Kolonsphäroiden nahm der Durchmesser muriner Kolonsphäroide stärker zu. Das

### 3 Ergebnisse

größte murine Kolonsphäroid erreichte eine Größe von 741  $\mu\text{M}$  und war damit kleiner als das größte humanen Sphäroid.



**Abbildung 6: Repräsentative mikroskopische Bilder differenzierter 3D-Kulturen.**

Als Beispiel für differenzierte intestinale Organoide sind murine 3D-Kulturen aus Kolongewebe (#muK1) acht Tage nach der letzten Passage gezeigt. Die Kulturen zeigen Zeichen der Differenzierung zu Organoiden, wie die Ausbildung von kryptenartigen Strukturen (gekennzeichnet durch weiße Pfeile) und eine verdickte Epithelzellschicht. Alle Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop *EVOS FL Auto* von Thermo Fisher Scientific, ausgestattet mit der *Evos FL Auto Imaging System* Software, aufgenommen. Scale bar = 100  $\mu\text{M}$  (Bild links) und 200  $\mu\text{M}$  (Bild mittig und rechts).

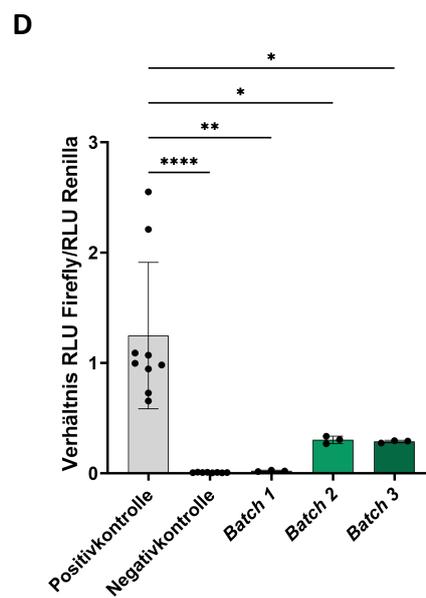
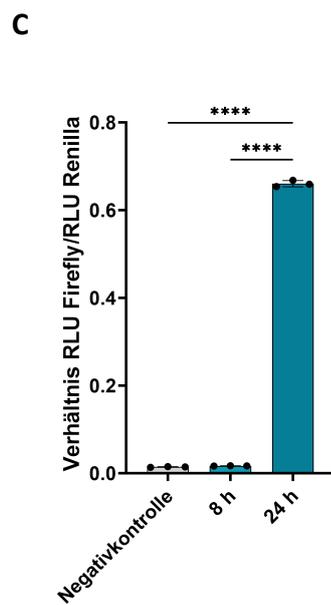
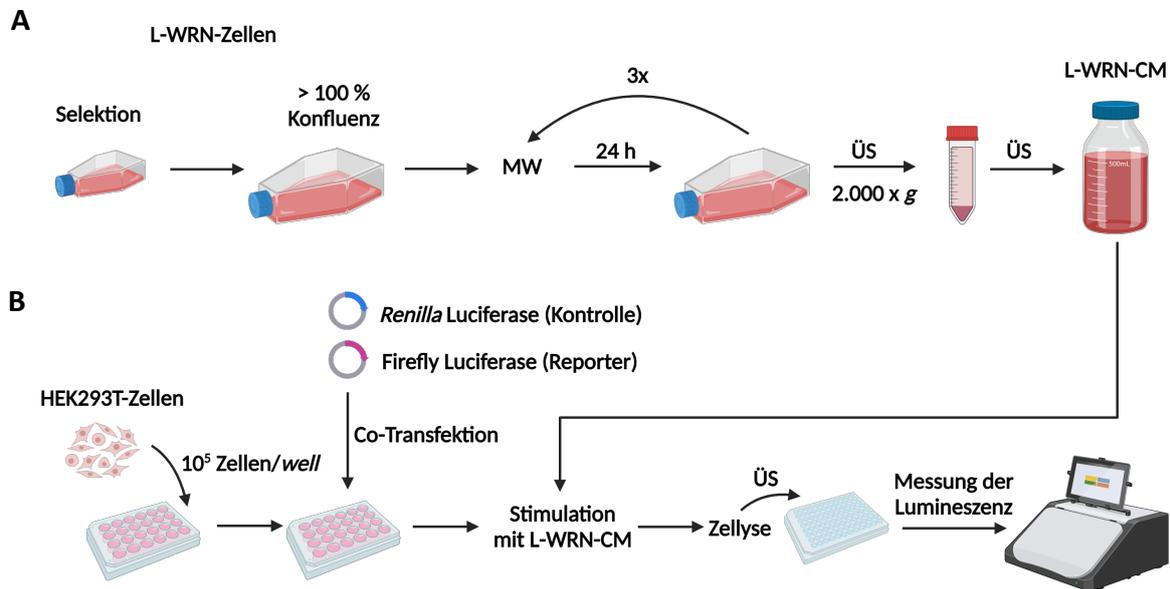
Nach zwölf Passagen nahm die Proliferationsfähigkeit humaner Kolonsphäroiden (#SCC323) stark ab, sodass sie für weitere Experimente nicht genutzt werden konnten.

#### 3.2.1 Produktion von L-WRN *conditioned*-Medium

Für die Kultur intestinaler Sphäroide wurde L-WRN-CM als Quelle für WNT verwendet (Abbildung 7A). Um die Proliferationsfähigkeit der Stammzellen in der Sphäroidkultur zu erhalten, ist aktives WNT im Kulturmedium essenziell. Die Herstellung des L-WRN-CM wurde schrittweise optimiert, um eine möglichst hohe WNT-Aktivität zu erreichen. L-WRN-Zellen wurden über sieben (*batch* 1 und 2) oder 14 Tage (*batch* 3) einer Konzentration von 0,5 mg/ml (*batch* 1) oder 1 mg/ml (*batch* 2 und 3) G-418 und Hygromycin B zur Selektion ausgesetzt. Das weitere Vorgehen zur Produktion des L-WRN-CM ist in Abschnitt 2.1.1.5 beschrieben. Vor dem Einsatz des L-WRN-CM im Kulturmedium wurde die WNT-Aktivität mithilfe des Luciferase Reporter Tests bestimmt (Abbildung 7B und Abbildung 7D). Dazu wurden transient co-transfizierte HEK293T-Zellen mit dem produzierten L-WRN-CM stimuliert und die WNT-Aktivität als Lumineszenzsignal der WNT-abhängigen Aktivität der Firefly Luciferase im Verhältnis zum Lumineszenzsignal der WNT-unabhängigen Aktivität der *Renilla* Luciferase als Kalibrator gemessen (Abbildung 7B und Abbildung 7D). Die optimale Stimulationszeit wurde vorab bestimmt und lag bei 24 h (Abbildung 7C). Die Stimulation mit dem L-WRN-CM aller drei *batches* führte zu einer höheren WNT-Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Erhöhung des Selektionsdrucks (*batch* 2) führte zu einem Anstieg der WNT-Aktivität um das Zehnfache (Abbildung 7D). Die zusätzliche Erhöhung der Selektionsdauer (*batch* 3) beeinflusste die WNT-Aktivität im L-WRN-CM nicht. In allen drei *batches* lag die WNT-Aktivität signifikant unter der der Positivkontrolle, die eine für die Kultur intestinaler Sphäroide ausreichende WNT-Aktivität aufweist. Das selbst produzierte L-WRN-CM wur-

## 3 Ergebnisse

de folglich nicht für die Kultivierung intestinaler Sphäroide eingesetzt. Als Ersatz diente kommerziell erhältliches L-WRN-CM.



## 3 Ergebnisse

### Abbildung 7: Schematische Darstellung der Produktion und Qualitätskontrolle von L-WRN-conditioned Medium.

(A) Zur Produktion von L-WRN-conditioned Medium (CM) wurde das Kulturmedium überkonfluenten L-WRN-Zellen nach 24 h Inkubation geerntet, zentrifugiert und der Überstand (ÜS) gesammelt. Dieser Schritt wurde bis zu dreimal wiederholt. (B) Um die WNT-Aktivität im L-WRN-CM zu bestimmen, wurden konfluente HEK293T-Zellen mit einem Kontrollplasmid, das das Gen für die *Renilla* Luciferase enthielt, und einem Reporterplasmid, das das Gen für die Firefly Luciferase unter der Kontrolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-abhängigen *T cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF)-Transkriptionsfaktors enthielt, transient co-transfiziert. Transfizierte Zellen wurden 24 h mit L-WRN-CM stimuliert, lysiert und das Lumineszenzsignal der *Renilla*- und Firefly-Luciferase am *GloMax Navigator* Mikroplatten-Luminometer gemessen. (C) Gezeigt sind gemessene Luciferase-Aktivitäten nach 8 h und 24 h Stimulation mit L-WRN-CM, das eine für die Kultur intestinaler Sphäroide ausreichende WNT-Aktivität aufweist, zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit. Für folgende Experimente wurde eine Inkubationszeit von 24 h gewählt, da ein deutlicher Anstieg der WNT-Aktivität im Vergleich zu 8 h zu verzeichnen war ( $n = 3$ ). (D) Dargestellt ist das Verhältnis des relativen Lumineszenzsignals (*relative light unit*, RLU) der Firefly Luciferase im Verhältnis zum RLU der *Renilla* Luciferase nach Anwendung verschiedener Protokolle zur Herstellung von L-WRN-CM (*batch* 1, 2 und 3). Als Negativkontrolle wurden transfizierte HEK293T-Zellen, die mit HEK293T-Medium inkubiert wurden, verwendet. Transfizierte HEK293T-Zellen, die mit L-WRN-CM für die Langzeitkultur von intestinalen Sphäroiden ausreichender WNT-Aktivität stimuliert wurden, dienten als Positivkontrolle. Das relative Lumineszenzsignal und damit die WNT-Aktivität lag in allen drei *batches* unter dem Signal der Positivkontrolle ( $n = 3-9$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einer einfaktoriellem ANOVA und anschließendem *post-hoc* Tukey Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

### 3.3 Generierung von Epithelzellschichten aus intestinalen Sphäroiden

Um differenzierte, dichte SDM-Kulturen aus intestinalen Sphäroiden zu generieren, wurden die Sphäroide enzymatisch verdaut und anschließend mechanisch in Fragmente zerlegt. Diese Fragmente wurden auf einen mit ECM-Lösung beschichteten Filter im *transwell*-System gesät. Die Differenzierung der Zellen wurde durch den Entzug der Faktoren WNT3a (graduell: 50 %/ 5 %/ 0 %, Abbildung 8A), A-8301 und SB202190, die die Anreicherung von Stammzellen begünstigen, aus dem Kulturmedium induziert.

#### 3.3.1 Charakterisierung von intestinalen SDM-Kulturen

Immunfluoreszenztests (IFA) und die Messung des TEER wurden verwendet, um die Formierung einer geschlossenen Epithelzellschicht zu validieren (Abbildung 8). Präsenzte Zelltypen und die Polarisierung der Epithelzellen wurden mithilfe von IFA untersucht (Abbildung 9 und Abbildung 10).

Die Messung des TEER zeigte, dass sich alle SDM-Kulturen zu elektrophysiologisch dichten Epithelzellschichten entwickeln können (Abbildung 8). In der Beständigkeit dieser Entwicklung gab es deutliche Unterschiede zwischen den Spezies und den Gewebetypen. Alle ausgesäten humanen duodenalen SDM-Kulturen (#SCC324,  $n = 52$ , 100 %) entwickelten sich zu elektrophysiologisch dichten Epithelzellschichten, wohingegen nur ein Teil der ausgesäten humanen (#SCC323, 1 von 4, 25 %) und murinen (#muK1, 7 von 44, 16 %) SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden diese Entwicklung zeigten.

### 3 Ergebnisse

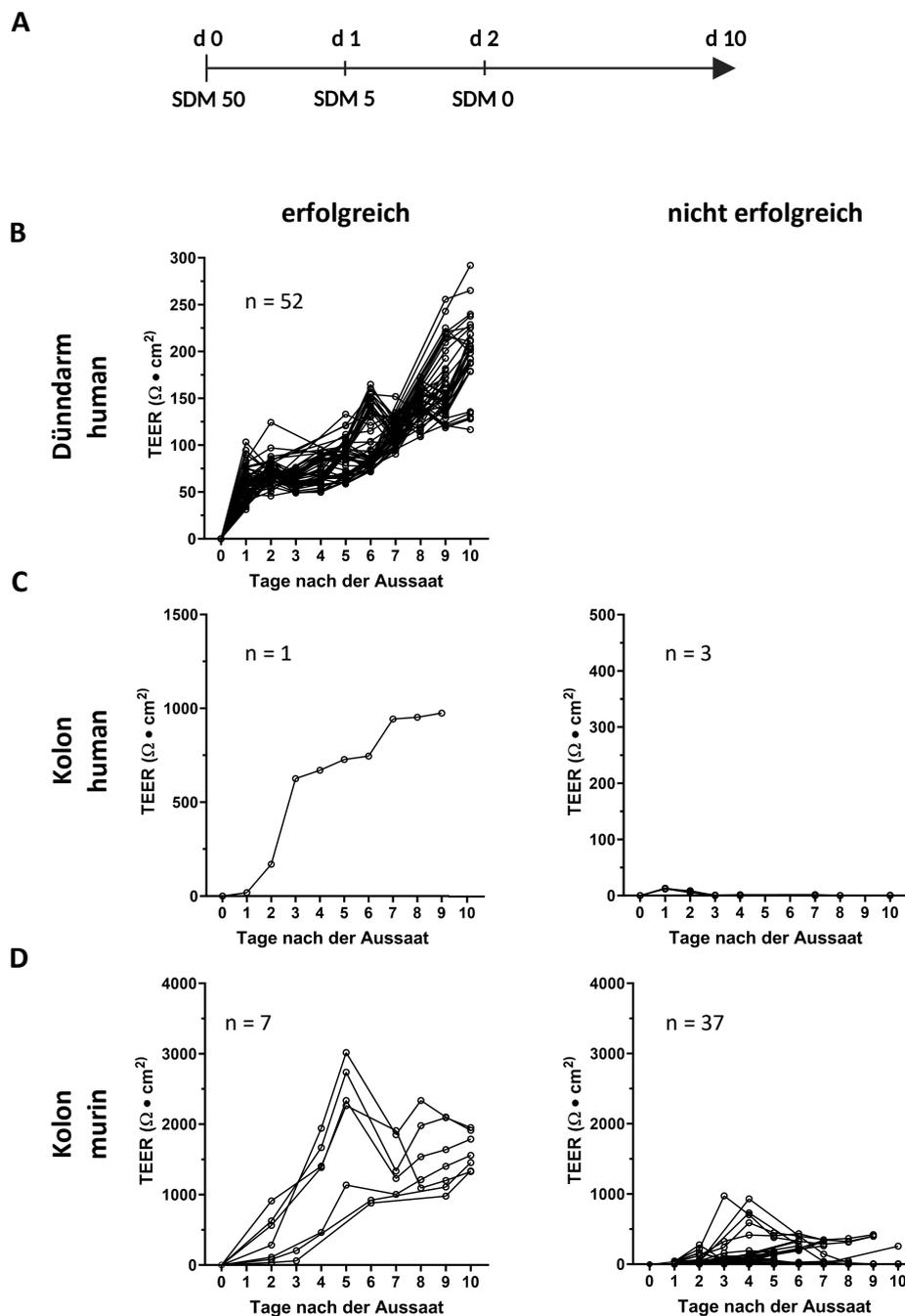
SDM-Kulturen aus humanen Dünndarmsphäroiden erreichten nach zehn Tagen einen TEER-Wert von im Mittel  $197 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , mit einem maximalen Wert von  $292 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . (Abbildung 8B). Der TEER stieg kontinuierlich an und stabilisierte sich nach neun Tagen.

Die Kultur humaner Kolonsphäroide stellte nach zwölf Passagen das Wachstum ein, weshalb nur insgesamt vier SDM-Kulturen ausgesät werden konnten. Eine der vier Kulturen erreichte nach sieben Tagen einen TEER-Wert von  $945 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der innerhalb der folgenden zwei Tage nur noch leicht bis auf  $975 \Omega \cdot \text{cm}^2$  anstieg (Abbildung 8C). Wie bei humanen duodenalen SDM-Kulturen stieg der TEER kontinuierlich an, erreichte im Vergleich aber wesentlich höhere Werte. Der TEER der verbleibenden drei Kulturen aus Kolonsphäroiden stieg nicht an und lag im Bereich von unter  $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Abbildung 8C).

Der TEER erfolgreicher muriner SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden erreichte nach acht Tagen einen Wert von  $1.631 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der sich über die folgenden zwei Tage auf diesem Niveau stabilisierte ( $1.618 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an Tag 10, Abbildung 8D). Der höchste gemessene TEER-Wert lag bei  $2.337 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , womit murine SDM-Kulturen verglichen mit humanen SDM-Kulturen (Dünndarm und Kolon) die höchsten Werte erreichten. Murine SDM-Kulturen wiesen im Gegensatz zu humanen Kulturen zwei Muster der erfolgreichen Formation auf. Ein Teil ( $n = 3$ ) zeigte einen kontinuierlichen Anstieg des TEER. Der andere Teil ( $n = 4$ ) entwickelte Höchstwerte von im Mittel  $2.588 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an Tag 5, die daraufhin leicht sanken und sich an Tag 8 bei  $1.736 \Omega \cdot \text{cm}^2$  stabilisierten. Ähnliche Muster in der TEER-Entwicklung zeigten die nicht erfolgreichen murinen SDM-Kulturen (Abbildung 8D). Ein Teil ( $n = 5$ ) zeigte nach Induktion der Differenzierung einen starken Anstieg des TEER-Wertes auf bis zu  $930 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Tag 3-4), der innerhalb der nächsten zwei Tage wiederum bis auf  $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$  abnahm. Die Mehrzahl der nicht erfolgreichen Kulturen ( $n = 32$ ) zeigte keinen oder einen nur sehr leichten Anstieg des TEER-Wertes.

Aufgrund der unbeständigen Formierung stabiler, dichter SDM-Kulturen aus humanen und murinen Kolonsphäroiden konnten ausschließlich humane duodenale SDM-Kulturen (#SCC324) weiter charakterisiert werden.

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 8: Kulturbedingungen und Entwicklung des transepithelialen elektrischen Widerstands der intestinalen Epithelzellkulturen verschiedener Spezies und Gewebe.**

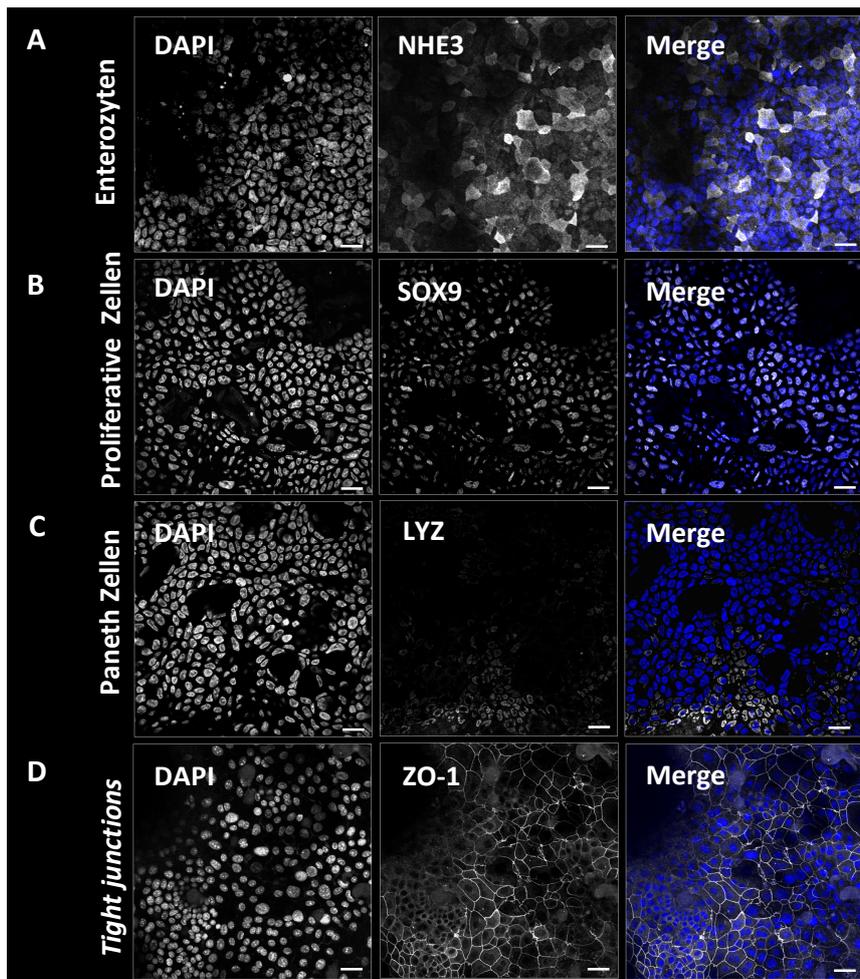
(A) Übersicht über verwendete Medien zur Differenzierung der Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden (SDM-Kulturen). WNT3a wurde stufenweise durch Entfernung des L-WRN-CM (50 % an Tag 0 = SDM 50, 5 % an Tag 1 = SDM 5, 0 % ab Tag 2 = SDM 0) aus dem Kulturmedium entzogen. Das Bild wurde mit BioRender erstellt. (B-D) Gemessener transepithelialer Widerstand (TEER) erfolgreicher (links) sowie nicht erfolgreicher (rechts) humaner duodenaler (B, #SCC324) sowie humaner (C, #SCC323) und muriner (D, #muK1) SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden (n = 1-52).

### 3 Ergebnisse

Die Präsenz intestinaler Zelltypen elektrophysiologisch dichter humaner SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden (#SCC324) wurde mittels IFA untersucht (Abbildung 9). Dabei wurde der Enterozytenmarker NHE3 (Abbildung 9A) sowie die Marker für Paneth Zellen (LYZ, Abb. 9C) und proliferative Zellen (SOX9, Abbildung 9B) nachgewiesen. NHE3 markiert die apikale *brush border* der Enterozyten und konnte in den duodenalen SDM-Kulturen nachgewiesen werden. Proliferative Zellen wurden durch die Detektion von SOX9 im Nukleus (markiert mit DAPI) identifiziert. Lysozym (LYZ), als Marker für Paneth Zellen, wurde im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen. Außerdem konnte das TJ Protein ZO-1 auf der gesamten Fläche des Filters detektiert werden (Abbildung 9D), was die Entwicklung einer dichten, lückenlosen Epithelzellschicht zeigt (Negativkontrollen siehe Abbildung A32).

Die dunklen rundlichen Bereiche der Epithelzellschicht sind geschlossene 3D-Strukturen, die durch Fahren durch die Ebenen mit dem konfokalen Mikroskop sichtbar wurden (Abbildung 9A-D). Weiterhin sollte bemerkt werden, dass die Filter nicht komplett straff und gerade auf dem Objektträger platziert werden konnten, sodass dunkle Bereiche außerhalb des eingestellten Fokus sichtbar sind (Abbildung 9A und Abbildung 9D).

## 3 Ergebnisse

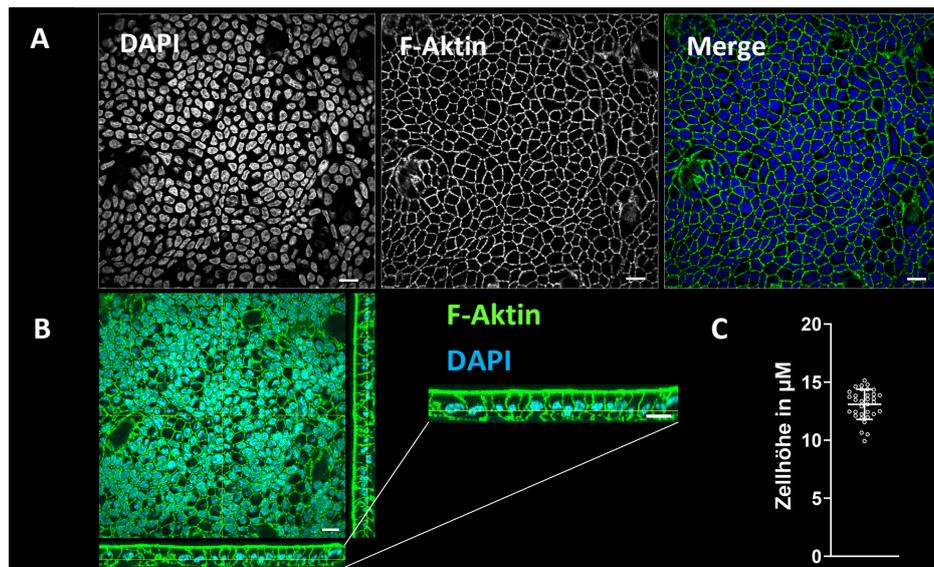


**Abbildung 9: Charakterisierung humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden mittels Immunfluoreszenzfärbung.**

Humane Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden (#SCC324) wurden mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen (IFA) hinsichtlich präsenster Zelltypen und der Ausbildung von *tight junctions* (TJ) charakterisiert. Alle Bilder wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop *FLUOVIEW FV3000* von Olympus, ausgestattet mit der *FV315-SW* Software, aufgenommen und mit *Fiji Version 2.15.1* bearbeitet. Nuclei wurden mit DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt. (A) Detektion des Enterozytenmarkers NHE3 (weiß), (B) Detektion von SOX9 als Marker für proliferative Zellen (weiß), (C) Nachweis von LYZ als Marker für Paneth Zellen (weiß), (D) Nachweis von ZO-1 als Marker für TJ (weiß). *Scale bar* = 20 µm.

Humane duodenale SDM-Kulturen wiesen eine apikal-basale Polarisierung auf und entwickelten eine *brush border*, nachgewiesen durch die apikale Anreicherung von F-Aktin (Abbildung 10B) und Detektion von NHE3 (Abbildung 9A). Die mittlere Höhe der Zellen betrug 13,1 µm (Abbildung 10C).

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 10: Polarisierung humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden.**

Die apikal-basale Polarisierung humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden (SDM-Kultur, #SCC324) wurde mit Hilfe von Immunofluoreszenzfärbungen (IFA) untersucht. Alle Bilder wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop *FLUOVIEW FV3000* von Olympus, ausgestattet mit der *FV315-SW* Software, aufgenommen und mit *Fiji Version 2.15.1* bearbeitet. Nuclei wurden mit DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt. (A) F-Aktin wurde mit Phalloidin detektiert und ist in grün dargestellt. (B) Orthogonale *z-stacks* zeigen eine Akkumulation des F-Aktins auf apikaler Seite der intestinalen Zellen. (C) Gemessene Höhe humaner duodener SDM-Kulturen dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. Gemessen wurden jeweils elf Zellen von insgesamt drei SDM-Kulturen. *Scale bar* = 20  $\mu\text{M}$ .

### 3.4 Effekt von *E. histolytica* Trophozoiten auf die Integrität humaner Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden

Epithelzellkulturen aus humanen Dünndarm- und Kolonsphäroiden wurden mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten co-inkubiert, um die Wirt-Parasit-Interaktion zu untersuchen und dabei mögliche Unterschiede zwischen den Klonen zu identifizieren. Die Messung des TEER und IFA wurden verwendet, um den Einfluss der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der Epithelzellschicht zu untersuchen. Alle folgenden Experimente wurden mit SDM-Kulturen aus Sphäroiden, die aus Biopsien von humanem Kolon- (#huK1) oder Dünndarmgewebe (#CBF1) generiert wurden, am Robert Koch-Institut (RKI, Berlin) in der AG Aebischer durchgeführt. Differenzierte SDM-Kulturen wurden freundlicherweise von der AG Aebischer (RKI, Berlin) bereitgestellt. Alle Co-Inkubationsexperimente mit *E. histolytica* Trophozoiten sowie die Auswertung der generierten Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, selbst durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.4.1 Einfluss der Trophozoitenanzahl auf die Barrierefunktion

Die Fähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten, über längere Zeit aerobe Bedingungen zu tolerieren, wurde vor Beginn der Co-Inkubationsexperimente geprüft. Nach 24 h unter aeroben Bedingungen im Zellkulturinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> betrug die Überlebensfähigkeit der Trophozoiten 69 %. Die Trophozoiten waren adhärent und bewegungsfähig (Abbildung A31). Zudem wurde vorab die Expression von Markergenen der A1<sup>pp</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten bestimmt, um die Integrität der Klone sicherzustellen (Abbildung A30).

Die Entwicklung des TEER der Kontrollkulturen zeigte, dass sich der Messvorgang Gewebetypspezifisch auf den TEER-Wert auswirkte (Abbildung 11). Durch die Messung waren die EC immer wieder Schwankungen der Temperatur und des CO<sub>2</sub>-Gehalts ausgesetzt. Humane SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden reagierten empfindlicher auf diese Schwankungen (Abbildung 11A und Abbildung 11B) verglichen mit humanen SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden (Abbildung 11C und Abbildung 11D). Innerhalb von 12 h Co-Inkubation sank der TEER der SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden auf 61,4 % des Anfangswerts, wobei sich der Wert bei SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden nicht veränderte und konstant bei etwa 100 % lag. Zwischen den letzten beiden Messzeitpunkten (12 h und 24 h) änderte sich der TEER der Kontrollkulturen aus Kolonsphäroiden nicht und der TEER der Kontrollkulturen aus Dünndarmsphäroiden stieg auf 118,6 % des Anfangswerts, was auf den großen zeitlichen Abstand zwischen den Messungen zurückzuführen sein kann. IFA zeigten, dass die Epithelzellschichten der Kontrollansätze beider Gewebetypen intakt waren (Abbildung 12B und Abbildung 13B).

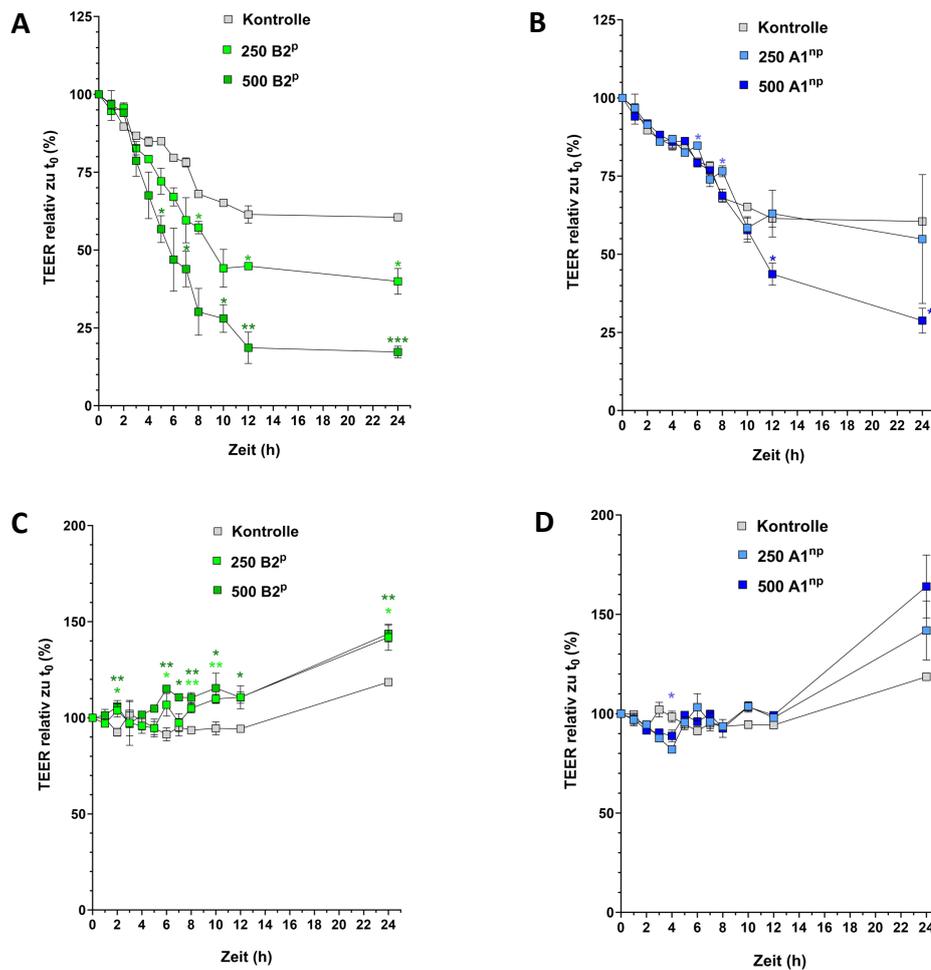
Der Kontakt duodenaler SDM-Kulturen zu Trophozoiten führte zu einem Anstieg des TEER innerhalb von 24 h Co-Inkubation über den der Kontrollen, unabhängig von der Anzahl der Trophozoiten und des Klons (Abbildung 11C und Abbildung 11D). Dieser Effekt war allerdings nur bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten signifikant. Beide Klone waren nicht in der Lage, die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden innerhalb von 24 h zu beeinträchtigen. Der Kontakt der SDM-Zellen zu Lysat aus 10.000 B2<sup>p</sup> Trophozoiten beeinflusste den TEER innerhalb von 8 h nicht (Daten nicht gezeigt).

Bei SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden fiel der TEER mit höherer Trophozoitenanzahl stärker ab, unabhängig vom Klon (Abbildung 11A und Abbildung 11B). Wurden die Zellen mit 500 B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubiert, sank der TEER innerhalb von 5 h signifikant unter den der Kontrolle auf 56,7 % des Anfangswertes und erreichte nach 12 h einen Wert von 18,6 %, der innerhalb der nächsten 12 h auf 17,3 % sank (Abbildung 11A). Eine Inkubation der SDM-Kulturen mit einer geringeren Anzahl von 250 B2<sup>p</sup> Trophozoiten führte ebenso zu einer Abnahme des TEER, allerdings weniger stark. Nach 8 h Inkubation lag der TEER mit 57,2 % des Anfangswertes signifikant unter dem Wert der Kontrolle und sank

### 3 Ergebnisse

weiter bis auf 39,9 % innerhalb von 24 h (Abbildung 11A). Wurden die SDM-Kulturen mit 500 A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubiert, begann der TEER innerhalb von 12 h auf 43,7 % des Anfangswertes zu sinken und lag damit signifikant unter dem Wert der Kontrolle und sank im Verlauf der nächsten 12 h weiter bis auf 28,8 % (Abbildung 11B). 250 A1<sup>np</sup> Trophozoiten waren nicht in der Lage, die Barrierefunktion der Epithelzellschicht zu beeinträchtigen (Abbildung 11B). Das Muster der Entwicklung des TEER-Werts nach Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten (250 und 500) in den ersten 10 h gleicht dem der Kontrolle (Abbildung 11B).

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 11: Einfluss von *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten generiert aus intestinalen Sphäroiden.**

Humane Epithelzellschichten aus intestinalen Sphäroiden (SDM-Kulturen) wurden mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten oder TY-Medium als Kontrolle für 24 h co-inkubiert. Der Einfluss der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der Epithelzellschicht wurde mittels TEER-Messung untersucht. (A, B) Dargestellt ist die Entwicklung des TEER humaner SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden (#huK1) nach Co-Inkubation mit B2<sup>P</sup> (A) und A1<sup>np</sup> (B) *E. histolytica* Trophozoiten relativ zum TEER des Startzeitpunkt  $t_0$ . (C, D) Zu sehen ist die Entwicklung des TEER humaner SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden (#CBF1) nach Co-Inkubation mit B2<sup>P</sup> (C) und A1<sup>np</sup> (D) *E. histolytica* Trophozoiten relativ zum TEER des Startzeitpunkt  $t_0$ . Gezeigt sind die Mittelwerte von drei bis sechs SDM-Kulturen mit Standardfehlern. Signifikante Unterschiede zwischen dem jeweiligen Klon und der Kontrolle wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA und anschließendem *post-hoc* Dunnett's Test bestimmt (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). Hellgrüne (250 B2<sup>P</sup>), dunkelgrüne (500 B2<sup>P</sup>), hellblaue (250 A1<sup>np</sup>) und dunkelblaue (500 A1<sup>np</sup>) Sternchen markieren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.

### 3.4.2 Vergleich des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Integrität von Epithelzellkulturen aus Kolonsphäroiden

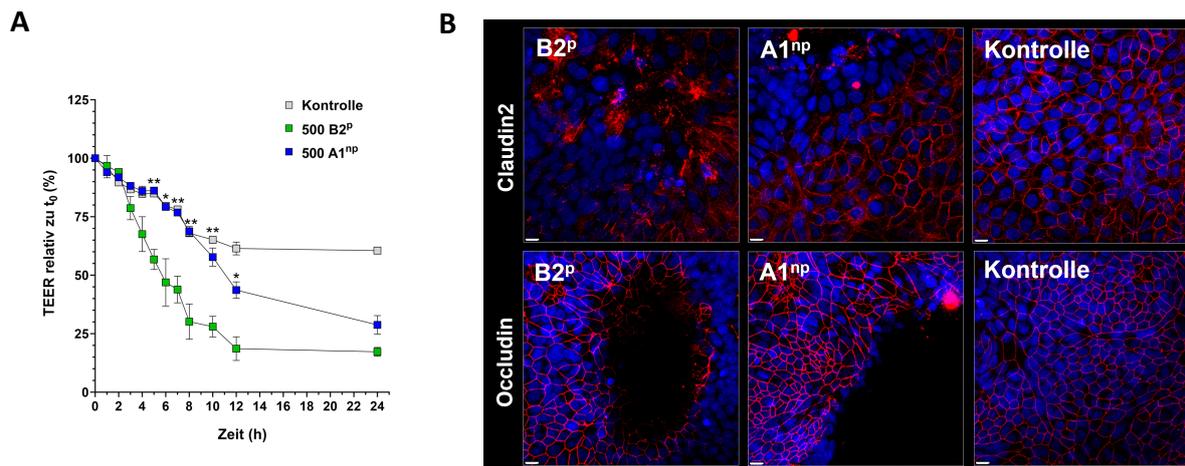
Beide *E. histolytica* Klone waren in der Lage, die Barrierefunktion humaner SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden zu stören, wobei B2<sup>P</sup> Trophozoiten signifikant effektiver waren, verglichen mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten (Abbildung 12). Wurden intestinale Epithelzellen mit 500 B2<sup>P</sup> Trophozoiten co-inkubiert, begann der TEER innerhalb von 3 h stark zu sinken (Abbildung 12A). Dieser Effekt war bei

### 3 Ergebnisse

einer Co-Inkubation mit 500 A1<sup>np</sup> Trophozoiten erst nach 10 h zu beobachten (Abbildung 12A). Nach 6 h Co-Inkubation mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten sank der TEER auf 46,9 % des Anfangswertes, wohingegen dieser Wert erst nach der doppelten Inkubationszeit von 12 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten erreicht war (Abbildung 12A). Innerhalb von 24 h näherte sich der TEER beider Klone an (28,8 % bei A1<sup>np</sup> und 17,3 % bei B2<sup>p</sup>, Unterschied nicht signifikant, Abbildung 12A). Signifikante Unterschiede zwischen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> in der Störung der Barrierefunktion der Epithelzellschicht waren vor allem in der frühen Phase der Co-Inkubation festzustellen (zwischen 5 h und 12 h Inkubation), wobei B2<sup>p</sup> Trophozoiten früher und stärker zu einer Abnahme des TEER führten, verglichen mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten (Abbildung 12A).

Zur Visualisierung von Trophozoiten-bedingten Schäden in der Epithelzellschicht wurden die Zellen nach 24 h Inkubation mit 500 Trophozoiten fixiert und die TJ Proteine Claudin2 und Occludin immunofluoreszent gefärbt (Abbildung 12B). Dabei wurden dunkle zellfreie Bereiche bei mit Trophozoiten inkubierten SDM-Kulturen sichtbar, die in den Kontrollkulturen nicht zu finden waren. Unterschiede zwischen mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubierten SDM-Kulturen waren nicht erkennbar, was auf den späten Zeitpunkt der Fixierung zurückzuführen sein kann. Um sicherzustellen, dass sich keine Schäden in der Epithelzellschicht der Kontrollkulturen befanden, wurde die komplette Oberfläche mikroskopisch untersucht. Im Bereich der Schäden wurde mit dem konfokalen Mikroskop durch die Ebenen gefahren, um zu garantieren, dass es sich nicht um geschlossene 3D-Strukturen handelt (vergleiche dazu Abschnitt 3.3.1 und Abbildung 9).

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 12: Vergleich des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten aus Kolonsphäroiden.**

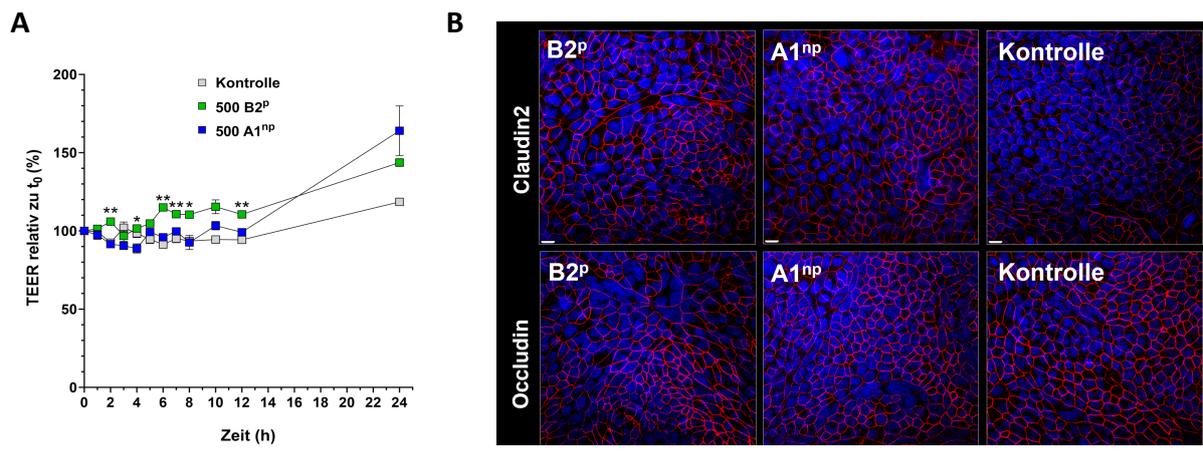
Humane SDM-Kulturen generiert aus Kolonsphäroiden (#huK1) wurden mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten sowie TY-Medium als Kontrolle für 24 h co-inkubiert. Der Einfluss der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der Epithelzellschicht wurde mittels TEER-Messung und Immunofluoreszenzfärbung (IFA) untersucht. (A) Dargestellt ist die Entwicklung des TEER nach Co-Inkubation mit 500 *E. histolytica* Trophozoiten relativ zum TEER des Startzeitpunkt  $t_0$ . Gezeigt sind die Mittelwerte von drei bis sechs SDM-Kulturen mit Standardfehlern. Mit dem *t*-Test für unabhängige Stichproben wurde auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klonen getestet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). (B) Zu sehen sind IFA der *tight junction* Proteine Claudin2 und Occludin (rot) der SDM-Kulturen nach 24 h Co-Inkubation mit 500 A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten sowie der Kontrollen zur Visualisierung von Schäden in der Zellschicht (erkennbar als dunkle Bereiche). Nuclei wurden mit DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt. Färbung, Mikroskopie und Bearbeitung der Bilder wurden von Antonia Müller (Robert-Koch-Institut, Berlin) durchgeführt. Scale bar = 10  $\mu$ M.

### 3.4.3 Vergleich des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Integrität von Epithelzellkulturen aus Dünndarmsphäroiden

Beide *E. histolytica* Klone waren nicht in der Lage, die Barrierefunktion humaner SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden zu schwächen (Abbildung 13). Wurden intestinale EC mit 500 B2<sup>p</sup> Trophozoiten co-inkubiert, begann der TEER anzusteigen mit signifikant höheren Werten im Vergleich zu Kulturen, die mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten co-inkubiert wurden (Abbildung 13A). Nach 24 h Co-Inkubation lag der TEER der mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten SDM-Kulturen mit 164 % des Anfangswerts über dem der mit B2<sup>p</sup> inkubierten Kulturen mit 143,7 %, wobei dieser Effekt nicht signifikant war (Abbildung 13A).

Die Ergebnisse der IFA (Abbildung 13B) unterstützen die Ergebnisse der TEER-Messung. Nach 24 h Co-Inkubation mit *E. histolytica* Trophozoiten war in keiner der Kulturen ein Schaden in der Epithelzellschicht zu erkennen. Zwischen mit TY-Medium, A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten SDM-Kulturen war kein Unterschied zu erkennen. Um sicherzustellen, dass sich in keiner der Kulturen ein Schaden befand, wurde die gesamte Filteroberfläche untersucht.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 13: Vergleich des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden.**

Humane Epithelzellschichten generiert aus Dünndarmsphäroiden (SDM-Kulturen, #CBF1) wurden mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten oder TY-Medium als Kontrolle für 24 h co-incubiert. Der Einfluss der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der Epithelzellschicht wurde mittels TEER-Messung und Immunofluoreszenzfärbung (IFA) untersucht. (A) Dargestellt ist die Entwicklung des TEER nach Co-Inkubation mit 500 *E. histolytica* Trophozoiten relativ zum TEER des Startzeitpunkt  $t_0$ . Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardfehler ( $n = 3-6$ ). Mit dem  $t$ -Test für unabhängige Stichproben wurde auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klonen getestet (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). (B) Zu sehen sind die IFA der *tight junction* Proteine Claudin2 und Occludin (rot) der SDM-Kulturen nach 24 h Co-Inkubation mit 500 A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten sowie der Kontrollen zur Visualisierung von Schäden in der Zellschicht. Nuclei wurden mit DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt. Färbung, Mikroskopie und Bearbeitung der Bilder wurden von Antonia Müller (Robert-Koch-Institut, Berlin) durchgeführt. Scale bar = 10 μM.

### 3.5 Analyse der Parasiten- und Epithelzelltranskriptome

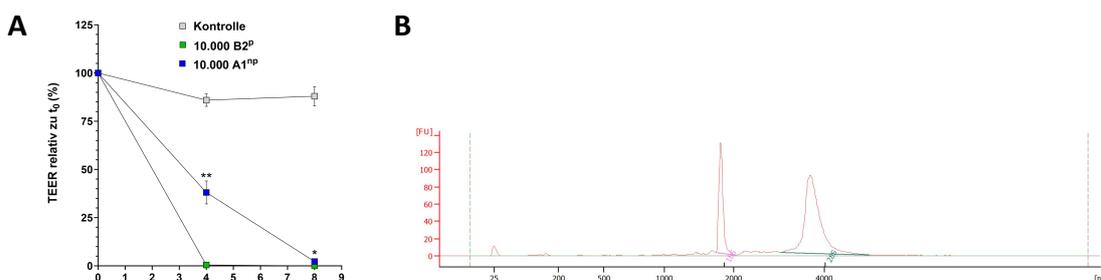
Mittels dualer RNA-Sequenzierung (RNAseq) wurde die Regulation der Genexpression sowohl in den beiden *E. histolytica* Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> als auch in den intestinalen EC nach Kontakt zueinander untersucht, um mögliche Unterschiede in der Reaktion der EC auf die beiden Klone bzw. in der Reaktion der A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten auf den Kontakt zu den EC zu identifizieren. Humane EC aus Kolon- (#huK1) oder Dünndarmsphäroiden (#CBF1) wurden mit je 10.000 A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h oder 8 h inkubiert. Als Kontrollen für die Analyse der humanen Transkriptome dienten EC, die mit TY-Medium ohne Trophozoiten inkubiert wurden und für die Analyse der Parasitentranskriptome dienten Trophozoiten, die mit TY-Medium ohne Zellen inkubiert wurden. Pro Kondition wurden drei SDM-Kulturen analysiert. Eine Ausnahme bildeten die über 4 h mit Trophozoiten inkubierten SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden mit sechs analysierten Replikaten. Nach Inkubation der EC mit den Trophozoiten wurde die RNA isoliert und auf Degradierung überprüft (Abbildung 14B). Nur qualitativ hochwertige RNA wurde für das NGS eingesetzt. Ein früher Inkubationszeitpunkt von 4 h wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Degradierung der Barriere von SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden zwischen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten, bestimmt durch Messung des TEER, detektiert wurde (Abbildung 14A). Eine Inkubationszeit von 8 h wurde gewählt, da die Barriere der Epithelzellschichten zu diesem Zeitpunkt durch beide Klone maximal geschädigt war (Abbildung 14A und Abbildung 19A). Die Inkubationszeiten sowie die Co-Inkubation der Dünndarme-

### 3 Ergebnisse

pithelzellen (DEC) mit 10.000 Trophozoiten, wurden im Rahmen der Dissertation von C. König etabliert und durchgeführt<sup>180</sup>.

#### 3.5.1 Das Transkriptom humaner Epithelzellen aus Kolonsphäroiden nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten

Humane EC aus Kolonsphäroiden wurden 4 h oder 8 h mit TY-Medium (Kontrolle), 10.000 A1<sup>np</sup> oder 10.000 B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten co-inkubiert. Die Auswirkungen auf das Transkriptom der EC bedingt durch die Trophozoiten wurde untersucht. Vor Beginn des Experiments und nach 4 h und 8 h Co-Inkubation wurde der TEER gemessen, um den Effekt der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der EC zu quantifizieren. Beide Klone beeinträchtigten die Integrität der Epithelzellschicht stark, wobei B2<sup>p</sup> Trophozoiten die Barriere signifikant schneller durchbrachen als A1<sup>np</sup> Trophozoiten (Abbildung 14A). Nach 8 h Inkubationszeit lag der TEER bei beiden Klonen nahe 0 % des Startwerts (Abbildung 14A).

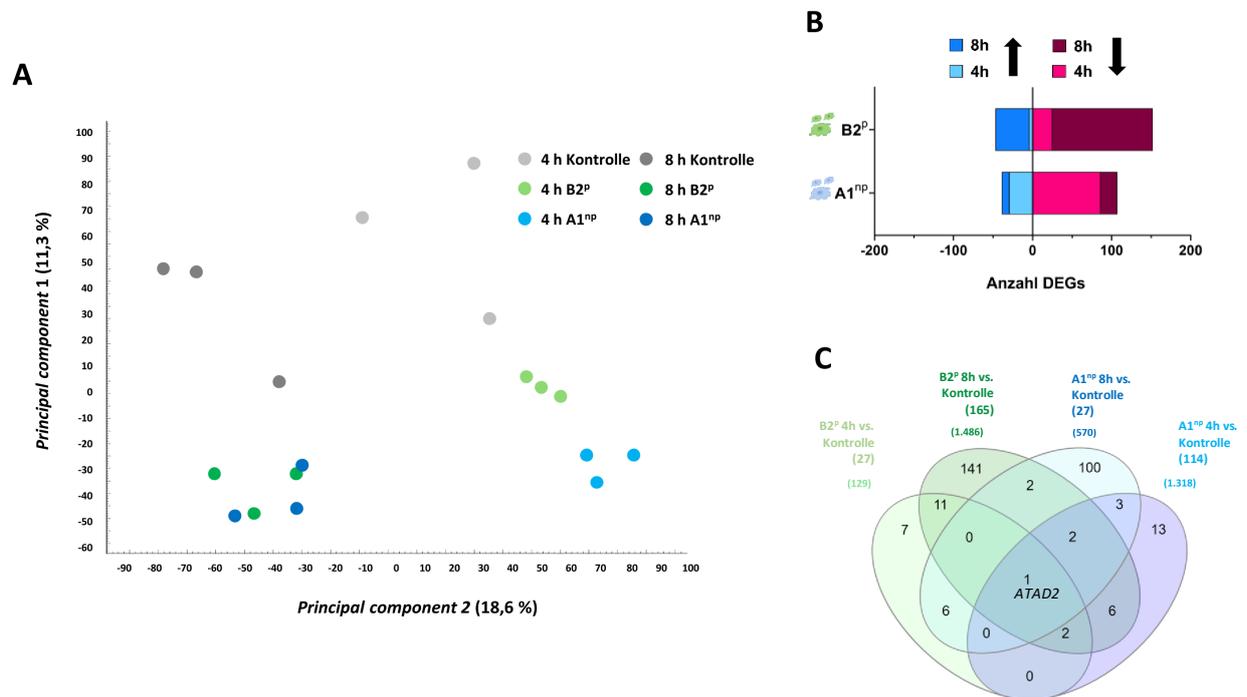


**Abbildung 14: Vorbereitung der Proben für die Transkriptomanalyse.**

Humane Epithelzellen aus Kolonsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h oder 8 h co-inkubiert und für die Transkriptomanalyse eingesetzt (n = 3). (A) Verlauf des TEER nach Co-Inkubation mit TY-Medium, A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten relativ zum TEER des Startzeitpunktes  $t_0$ . Signifikanzlevel wurden mit dem *t*-Test für unabhängige Stichproben bestimmt (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). (B) Repräsentatives Elektropherogramm zur Bewertung der Qualität isolierter RNA erzeugt mit dem *Agilent 2100 Bioanalyser* ausgestattet mit der *2100 Expert Software*. Gezeigt ist das Elektropherogramm einer Probe mit einem RIN-Wert von 9,8.

Um einen Überblick über die Transkriptomdaten zu bekommen, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) durchgeführt. Dabei haben voneinander entfernt liegende Proben eine geringe Ähnlichkeit und nahe beieinander liegende Proben eine hohe Ähnlichkeit in den Genexpressionsdaten. Die Auswertung der PCA zeigte dabei einen Einfluss sowohl der Inkubationszeit, als auch des Kontakts der EC zu Trophozoiten auf das Genexpressionsmuster (Abbildung 15A). Ausschließlich nach 4 h Co-Inkubation war ein Klon-spezifischer Einfluss auf die Transkriptomdaten der EC erkennbar (Abbildung 15A). Obwohl die Replikate der Kontrollproben nicht sehr stark miteinander clustern (Abbildung 14A), zeigen die differentiell exprimierte Gene (DEGs,  $FDR p \leq 0,05$ ) ein ähnliches Expressionsmuster (Abbildung 16C).

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 15:** Transkriptomanalyse von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Kolonsphäroiden.

Humane Epithelzellen (EC) aus Kolonsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten 4 h oder 8 h co-inkubiert (n = 3). (A) PCA sequenzierter EC nach 4 h oder 8 h Inkubation mit TY-Medium, A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten. Die PCA wurde mit der *CLC genomics Workbench 21* Software erstellt. (B) Übersicht über die Anzahl differenziell hoch- und herunterregulierter Gene (DEG, FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) nach Inkubation der EC mit A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten in Relation zur Kontrolle. (C) Venn Diagramm von DEG (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\geq 1,8$  und  $\leq -1,8$ ) zwischen mit Trophozoiten und TY-Medium inkubierten EC, die zwischen den Klonen und den Inkubationszeiten gemeinsam oder exklusiv exprimiert wurden. Die Grafik wurde mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>.

Insgesamt wurde nach Co-Inkubation der EC mit *E. histolytica* Trophozoiten eine höhere Anzahl Gene signifikant hoch- als herunterreguliert (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ), unabhängig vom eingesetzten Klon (Abbildung 15B, Tabelle 18, Tabelle A30-Tabelle A33). Bei mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten EC waren die meisten Gene nach 4 h signifikant reguliert, wohingegen bei einer Inkubation mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten die meisten Gene nach 8 h signifikant reguliert waren (Abbildung 15B, Tabelle 18, Tabelle A30-Tabelle A33). Dies betraf sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene. Ein Großteil der DEGs war Inkubationszeit- und Klon-spezifisch reguliert, wobei ausschließlich das Gen *ATPase family AAA domain containing (ATAD)2* in allen vier Vergleichen reguliert war (Abbildung 15C).

### 3 Ergebnisse

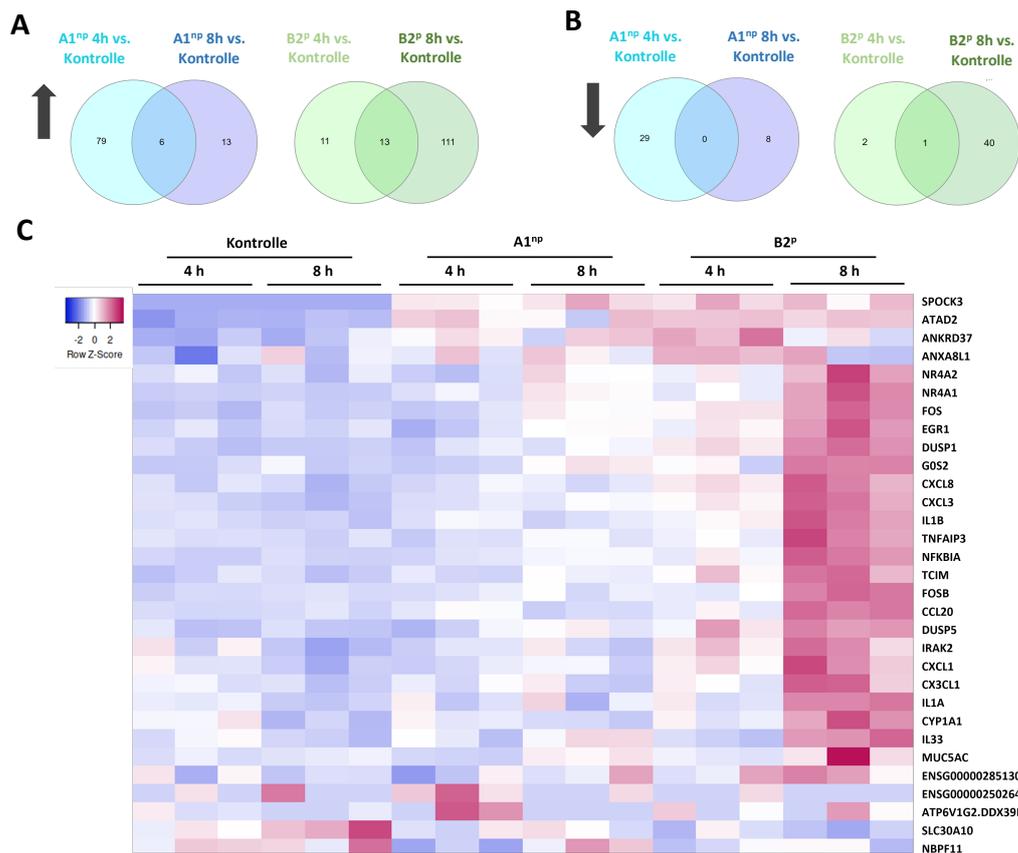
**Tabelle 18: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR  $p < 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) von mit A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h oder 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden (n = 3).**

	4 h Co-Inkubation			8 h Co-Inkubation		
	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt
<b>B2<sup>p</sup></b>	3	24	27	41	124	165
<b>A1<sup>np</sup></b>	29	85	114	8	19	27

DEGs = differentiell exprimierte Gene

Die Genexpressionsmuster der EC nach 4 h und 8 h Co-Inkubation unterscheiden sich voneinander und nur ein geringer Teil der DEG ist nach beiden Inkubationszeitpunkten reguliert, sowohl nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> als auch zu B2<sup>p</sup> Trophozoiten (Abbildung 16A und Abbildung 16B). Die meisten hochregulierten Gene mit einem hohen FC wurden in Proben detektiert, die 8 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubiert wurden (Abbildung 16C und Abbildung 18C, Tabelle A30-Tabelle A33). Generell wurden mehr Gene mit einer großen Amplitude des FC unter den hochregulierten Genen gefunden, verglichen mit herunterregulierten Genen (Abbildung 16C, Abbildung 17C, Abbildung 17D, Abbildung 18C und Abbildung 18D, Tabelle A30-Tabelle A33).

## 3 Ergebnisse



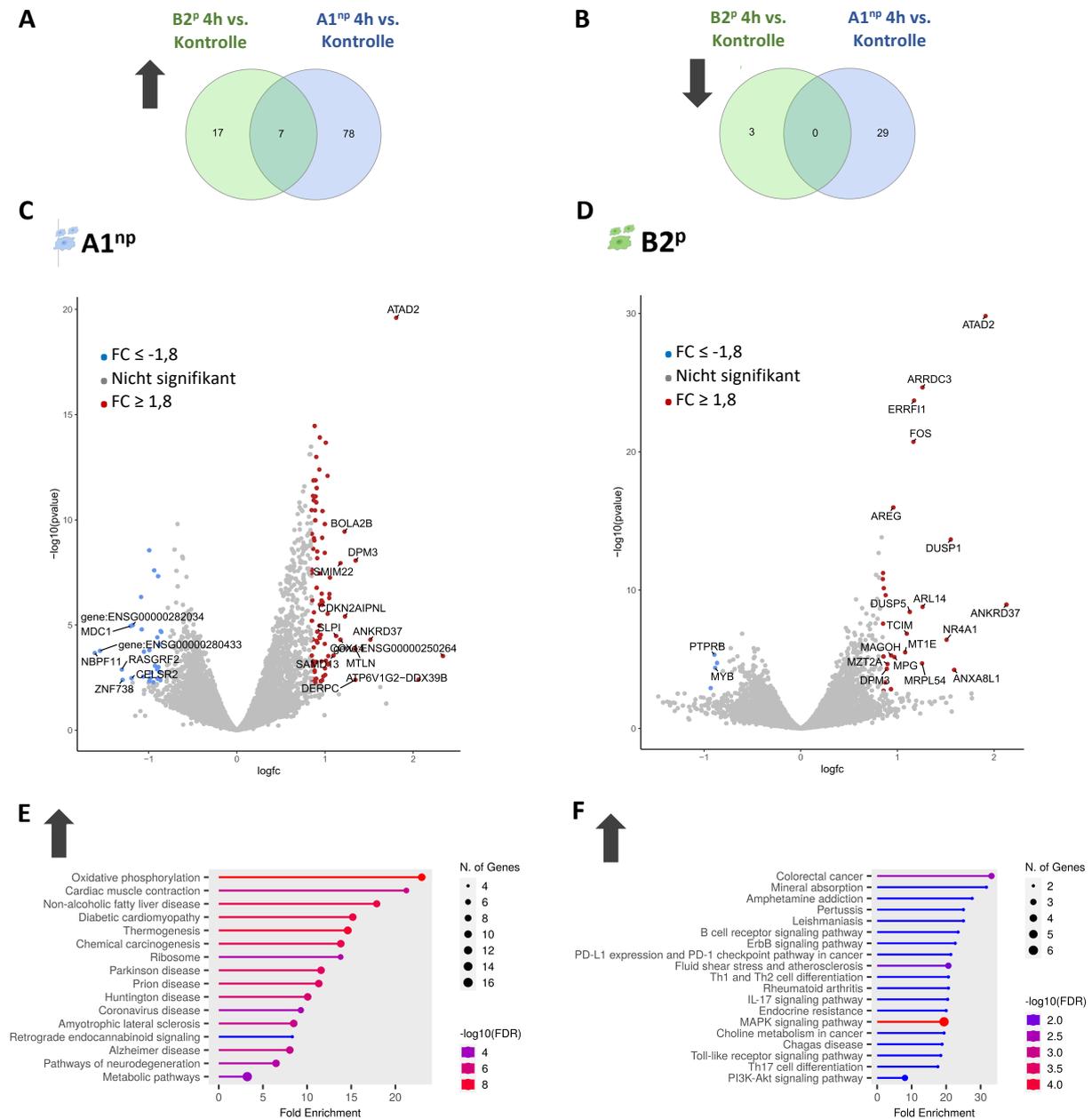
**Abbildung 16: Vergleich der nach 4 h und 8 h Inkubationszeit differenziell exprimierten Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Kolonsphäroiden.**

Humane Epithelzellen (EC) aus Kolonsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten 4 h oder 8 h co-inkubiert. Venn Diagramme differenziell hoch- (A) und herunterregulierter (B) Gene ( $FDR p \leq 0,05$ ,  $FC \leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten und TY-Medium inkubierten EC, die zwischen den Inkubationszeiten gemeinsam oder spezifisch exprimiert wurden. Die Grafik wurde mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C) *Heatmap* von DEG zwischen mit Trophozoiten und TY-Medium inkubierten EC mit einem  $FC \leq -3$  und  $\geq 3$  in mindestens einem der vier Vergleiche. Gezeigt sind die z-scores TPM-normalisierter Expressionswerte, mit hoher Expression dargestellt in pink und niedriger Expression dargestellt in blau. Die Grafik wurde mit *Heatmapper* erstellt<sup>1</sup>.

Im nächsten Schritt wurden DEG der EC nach Inkubation mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten mit DEG von EC inkubiert mit TY verglichen, um mögliche Klon-spezifische Unterschiede in der Reaktion der Zellen zu identifizieren. Die Anzahl spezifisch bei einem Vergleich und gemeinsam bei mehreren Vergleichen regulierter Gene ist in den Venn Diagrammen in Abbildung 17A, Abbildung 17B, Abbildung 18A und Abbildung 18B dargestellt. Der größte Teil der DEG ist spezifisch reguliert (Abb. 17A, Abbildung 17B, Abbildung 18A und Abbildung 18B). DEG mit einem *fold change* ( $FC$ )  $\leq -3$  und  $\geq 3$  in mindestens einem der vier Vergleiche sind in der *heatmap* in Abbildung 16C dargestellt. Die Replikate der einzelnen Bedingungen zeigen untereinander eine ähnliche Expression der gezeigten Gene (Abbildung 16C). Auffällig war dabei, dass *CXC motif chemokine ligand (CXCL)8*, *IL1B*, oder *IL1A*, die für pro-inflammatorische Chemo- und Zytokine kodieren, spezifisch nach 8 h bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten hochreguliert waren. Diese Gene befanden sich ebenso unter den am stärksten hochregulierten Genen in

## 3 Ergebnisse

EC über 8 h inkubiert mit B2<sup>P</sup> Trophozoiten nach direktem Vergleich von EC inkubiert mit A1<sup>NP</sup> Trophozoiten mit EC inkubiert mit B2<sup>P</sup> Trophozoiten (Daten nicht gezeigt).



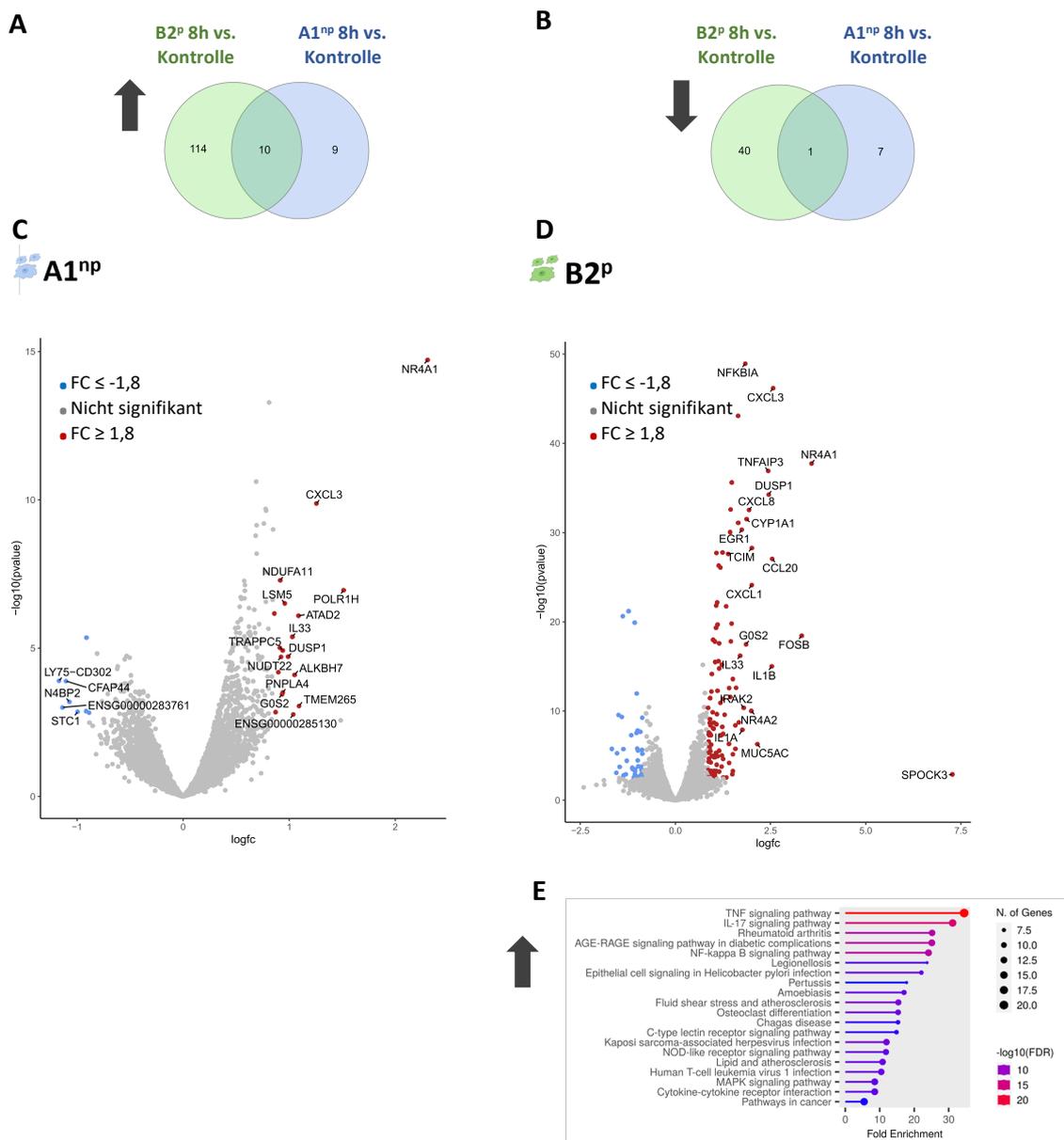
**Abbildung 17: Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 4 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden.**

Epithelzellkulturen aus humanen Kolonsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>NP</sup> oder B2<sup>P</sup> Trophozoiten für 4 h co-inkubiert (n = 3). DEG (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit Trophozoiten inkubierten EC und der zugehörigen Kontrolle wurden verglichen. (A, B) Venn Diagramme zwischen den Bedingungen gemeinsam oder exklusiv pro Bedingung signifikant hoch- (A) und herunterregulierter (B) Gene. Die Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C, D) *Volcano plots* zur Darstellung der relativen Genexpression mit log<sub>2</sub>FC als Indikator für das Ausmaß der Expressionsänderung und -log<sub>10</sub>(pvalue) als Messgröße der statistischen Signifikanz zwischen mit A1<sup>NP</sup> (C) oder B2<sup>P</sup> (D) Trophozoiten inkubierten EC und der jeweiligen Kontrolle. Signifikant hochregulierte Gene sind rot und signifikant herunterregulierte Gene sind blau dargestellt. Die zwanzig am stärksten regulierten Gene bestimmt durch die größte Änderung des FC wurden gekennzeichnet. *Volcano plots* wurden mithilfe des *Galaxy Europe Servers* erstellt<sup>4</sup>. (E, F) Analyse der KEGG-Stoffwechselwege signifikant hochregulierter Gene bei mit A1<sup>NP</sup> (E) oder B2<sup>P</sup> (F) Trophozoiten inkubierten EC im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ , dargestellt als -log<sub>10</sub>(FDR). Die Analyse der KEGG-Stoffwechselwege wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Um betroffene Signalwege und Stoffwechselprozesse zu identifizieren, wurden differentiell regulierte Gene einer Bedingung einer KEGG-Stoffwechselweg und GO *term enrichment*-Analyse unterzogen. Nach 4 h Inkubation der EC mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten waren viele der hochregulierten Gene in Prozessen der Zellatmung involviert, wie z.B. dem KEGG Stoffwechselweg *oxidative phosphorylation* (Abbildung 17E) oder dem GO *term aerobic electron transport chain* (Abbildung A36). Für hochregulierte Gene nach 8 h Inkubation mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten wurden keine signifikant betroffenen KEGG-Stoffwechselwege oder GO-*terms* gefunden. Nach 4 h Inkubation der Zellen mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten waren hochregulierte Gene an verschiedenen Signalwegen wie dem *mitogen-activated protein kinase* (MAPK-) Signalweg, dem IL-17-Signalweg, der *mineral absorption*, oder dem *toll-like receptor* (TLR)-Signalweg beteiligt, wobei der MAPK-Signalweg die höchste Signifikanz aufweist (FDR  $p \leq 0.001$ , Abbildung 17F). Nach 8 h Inkubation mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten waren neben dem TNF-Signalweg und dem IL-17-Signalweg weitere Signalwege wie der NF- $\kappa$ B-Signalweg, der *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor* Signalweg sowie der MAPK-Signalweg signifikant betroffen (Abbildung 18F). Für signifikant herunterregulierte Gene aller Vergleiche wurden keine signifikant betroffenen KEGG-Stoffwechselwege und GO-*terms* gefunden.

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 18: Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden.**

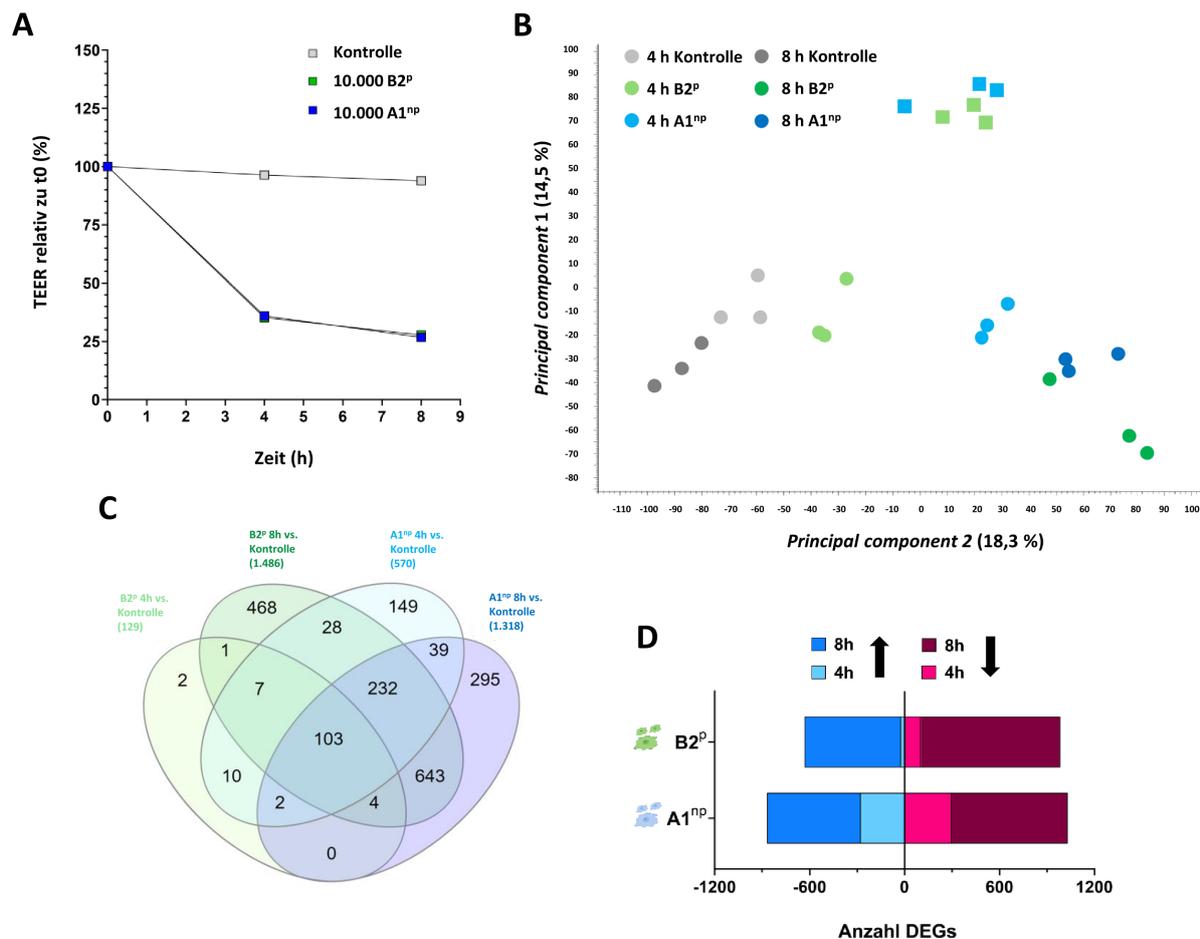
Epithelzellkulturen aus humanen Kolonsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 8 h co-inkubiert (n = 3). DEG (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit Trophozoiten inkubierten EC und der zugehörigen Kontrolle wurden verglichen. (A, B) Venn Diagramme zwischen den Bedingungen gemeinsam oder exklusiv pro Bedingung signifikant hoch- (A) und herunterregulierter (B) Gene. Die Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C, D) *Volcano plots* zur Darstellung der relativen Genexpression mit logfc als Indikator für das Ausmaß der Expressionsänderung und  $-\log_{10}(pvalue)$  als Messgröße der statistischen Signifikanz zwischen mit A1<sup>np</sup> (C) oder B2<sup>p</sup> (D) Trophozoiten inkubierten EC und der jeweiligen Kontrolle. Signifikant hochregulierte Gene sind rot und signifikant herunterregulierte Gene sind blau dargestellt. Die zwanzig am stärksten regulierten Gene bestimmt durch die größte Änderung des FC wurden gekennzeichnet. *Volcano plots* wurden mithilfe des *Galaxy Europe Servers* erstellt<sup>4</sup>. (E) Analyse der KEGG-Stoffwechselwege signifikant hochregulierter Gene bei mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten EC im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ , dargestellt als  $-\log_{10}(FDR)$ . Die Analyse der KEGG-Stoffwechselwege wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### **3.5.2 Das Transkriptom humaner Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten**

Um den Effekt der beiden *E. histolytica* Klone auf das Transkriptom humaner EC aus Dünndarmsphäroiden zu untersuchen, wurden die Zellen 4 h oder 8 h mit TY-Medium (Kontrolle), 10.000 A1<sup>np</sup> oder 10.000 B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten co-inkubiert. Vor Beginn des Experiments und nach 4 h und 8 h Co-Inkubation wurde der TEER gemessen, um den Einfluss der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der Zellen zu untersuchen. Beide Klone beeinträchtigten die Integrität der Epithelschicht in ähnlicher Weise und führten zu einem Absinken des relativen TEER auf 36 % nach 4 h bis auf 27 % nach 8 h (Abbildung 19A). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen B2<sup>p</sup> und A1<sup>np</sup> Trophozoiten festgestellt werden (Abbildung 19A).

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 19: Transkriptomanalyse von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Dünndarmsphäroiden.**

Humane Epithelzellen (EC) aus Dünndarmsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>NP</sup> oder B2<sup>P</sup> Trophozoiten 4 h oder 8 h co-inkubiert ( $n = 3-6$ ). (A) Verlauf des TEER der Epithelzellschichten nach Co-Inkubation mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>NP</sup> oder B2<sup>P</sup> Trophozoiten relativ zum TEER des Startzeitpunkts  $t_0$ . Signifikanzlevel wurden mit dem  $t$ -Test für unabhängige Stichproben bestimmt ( $* p < 0,05$ ,  $** p < 0,01$ ). (B) PCA sequenzierter EC nach 4 h oder 8 h Inkubation mit TY-Medium, A1<sup>NP</sup> oder B2<sup>P</sup> Trophozoiten. Unterschiedliche Tage der Probenahme sind durch verschiedene Formen der Datenpunkte dargestellt. Die PCA wurde mit der *CLC genomics Workbench 21* Software erstellt. (C) Venn Diagramm DEG (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit Trophozoiten und TY-Medium inkubierten EC, die zwischen den Klonen und den Inkubationszeiten gemeinsam oder exklusiv exprimiert wurden. Die Grafik wurde mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (D) Übersicht über die Anzahl differenziell hoch- und herunterregulierter Gene nach Inkubation der Zellen mit A1<sup>NP</sup> oder B2<sup>P</sup> Trophozoiten.

Die PCA zeigte einen Unterschied in den Transkriptomen zwischen mit Trophozoiten und mit TY-Medium inkubierten EC auf (Abbildung 19B). Die Inkubationszeit hatte einen Einfluss auf das Transkriptom der Zellen, wobei dieser Unterschied bei mit B2<sup>P</sup> Trophozoiten inkubierten Zellen am größten war (Abbildung 19B). Der Tag der Probenahme hatte ebenso einen Einfluss auf das Genexpressionsmuster der Zellen (Abbildung 19B). Jeweils drei der sechs über 4 h mit Trophozoiten inkubierten Replikate waren abhängig vom Tag der Probenahme auf PCA1 voneinander separiert (Abbildung 19B). Dieses Muster spiegelte sich nur teilweise in der *heatmap* der am stärksten regulierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -20$  und  $\geq 20$ ) wieder (Abbildung 18C).

### 3 Ergebnisse

Bei beiden Klonen waren die meisten Gene nach 8 h signifikant reguliert (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ , Abbildung 19C und Abbildung 19D, Tabelle 19). Wurden die EC mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubiert, waren nach 4 h und nach 8 h Co-Inkubation deutlich mehr Gene hoch- als herunterreguliert (Abbildung 19D, Tabelle 19). Die Anzahl hoch- und herunterregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten EC hingegen lag nach 4 h und 8 h Inkubation auf einem ähnlichen Level (Abbildung 19D, Tabelle 19). 103 DEG waren in allen vier Gruppen gemeinsam reguliert (Abbildung 19C), wobei für diese DEGs keine signifikant betroffenen GO-terms oder KEGG-Stoffwechselwege gefunden wurden.

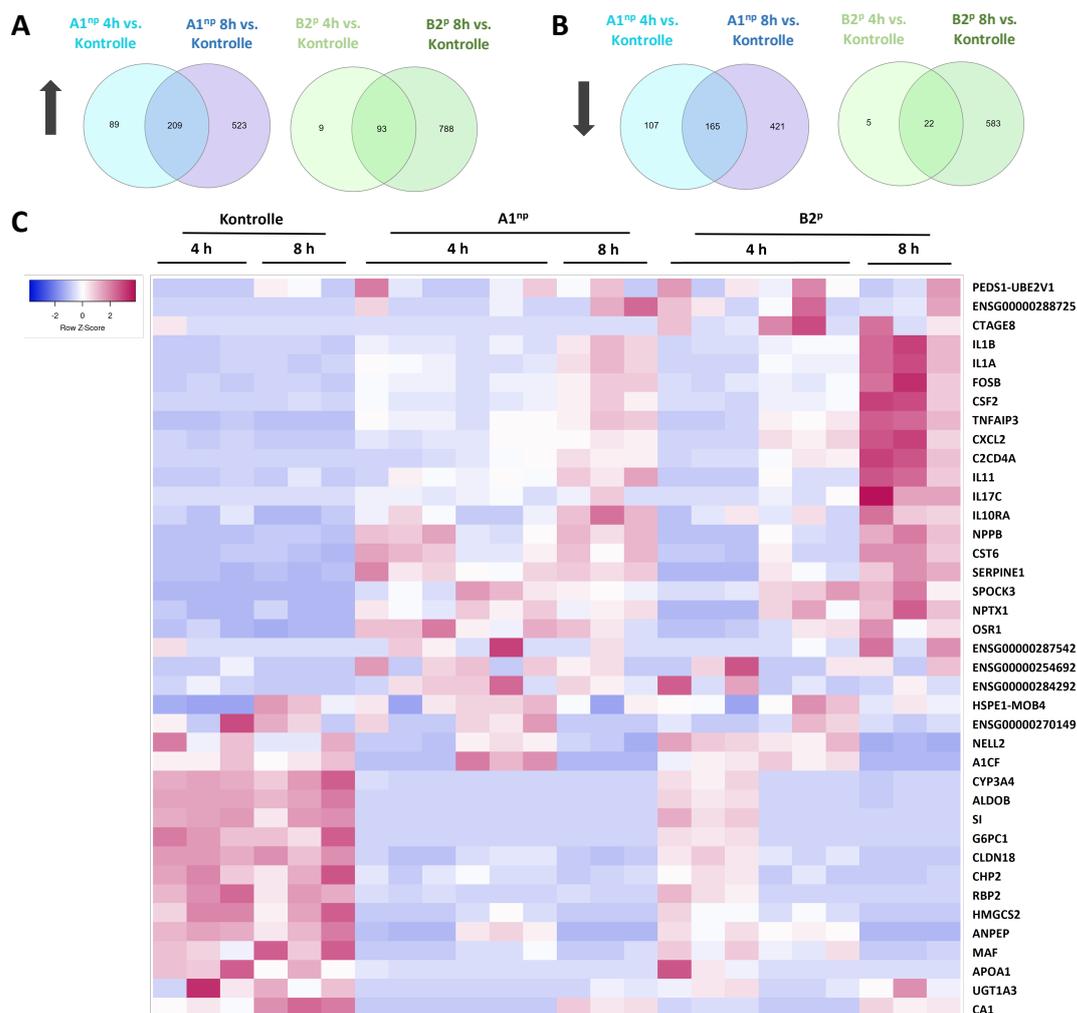
**Tabelle 19: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR  $p < 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und FC  $\geq 1,8$ ) bei mit A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h oder 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden (n = 3-6).**

	4 h Co-Inkubation			8 h Co-Inkubation		
	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt
<b>B2<sup>p</sup></b>	27	102	129	605	881	1.486
<b>A1<sup>np</sup></b>	272	298	570	586	732	1.318

DEGs = differentiell exprimierte Gene

Die am stärksten regulierten Gene mit einem FC  $\leq -20$  und  $\geq 20$  in mindestens einem der Vergleiche sind in der *heatmap* in Abbildung 20C dargestellt. Je drei der sechs Replikate, die 4 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubiert wurden, zeigen Unterschiede in der Stärke der Expression mehrerer gezeigter Gene, abhängig vom Tag der Probennahme, wobei die „Richtung“ der Regulation (hoch- oder herunterreguliert) übereinstimmt (Abbildung 20C). Die meisten hochregulierten Gene mit einem hohen FC wurden in Proben detektiert, die 8 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubiert wurden (Abbildung 20C und Abbildung 22D, Tabelle A34-Tabelle A37). Unter den hochregulierten Genen wurden mehr Gene mit einer großen Amplitude des FC gefunden, verglichen mit herunterregulierten Genen (Abbildung 20C, Abbildung 21D, Abbildung 22C und Abbildung 22D, Tabelle A34-Tabelle A37).

## 3 Ergebnisse

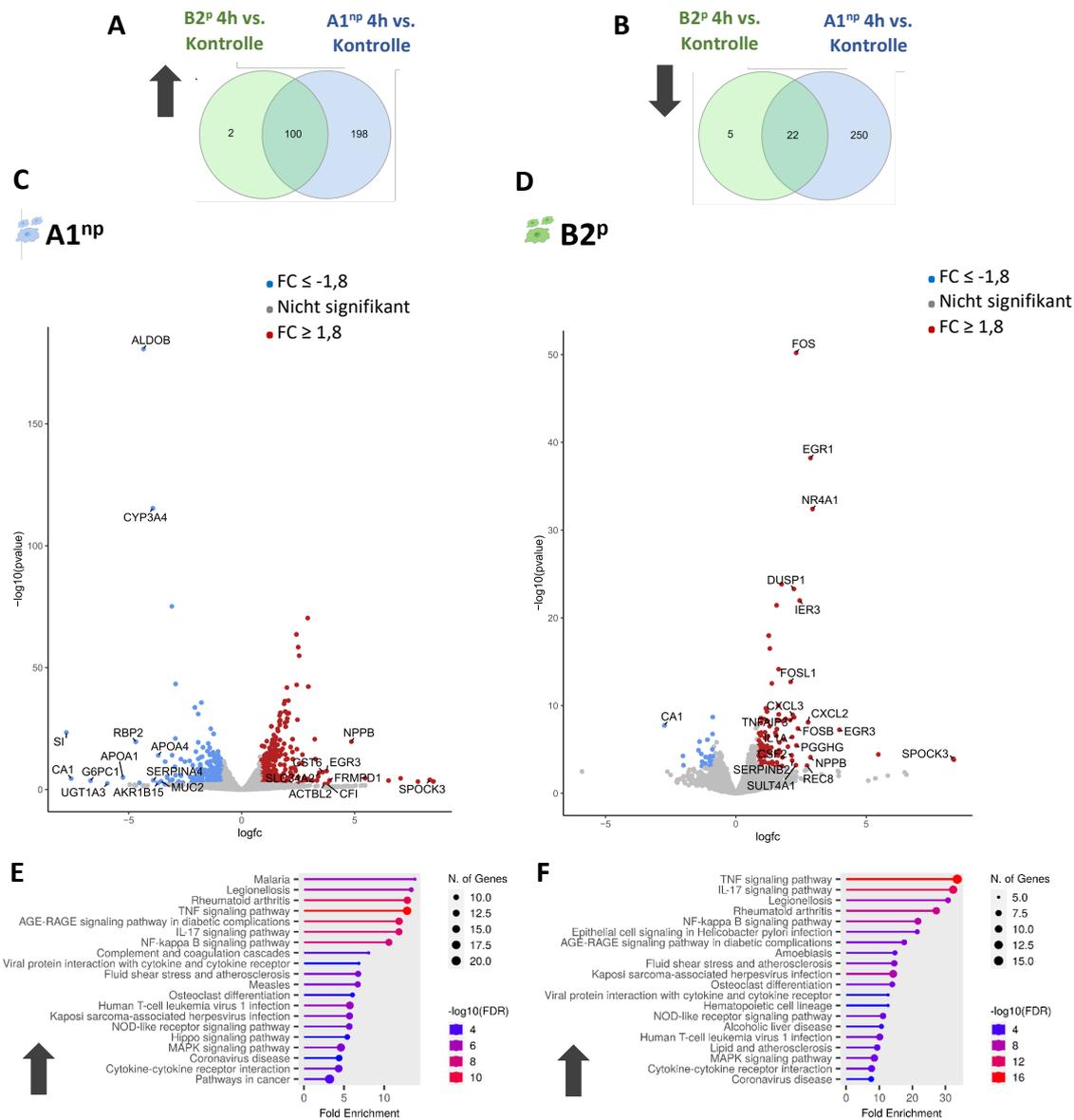


**Abbildung 20: Vergleich der nach 4 h und 8 h Inkubationszeit differenziell exprimierten Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten inkubierten Epithelzellen aus humanen Dünndarmsphäroiden.**

Humane Epithelzellen (EC) aus Dünndarmsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten 4 h oder 8 h co-inkubiert. Venn Diagramme differenziell hoch- (A) und herunterregulierter (B) Gene (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten und TY-Medium inkubierten EC, die zwischen den Inkubationszeiten gemeinsam oder spezifisch exprimiert wurden. Die Grafik wurde mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C) *Heatmap* von DEG zwischen mit Trophozoiten und TY-Medium inkubierten EC mit einem FC  $\leq -20$  und  $\geq 20$  in mindestens einem der vier Vergleiche. Gezeigt sind die z-scores TPM-normalisierter Expressionswerte, mit hoher Expression dargestellt in pink und niedriger Expression dargestellt in blau. Die Grafik wurde mit *Heatmapper* erstellt<sup>1</sup>.

Der Vergleich Klon-spezifischer DEG nach Inkubation mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten zeigte, dass nach 4 h der größte Teil der DEG bei A1<sup>np</sup> spezifisch exprimiert war (Abbildung 21A und Abbildung 21B). Die meisten nach Inkubation mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten regulierten Gene waren auch nach Inkubation mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten reguliert, wobei in dieser Kondition im Vergleich zu den anderen Konditionen eine geringere Anzahl Gene reguliert war (Abbildung 21A und Abbildung 21B). Nach 8 h Co-Inkubation war der Großteil der DEG nicht Klon-spezifisch reguliert (Abbildung 22A und Abbildung 22B).

## 3 Ergebnisse



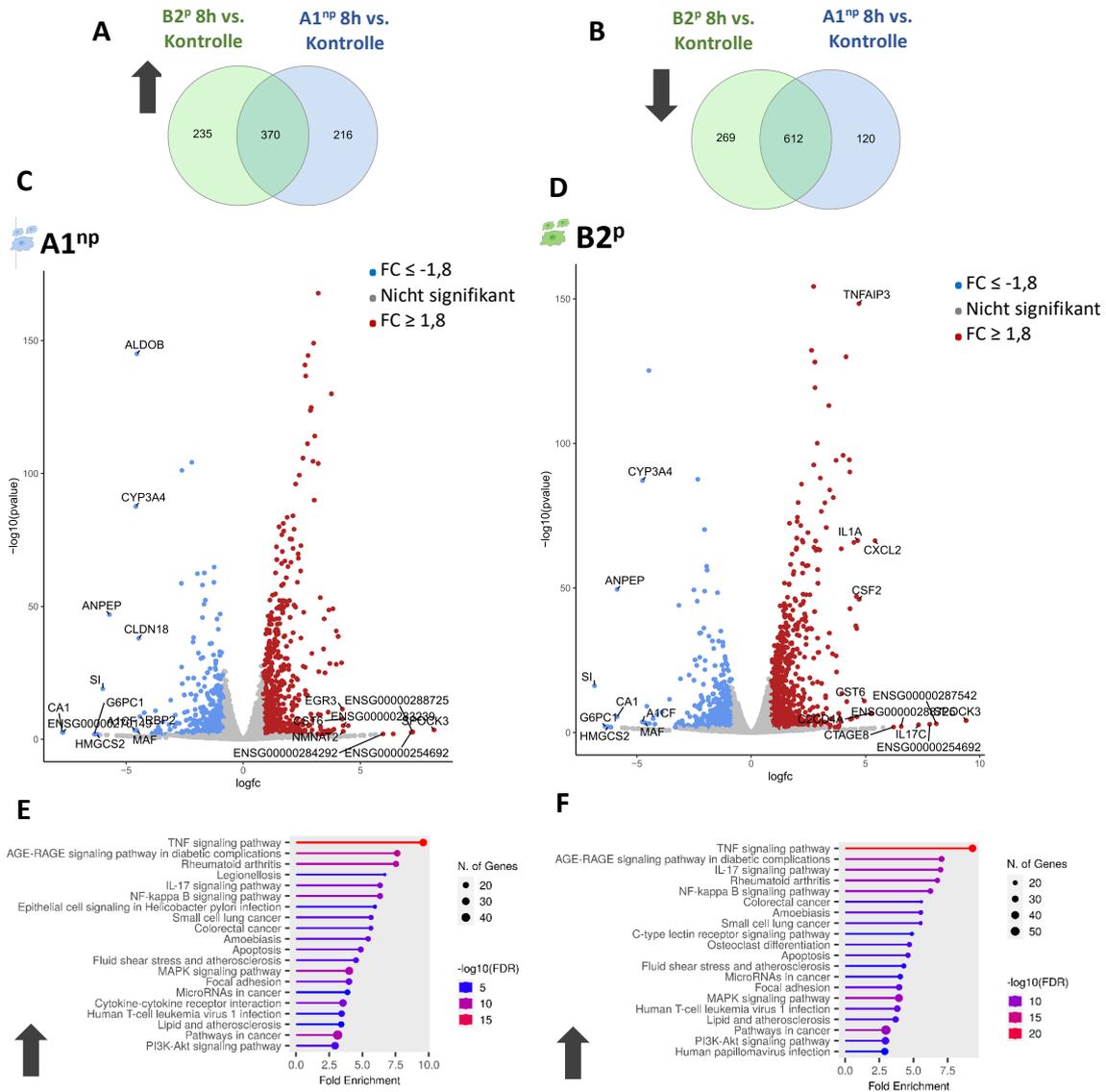
**Abbildung 21: Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 4 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden.**

Epithelzellkulturen aus humanen Dünndarmsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 4 h co-inkubiert ( $n = 3-6$ ). DEG (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit Trophozoiten inkubierten Epithelzellen (EC) und der zugehörigen Kontrolle wurden verglichen. (A, B) Venn Diagramme zwischen den Bedingungen gemeinsam oder exklusiv pro Bedingung signifikant hoch- (A) und herunterregulierter (B) Gene. Die Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C, D) *Volcano plots* zur Darstellung der relativen Genexpression mit logfc als Indikator für das Ausmaß der Expressionsänderung und  $-\log_{10}(pvalue)$  als Messgröße der statistischen Signifikanz zwischen mit A1<sup>np</sup> (C) oder B2<sup>p</sup> (D) Trophozoiten inkubierten EC und der jeweiligen Kontrolle. Signifikant hochregulierte Gene sind rot und signifikant herunterregulierte Gene sind blau dargestellt. Die zwanzig am stärksten regulierten Gene bestimmt durch die größte Änderung des FC wurden gekennzeichnet. *Volcano plots* wurden mit dem *Galaxy Europe Server* erstellt<sup>4</sup>. (E, F) Analyse der KEGG-Stoffwechselwege signifikant hochregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> (E) oder B2<sup>p</sup> (F) Trophozoiten inkubierten EC im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ , dargestellt als  $-\log_{10}(FDR)$ . Die Analyse der KEGG-Stoffwechselwege wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Die Analyse Klon-spezifischer Stoffwechselprozesse und Signalwege ergab, dass bei allen vier Vergleichen herunterregulierte Gene vor allem in metabolischen Prozessen wie *drug metabolism* und *metabolism of xenobiotics by cytochrome P450* involviert waren (Abbildung A34). Bei mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten über 4 h inkubierten EC konnte eine vergleichsweise kleine Anzahl an KEGG-Stoffwechselprozessen, in die signifikant herunterregulierte Gene involviert waren, gefunden werden. Bei den weiteren Vergleichen waren ähnliche KEGG-Stoffwechselprozesse betroffen (z.B. *fat digestion and absorption* und *glycolyse/gluconeogenesis*), wobei KEGG-Prozesse wie *tyrosine metabolism* und *glycine, serine and threonine metabolism* erst nach 8 h Co-Inkubation signifikant angereichert waren (Abbildung A34). Hochregulierte Gene waren bei allen Bedingungen in immunregulatorische Signalwege wie dem TNF-Signalweg, dem IL-17-Signalweg oder dem NF- $\kappa$ -B-Signalweg involviert (Abbildung 21E, Abbildung 21F, Abbildung 22E und Abbildung 22F). Der NOD-like-Signalweg war spezifisch nach 4 h Co-Inkubation und Apoptose sowie *focal adhesion* nach 8 h Co-Inkubation, unabhängig vom *E. histolytica* Klon, betroffen (Abbildung 21E, Abbildung 21F, Abbildung 22E und Abbildung 22F). Spezifisch für über 8 h Co-Inkubation mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten waren hochregulierte Gene in den *C-type lectin receptor*-Signalweg und spezifisch für über 4 h Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten in den *Hippo*-Signalweg kategorisiert (Abbildung 22F und Abbildung 21E).

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 22: Analyse differenziell exprimierter Gene von mit *E. histolytica* Trophozoiten für 8 h inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden.**

Epithelzellkulturen aus humanen Dünndarmsphäroiden wurden mit TY-Medium (Kontrolle), A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten für 8 h co-inkubiert ( $n = 3-6$ ). DEG ( $FDR p \leq 0,05$ ,  $FC \leq -1,8$  und  $\geq 1,8$ ) zwischen mit Trophozoiten inkubierten Epithelzellen (EC) und der Kontrolle wurden verglichen. (A, B) Venn Diagramme zwischen den Bedingungen gemeinsam oder exklusiv pro Bedingung signifikant hoch- (A) und herunterregulierter (B) Gene. Die Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C, D) *Volcano plots* zur Darstellung der relativen Genexpression mit logfc als Indikator für das Ausmaß der Expressionsänderung und  $-\log_{10}(pvalue)$  als Messgröße der statistischen Signifikanz zwischen mit A1<sup>np</sup> (C) oder B2<sup>p</sup> (D) Trophozoiten inkubierten EC und der jeweiligen Kontrolle. Signifikant hochregulierte Gene sind rot und signifikant herunterregulierte Gene sind blau dargestellt. Die zwanzig am stärksten regulierten Gene bestimmt durch die größte Änderung des FC wurden gekennzeichnet. *Volcano plots* wurden mit *Galaxy Europe Server* erstellt<sup>4</sup>. (E, F) Die Analyse der KEGG-Stoffwechselwege signifikant hochregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> (E) oder B2<sup>p</sup> (F) Trophozoiten inkubierten EC im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ , dargestellt als  $-\log_{10}(FDR)$ . Die Analyse der KEGG-Stoffwechselwege wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.

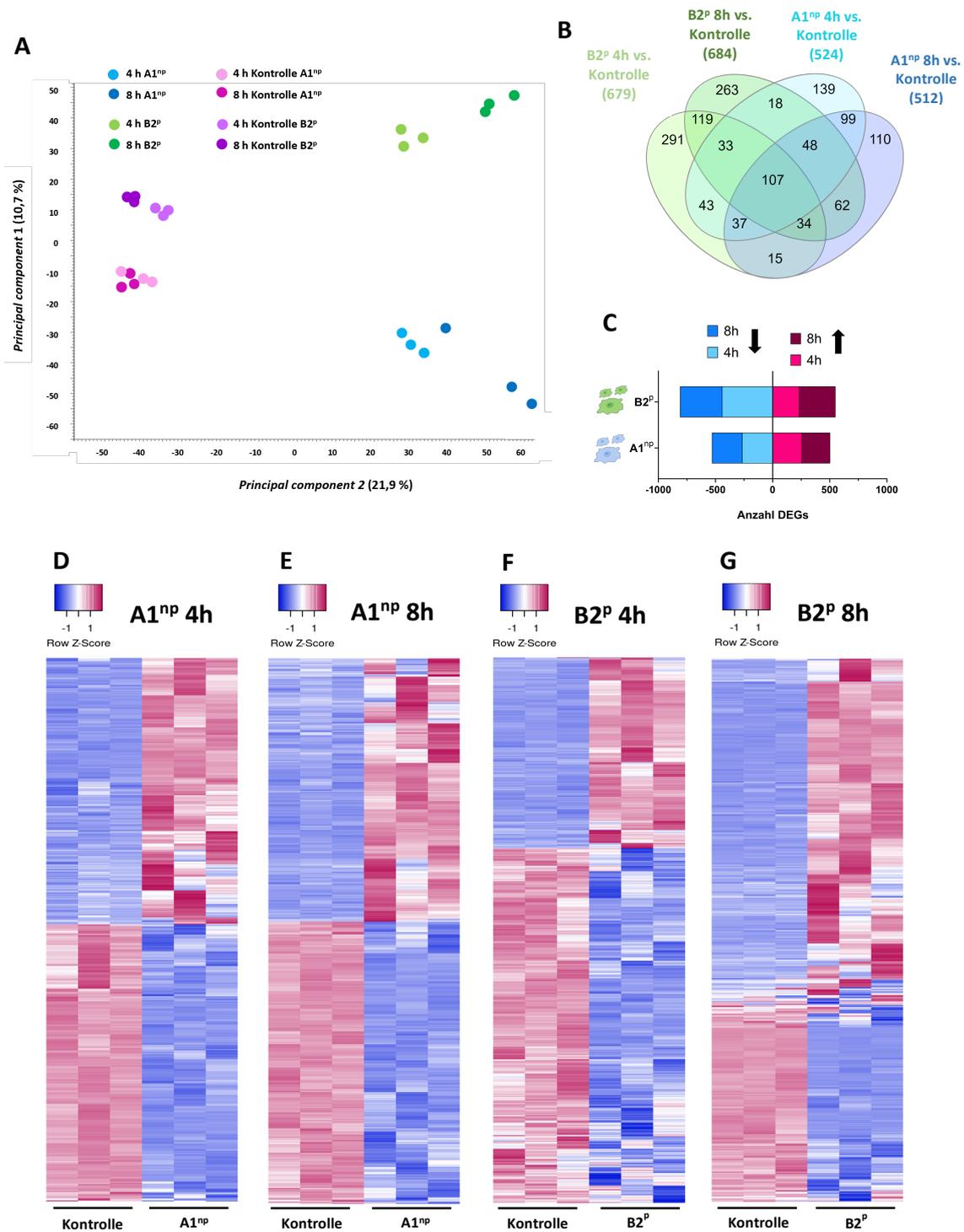
### 3 Ergebnisse

#### **3.5.3 Das Transkriptom von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden**

Die PCA zeigt klare Unterschiede im Transkriptom zwischen mit EC inkubierten Trophozoiten und den Kontrollen auf, wobei Klon-spezifische Unterschiede sowohl in den Kontrollproben als auch in den mit EC inkubierten Proben erkennbar waren (Abbildung 23A). Das Genexpressionsmuster von mit EC inkubierten Trophozoiten ist abhängig von der Inkubationszeit (Abbildung 23A). Bis auf ein Replikat der über 8 h mit den EC inkubierten A1<sup>np</sup> Proben clustern alle Replikate miteinander, erkennbar auch anhand der Expressionswerte in den zugehörigen *heatmaps* (Abbildung 23A und Abbildung 23D-G).

Bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten wurden mehr Gene signifikant reguliert im Vergleich zu A1<sup>np</sup> Trophozoiten, wobei sich die Gesamtzahl der DEG bei beiden Klonen über die Zeit nur wenig änderte (Tabelle 20). Das Verhältnis von hoch- zu herunterregulierten Genen änderte sich bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten über die Zeit kaum (Tabelle 20). Im Gegensatz dazu stieg bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten die Anzahl hochregulierter Gene bei gleichzeitiger Abnahme der Anzahl herunterregulierter Gene mit der Inkubationszeit (Tabelle 20). Zwischen 40 % und 43 % der DEG kodierten für hypothetische Proteine.

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 23: Analyse des Transkriptom von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit Epithelzellen aus humanen Kolonsphäroiden.**

*E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten wurden mit Epithelzellen (EC) aus Kolonsphäroiden über 4 h oder 8 h co-inkubiert (n = 3). Als Kontrolle dienten A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten, die ohne EC inkubiert wurden. (A) PCA sequenzierter A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h oder 8 h Inkubation mit und ohne EC. Die PCA wurde mit der *CLC genomics Workbench 21* Software erstellt. (B) Venn Diagramm differenziell exprimierter Gene (DEG) zwischen mit und ohne EC inkubierten A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten, die zwischen den Klonen und den Inkubationszeiten gemeinsam oder exklusiv exprimiert wurden. Die Grafik wurde mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C) Übersicht über die Anzahl differenziell hoch- und runterregulierter Gene (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -2$  und  $\geq 2$ ) nach Inkubation der Trophozoiten mit den EC verglichen mit der Kontrolle. (D-G) *Heatmaps* von DEG zwischen über 4 h (D, F) und 8 h (E, G) mit und ohne EC inkubierten A1<sup>np</sup> (D, E) und B2<sup>p</sup> (F, G) Trophozoiten. Gezeigt sind die *z-scores transcripts per million* (TPM)-normalisierter Expressionswerte, mit hoher Expression dargestellt in pink und niedriger Expression dargestellt in blau. Die Grafik wurde mit *Heatmapper* erstellt<sup>1</sup>.

### 3 Ergebnisse

Der größte Teil der DEG war Inkubationszeit- und Klon-spezifisch reguliert, wobei 107 DEG in allen vier Vergleichen gemeinsam reguliert waren (Abbildung 23B). Die Genprodukte dieser 107 gemeinsam regulierten DEG zeigen laut Panther *functional classification* Analyse katalytische, strukturmolekulare, molekulare Adapter-, Bindungs- sowie regulatorische Transkriptions- und Translationsaktivität, wobei ein Großteil der DEG nicht klassifiziert werden konnte (Abbildung A36).

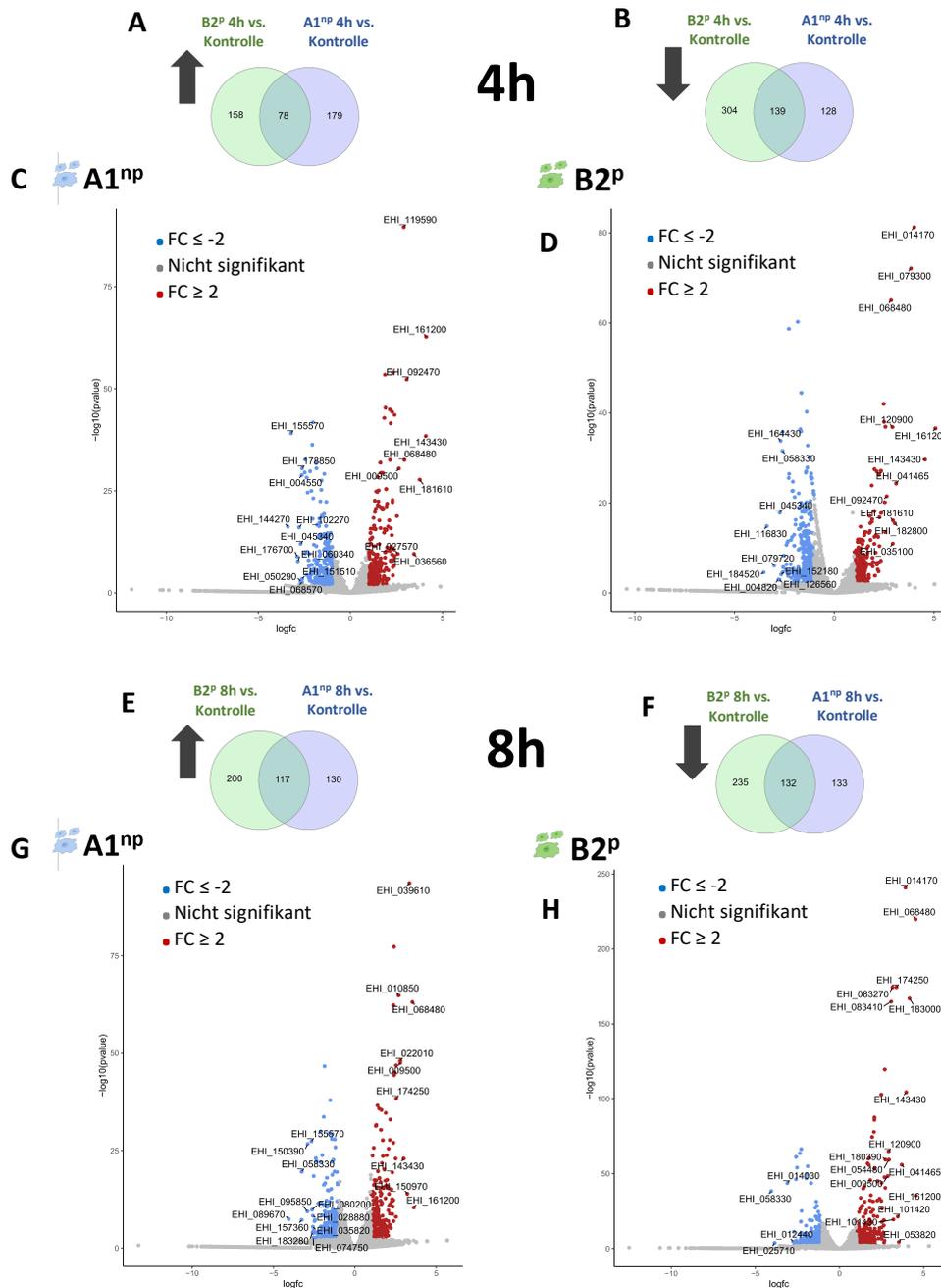
**Tabelle 20: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR  $p < 0,05$ , FC  $\leq -2$  und  $\geq 2$ ) bei A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h oder 8 h Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden.**

	4 h Co-Inkubation			8 h Co-Inkubation		
	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt
<b>B2<sup>p</sup></b>	443	236	679	367	317	684
<b>A1<sup>np</sup></b>	267	257	524	265	247	512

DEGs = differentiell exprimierte Gene

Die Gene *ehi\_068480*, *ehi\_143430* und *ehi\_161200* waren in allen vier Vergleichen hochreguliert, wobei *ehi\_161200*, das für Aktin 2 kodiert, den höchsten FC in allen Vergleichen hatte (Abbildung 24C, Abbildung 24D, Abbildung 24G und Abbildung 24H, Tabelle A38-Tabelle A41). Bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten waren zwei verschiedene Gene, die für je ein *AIG1 family Protein* kodieren, am stärksten herunterreguliert (Abbildung 24C, Abbildung 24G, Tabelle A38 und Tabelle A39). Bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten hingegen war nach 4 h ein für ein hypothetisches Protein kodierendes Gen (*ehi\_184520*) und nach 8 h das Gen *ehi\_058330*, das für ein *galactose-inhibitable lectin (putative)* kodiert, am stärksten herunterreguliert (Abbildung 24D, Abbildung 24H, Tabelle A40 und Tabelle A41).

## 3 Ergebnisse

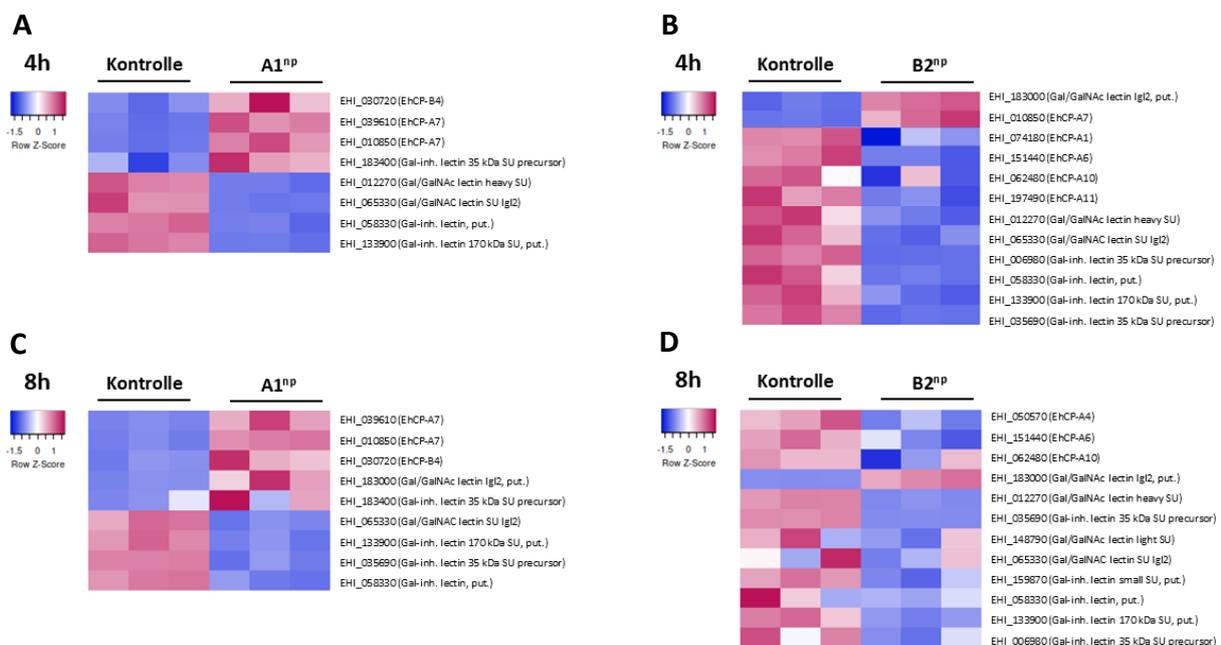


**Abbildung 24: Analyse differenziell exprimierter Gene von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden.**

*E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten wurden mit Epithelzellen (EC) aus Kolonsphäroiden über 4 h oder 8 h co-inkubiert ( $n = 3$ ). Als Kontrolle dienten A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten, die ohne EC inkubiert wurden. (A, B, E, F) Venn Diagramme differenziell hoch- (A, E) und herunterregulierter Gene ( $FDR p \leq 0,05$ ,  $FC \leq -2$  und  $\geq 2$ ) zwischen mit und ohne EC für 4 h (A, B) und 8 h (E, F) inkubierten A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten, die zwischen den Klonen gemeinsam oder exklusiv exprimiert wurden. Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C, D, G, H) *Volcano plots* zur Darstellung der relativen Genexpression mit  $\log_2 FC$  als Indikator für das Ausmaß der Expressionsänderung und  $-\log_{10}(pvalue)$  als Messgröße der statistischen Signifikanz zwischen mit und ohne EC für 4 h (C, D) oder 8 h (G, H) inkubierten A1<sup>np</sup> (C, G) oder B2<sup>p</sup> (D, H) Trophozoiten. Signifikant hochregulierte Gene sind rot und signifikant herunterregulierte Gene sind blau dargestellt. Die zwanzig DEG mit den stärksten Änderungen des FC wurden gekennzeichnet. *Volcano plots* wurden mit *Galaxy Europe Server* erstellt<sup>4</sup>.

### 3 Ergebnisse

DEG, die für Pathogenitätsfaktoren wie Cysteinpeptidasen (CP) und Lektine kodieren, sind in Abbildung 25 dargestellt. Bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten wurden weniger Gene, die für oben genannte Pathogenitätsfaktoren kodieren, hochreguliert, im Vergleich zu A1<sup>NP</sup> Trophozoiten (Abbildung 25). Bei den herunterregulierten Genen war ein entgegengesetztes Expressionsmuster erkennbar, insbesondere bei den CP-Genen. Bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten war kein CP-Gen herunterreguliert (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Signifikant regulierte Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, bei mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten *E. histolytica* Trophozoiten.**

(A-D) *Heatmaps* von differenziell exprimierten Genen (FDR  $p < 0,05$ , FC  $\leq -2$  und  $\geq 2$ ), die für Cysteinpeptidasen und Lektine kodieren, zwischen über 4 h (A, B) und 8 h (C, D) mit und ohne Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten A1<sup>NP</sup> (A, C) und B2<sup>P</sup> (B, D) Trophozoiten. Gezeigt sind die *z-scores transcripts per million* (TPM)-normalisierter Expressionswerte, mit hoher Expression dargestellt in pink und niedriger Expression dargestellt in blau. Die Grafik wurde mit *Heatmapper* erstellt<sup>1</sup>.

Um einen Überblick über die Beteiligung der DEG an bestimmten Stoffwechselprozessen der Trophozoiten nach Kontakt zu den intestinalen EC aus Kolonsphäroiden zu bekommen und mögliche Unterschiede zwischen A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten zu identifizieren, wurde eine *GO enrichment*-Analyse durchgeführt. Bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten sind hochregulierte Gene in biologischen Prozessen des Proteinstoffwechsels, unter anderem der Translation, involviert (Tabelle 21 und Tabelle 22). Im Gegensatz dazu waren hochregulierte Gene bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation in erster Linie an Prozessen des Lipidmetabolismus, unter anderem die Biosynthese der Zellmembran betreffend, sowie am Transport von Ionen beteiligt (Tabelle 21). Nach 8 h Co-Inkubation waren vor allem Prozesse assoziiert mit oxidativem Stress (Redoxhomöostase, Eisen-Schwefel-Metabolismus, Biosynthese von Cystein und Riboflavin) in B2<sup>P</sup> Trophozoiten durch hochregulierte Gene betroffen (Tabelle 22).

## 3 Ergebnisse

Tabelle 21: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) hochregulierter Gene ( $FC \geq 2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach *p*-Wert.

↑	GO-term	FE	p-Wert	↑	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 4 h	<i>cellular lipid metabolic process</i>	3,03	0,0027	A1 <sup>np</sup> 4 h	<i>cellular nitrogen compound biosynthetic process</i>	2,61	1,47E-07
	<i>sodium ion transport</i>	17,67	0,0046		<i>translation</i>	3,02	2,45E-07
	<i>glycerolipid metabolic process</i>	3,93	0,0083		<i>amide biosynthetic process</i>	3,01	2,63E-07
	<i>cation transport</i>	3,68	0,0109		<i>peptide biosynthetic process</i>	3,01	2,63E-07
	<i>lipid biosynthetic process</i>	3,12	0,0119		<i>peptide metabolic process</i>	2,92	4,63E-07
	<i>phospholipid metabolic process</i>	3,12	0,0119		<i>cellular amide metabolic process</i>	2,89	5,68E-07
	<i>phospholipid biosynthetic process</i>	3,53	0,0151		<i>cellular biosynthetic process</i>	2,18	1,51E-06
	<i>ion transport</i>	3,4	0,0151		<i>cellular macromolecule biosynthetic process</i>	2,36	2,51E-06
	<i>lipid metabolic process</i>	2,19	0,0152		<i>macromolecule biosynthetic process</i>	2,34	2,77E-06
	<i>glycerolipid biosynthetic process</i>	3,93	0,0179		<i>biosynthetic process</i>	2,09	3,01E-06

FE = fold enrichment

Tabelle 22: Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) hochregulierter Gene ( $FC \geq 2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach *p*-Wert.

↑	GO-term	FE	p-Wert	↑	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 8 h	<i>cell redox homeostasis</i>	4,9	4,25E-04	A1 <sup>np</sup> 8 h	<i>translation</i>	2,36	1,74E-04
	<i>sulfur compound metabolic process</i>	7	5,10E-04		<i>amide biosynthetic process</i>	2,35	1,83E-04
	<i>cellular homeostasis</i>	4,38	8,65E-04		<i>peptide biosynthetic process</i>	2,35	1,83E-04
	<i>homeostatic process</i>	4,16	0,0012		<i>peptide metabolic process</i>	2,28	2,72E-04
	<i>obsolete ubiquitin cycle</i>	4,61	0,0016		<i>cellular amide metabolic process</i>	2,26	3,14E-04
	<i>protein maturation by iron-sulfur cluster transfer</i>	23,8	0,0018		<i>organonitrogen compound biosynthetic process</i>	2,05	3,82E-04
	<i>sulfur compound biosynthetic process</i>	7,93	0,0051		<i>cellular nitrogen compound biosynthetic process</i>	1,99	4,40E-04
	<i>cysteine biosynthetic process</i>	15,86	0,0051		<i>cellular biosynthetic process</i>	1,78	6,95E-04
	<i>cysteine biosynthetic process from serine</i>	15,86	0,0051		<i>organic substance biosynthetic process</i>	1,74	9,74E-04
	<i>iron-sulfur cluster assembly</i>	15,86	0,0051		<i>biosynthetic process</i>	1,71	1,08E-04

FE = fold enrichment

Herunterregulierte Gene waren bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h vor allem in Prozesse des Proteinmetabolismus und nach 8 h in Prozessen der Biogenese von Ribosomen sowie des Metabolismus von

## 3 Ergebnisse

*non-coding (nc)RNAs* und organischen Säuren wie Oxo- und Carbonsäuren involviert (Tabelle 23 und Tabelle 24). Die signifikanten GO-terms herunterregulierter Gene bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten ähnelten denen der über 8 h co-inkubierten B2<sup>p</sup> Trophozoiten (Tabelle 23 und Tabelle 24).

**Tabelle 23:** Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) herunterregulierter Gene ( $FC \leq -2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach *p*-Wert.

↓	GO-term	FE	p-Wert	↓	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 4 h	<i>organonitrogen compound biosynthetic process translation</i>	2,62	2,23E-14	A1 <sup>np</sup> 4 h	<i>oxoacid metabolic process</i>	5,6	5,01E-11
	<i>peptide biosynthetic process</i>	2,94	5,17E-14		<i>carboxylic acid metabolic process</i>	5,6	5,01E-11
	<i>amide biosynthetic process</i>	2,94	5,17E-14		<i>organic acid metabolic process</i>	5,43	9,53E-11
	<i>cellular nitrogen compound biosynthetic process</i>	2,52	5,17E-14		<i>small molecule metabolic process</i>	3,6	1,67E-09
	<i>biosynthetic process</i>	2,18	6,81E-14		<i>cellular amino acid metabolic process</i>	6,32	6,08E-08
	<i>cellular amide metabolic process</i>	2,88	7,48E-14		<i>amino acid activation</i>	7,35	6,90E-06
	<i>organic substance biosynthetic process</i>	2,21	9,83E-14		<i>tRNA aminoacylation</i>	7,35	6,90E-06
	<i>peptide metabolic process</i>	2,86	1,82E-13		<i>tRNA aminoacylation for protein translation</i>	7,35	6,90E-06
	<i>cellular biosynthetic process</i>	2,17	8,08E-13		<i>ncRNA metabolic process</i>	3,61	1,24E-05
						<i>ribosome biogenesis</i>	4,02

FE = fold enrichment

**Tabelle 24:** Die zehn signifikant angereicherten GO-terms (biologischer Prozess) herunterregulierter Gene ( $FC \leq -2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden, sortiert nach *p*-Wert.

↓	GO-term	FE	p-Wert	↓	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 8 h	<i>ncRNA metabolic process</i>	4,25	3,00E-07	A1 <sup>np</sup> 8 h	<i>oxoacid metabolic process</i>	4,61	8,77E-08
	<i>ribosome biogenesis</i>	4,53	3,87E-06		<i>carboxylic acid metabolic process</i>	4,61	8,77E-08
	<i>tRNA aminoacylation for protein translation</i>	7,63	5,20E-06		<i>organic acid metabolic process</i>	4,46	1,43E-07
	<i>tRNA aminoacylation</i>	7,63	5,20E-06		<i>cellular amino acid metabolic process</i>	5,93	4,35E-07
	<i>amino acid activation</i>	7,63	5,20E-06		<i>small molecule metabolic process</i>	2,87	5,60E-06
	<i>rRNA processing</i>	7,63	5,20E-06		<i>tRNA aminoacylation for protein translation</i>	7,47	6,12E-06
	<i>rRNA metabolic process</i>	7,36	7,04E-06		<i>amino acid activation</i>	7,47	6,12E-06
	<i>oxoacid metabolic process</i>	3,88	1,07E-05		<i>tRNA aminoacylation</i>	7,47	6,12E-06
	<i>carboxylic acid metabolic process</i>	3,88	1,07E-05		<i>ncRNA metabolic process</i>	3,43	4,51E-05
	<i>organic acid metabolic process</i>	3,76	1,56E-05		<i>response to temperature process</i>	18,91	2,39E-04

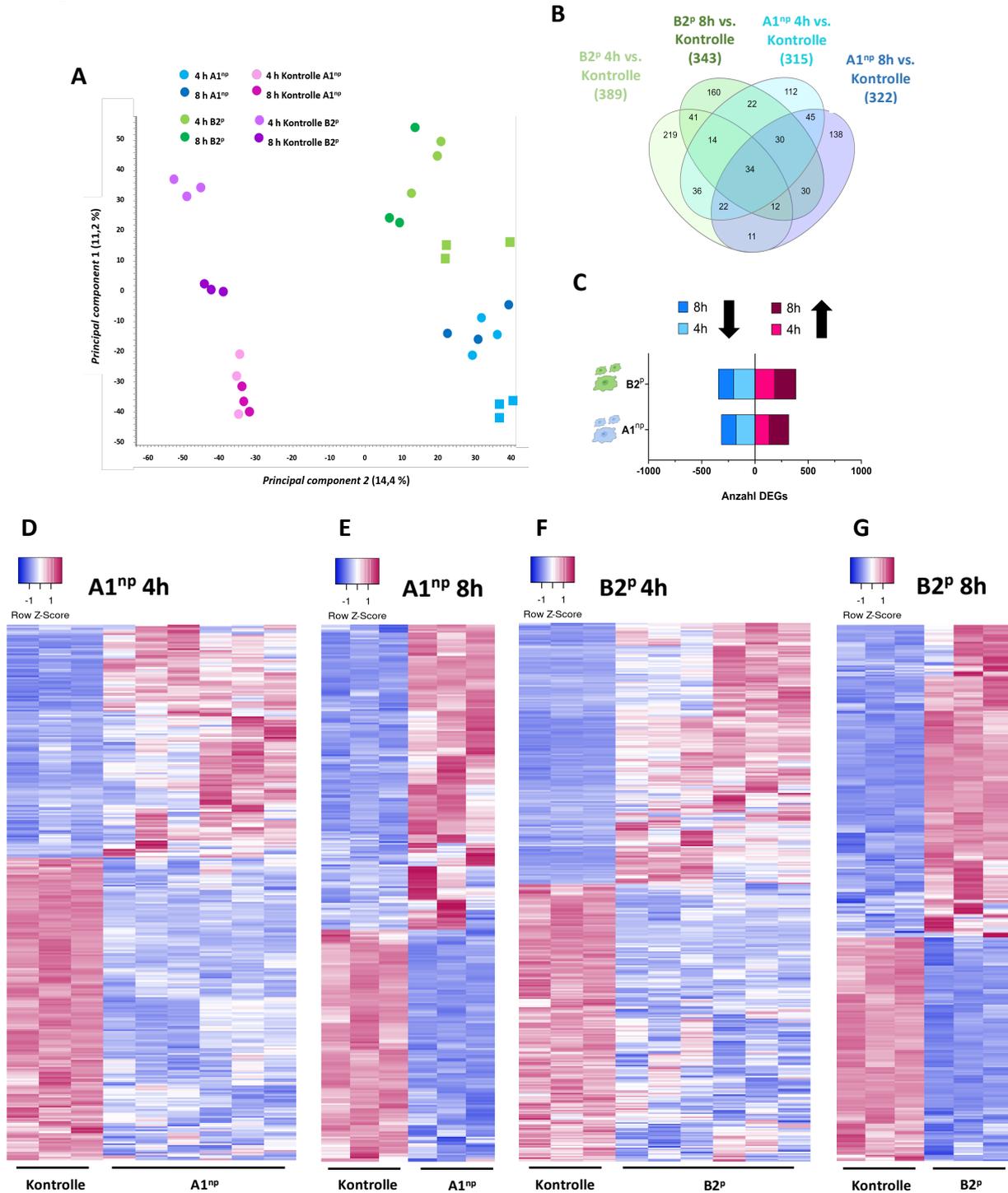
FE = fold enrichment

### 3 Ergebnisse

#### **3.5.4 Das Transkriptom von A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden**

Die PCA zeigte deutliche Unterschiede zwischen mit EC inkubierten Trophozoiten und den Kontrollen auf, wobei Klon-spezifische Unterschiede sowohl in den Kontrollproben als auch in den mit Zellen inkubierten Proben erkennbar waren (Abbildung 26A). Mit Ausnahme der B2<sup>P</sup>-Kontrollproben hatte die Inkubationszeit keinen Einfluss auf das Genexpressionsmuster. Der Tag der Probennahme hingegen hatte einen leichten Einfluss auf das Transkriptom der Trophozoiten, was auch in den zugehörigen *heatmaps* zu erkennen war (Abbildung 26D-G). Jeweils drei der sechs Replikate waren abhängig vom Tag der Probennahme auf PCA2 voneinander separiert.

## 3 Ergebnisse



**Abbildung 26: Analyse des Transkriptoms von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit Epithelzellen aus humanen Dünndarmsphäroiden.**

*E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten wurden mit Epithelzellen (EC) aus Dünndarmsphäroiden über 4 h oder 8 h coinkubiert (n = 3-6). Als Kontrolle dienten A1<sup>np</sup> oder B2<sup>p</sup> Trophozoiten, die ohne EC inkubiert wurden. (A) PCA sequenzierter A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h oder 8 h Inkubation mit und ohne EC. Die PCA wurde mit der *CLC genomics Workbench 21* Software erstellt. (B) Venn Diagramm differenziell regulierter Gene (DEGs, FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -2$  und  $\geq 2$ ) zwischen mit und ohne Zellen inkubierten A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten, die zwischen den Klonen und den Inkubationszeiten gemeinsam oder exklusiv exprimiert wurden. Die Grafik wurde mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C) Übersicht über die Anzahl differenziell hoch- und runterregulierter Gene nach Inkubation der Trophozoiten mit den EC verglichen mit der Kontrolle. (D-G) *Heatmaps* der DEG zwischen über 4 h (D, F) und 8 h (E, G) mit und ohne EC inkubierten A1<sup>np</sup> (D, E) und B2<sup>p</sup> (F, G) Trophozoiten. Gezeigt sind die z-scores TPM-normalisierter Expressionswerte, mit hoher Expression dargestellt in pink und niedriger Expression dargestellt in blau. Die Form der Datenpunkte zeigt unterschiedliche Tage der Probenahme. Die Grafik wurde mit *Heatmapper* erstellt<sup>1</sup>.

### 3 Ergebnisse

Generell war bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten eine höhere Anzahl Gene signifikant reguliert im Vergleich zu A1<sup>np</sup> Trophozoiten (Tabelle 27). Dies betraf sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene beider Inkubationszeitpunkte (Tabelle 27). Der Anteil an DEG, die für hypothetische Proteine kodieren, war in allen vier Gruppen hoch und lag zwischen 41 % und 47 %. Der Großteil der DEG war Inkubationszeit- und Klon-spezifisch reguliert, wobei 34 DEG in allen vier Gruppen gemeinsam reguliert waren (Abbildung 26B). Die Genprodukte dieser 34 gemeinsam regulierten DEG zeigen laut Panther *functional classification* Analyse Bindungs-, Transporter- und katalytische Aktivität, wobei ein Großteil der DEG nicht klassifiziert werden konnte (Abbildung A37).

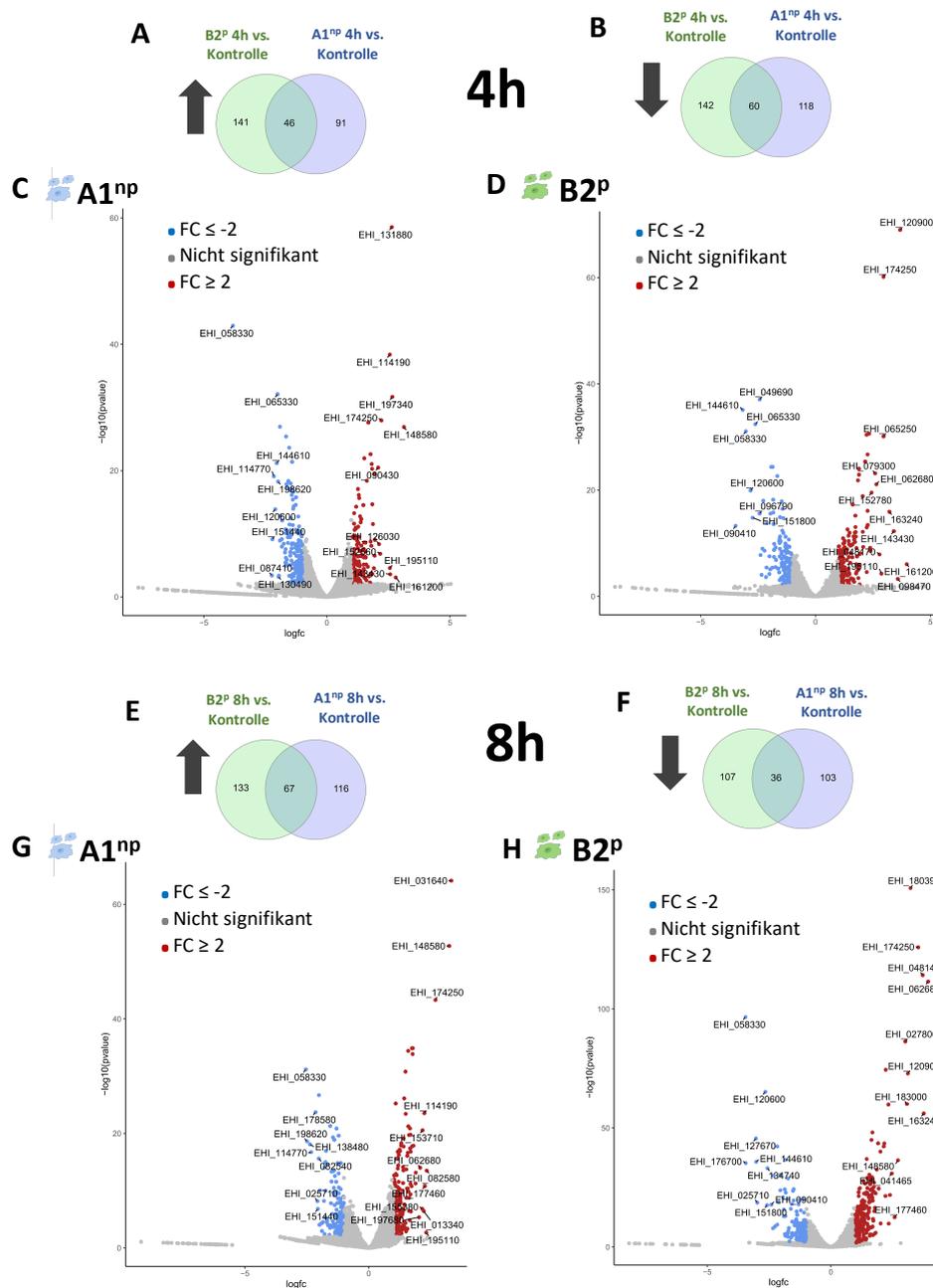
**Tabelle 25: Anzahl signifikant regulierter Gene (FDR  $p < 0,05$ , FC  $\leq -2$  und FC  $\geq 2$ ) bei A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten nach 4 h oder 8 h Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden.**

	4 h Co-Inkubation			8 h Co-Inkubation		
	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt	DEGs ↓	DEGs ↑	DEGs insgesamt
<b>B2<sup>P</sup></b>	202	187	389	143	200	343
<b>A1<sup>np</sup></b>	178	137	315	139	183	322

DEGs = differentiell exprimierte Gene

In jedem der vier Vergleiche ist ein anderes Gen am stärksten hochreguliert. Bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten ist nach 4 h *ehi\_148580*, das für *cholin, ethanolamine kinase (putative)* kodiert, und nach 8 h *ehi\_031640*, das für ein hypothetisches Protein kodiert, am stärksten hochreguliert (Abbildung 27C und Abbildung 27G, Tabelle A42 und Tabelle A43). Das am stärksten bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten nach 4 h hochregulierte Gen kodiert für *actin 2 protein (putative, ehi\_161200)* und nach 8 h für ein hypothetisches Protein (*ehi\_062680*, Abbildung 27D und Abbildung 27, Tabelle A44). In drei der vier Bedingungen ist *galactose inhibitable lectin (putative, ehi\_058330)* am stärksten herunterreguliert (Abbildung 27C, Abbildung 27G, Abbildung 27H, Tabelle A42, Tabelle A43). Ausschließlich bei über 4 h mit EC inkubierten B2<sup>P</sup> Trophozoiten ist *ehi\_062680*, das für ein hypothetisches Protein kodiert, am stärksten herunterreguliert (Abbildung 27D, Tabelle A44).

## 3 Ergebnisse

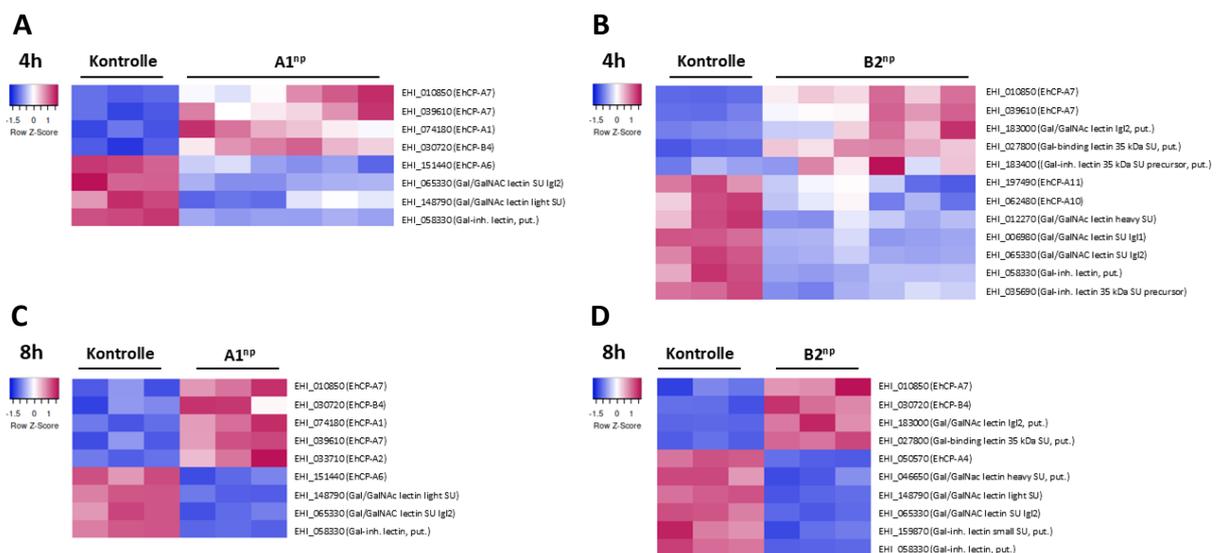


**Abbildung 27: Analyse differenziell exprimierter Gene von *E. histolytica* Trophozoiten nach Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden.**

*E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten wurden mit Epithelzellen (EC) aus Dünndarmsphäroiden über 4 h oder 8 h kokultiviert (n = 3-6). Als Kontrolle dienten A1<sup>np</sup> oder B2<sup>P</sup> Trophozoiten, die ohne EC inkubiert wurden. DEG (FDR  $p \leq 0,05$ , FC  $\leq -2$  und  $\geq 2$ ) zwischen mit und ohne EC inkubierten A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten wurden verglichen. (A, B, E, F) Venn Diagramme differenziell hoch- (A, E) und herunterregulierter Gene (B, F) zwischen mit und ohne EC für 4 h (A, B) und 8 h (E, F) inkubierten A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten, die zwischen den Klonen gemeinsam oder exklusiv exprimiert wurden. Die Venn Diagramme wurden mit *InteractiVenn* erstellt<sup>2</sup>. (C, D, G, H) *Volcano plots* zur Darstellung der relativen Genexpression mit logfc als Indikator für das Ausmaß der Expressionsänderung und  $-\log_{10}(pvalue)$  als Messgröße der statistischen Signifikanz zwischen mit und ohne EC für 4 h (C, D) oder 8 h (G, H) inkubierten A1<sup>np</sup> (C, G) oder B2<sup>P</sup> (D, H) Trophozoiten. Signifikant hochregulierte Gene sind rot und signifikant herunterregulierte Gene sind blau dargestellt. Die zwanzig DEG mit den stärksten Änderungen des FC wurden gekennzeichnet. *Volcano plots* wurden mit *Galaxy Europe Server* erstellt.

### 3 Ergebnisse

DEG, die für Pathogenitätsfaktoren wie Cysteinpeptidasen (CP) und Lektine kodieren, sind in Abbildung 28 zu sehen. Dabei fiel auf, dass Lektinogene bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten, nicht aber bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten hochreguliert waren (Abbildung 28). Umgekehrt waren mehr Gene, die für CP kodieren, bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten hochreguliert im Vergleich zu B2<sup>P</sup> Trophozoiten (Abbildung 28). Nach 4 h Inkubation waren *ehcp-b4* und *ehcp-a1* A1<sup>NP</sup>-spezifisch und beide Homologe der *ehcp-a7* bei beiden Klonen hochreguliert, während kein CP-Gen B2<sup>P</sup>-spezifisch hochreguliert war (Abbildung 28A und Abbildung 28B). Nach 8 h Co-Inkubation waren *ehcp-a1*, *ehcp-a2* und *ehcp-a7* A1<sup>NP</sup>-spezifisch hochreguliert, während wiederum kein CP-Gen B2<sup>P</sup>-spezifisch hochreguliert war (Abbildung 28C und Abbildung 28D). Bei beiden Klonen waren *ehcp-b4* und *ehcp-a7* hochreguliert (Abbildung 28C und Abbildung 28D). Nach 4 h Co-Inkubation waren die Gene *ehcp-a10* und *ehcp-a11* bei B2<sup>P</sup>-Trophozoiten herunterreguliert, während bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten keine CP-Gene herunterreguliert waren (Abbildung 28A und Abbildung 28B). Nach 8 h Inkubation war *ehcp-a6* A1<sup>NP</sup>-spezifisch und *ehcp-a4* B2<sup>P</sup>-spezifisch herunterreguliert (Abbildung 28C und Abbildung 28D).



**Abbildung 28: Signifikant regulierte Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, bei mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten *E. histolytica* Trophozoiten.**

(A-D) Heatmaps differenziell exprimierter Genen (FDR  $p < 0,05$ , FC  $\leq -2$  und  $\geq 2$ ), die für Cysteinpeptidasen und Lektine kodieren, zwischen über 4 h (A, B) und 8 h (C, D) mit und ohne Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten A1<sup>NP</sup> (A, C) und B2<sup>P</sup> (B, D) Trophozoiten. Gezeigt sind die z-scores transcripts per million (TPM)-normalisierter Expressionswerte, mit hoher Expression dargestellt in pink und niedriger Expression dargestellt in blau. Die Grafik wurde mit Heatmapper erstellt<sup>1</sup>.

Die GO enrichment-Analyse zur Identifizierung von durch DEG betroffenen biologischen Prozessen ergab für hochregulierte Gene bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten eine Beteiligung an Prozessen des Proteinmetabolismus nach 4 h und der Endozytose und des Zellmembranmetabolismus nach 8 h Inkubation (Tabelle 26 und Tabelle 27). Bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten waren hochregulierte Gene in metabolische Pro-

## 3 Ergebnisse

zesse, wie dem Lipid-, Protein- und Kohlenhydratmetabolismus nach 4 h und in Prozesse assoziiert mit oxidativem Stress nach 8 h, involviert (Tabelle 26 und Tabelle 27).

**Tabelle 26:** Die zehn signifikant angereicherten GO-terms hochregulierter Gene ( $FC \geq 2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach *p*-Wert.

↑	GO-term	FE	p-Wert	↑	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 4 h	<i>S-adenosylmethionine metabolic process</i>	30,79	0,0014	A1 <sup>np</sup> 4 h	<i>biosynthetic process</i>	2,21	2,68E-04
	<i>S-adenosylmethionine biosynthetic process</i>	30,79	0,0014		<i>S-adenosylmethionine metabolic process</i>	42,02	7,38E-04
	<i>one-carbon metabolic process</i>	23,09	0,0027		<i>S-adenosylmethionine biosynthetic process</i>	42,02	7,38E-04
	<i>small molecule metabolic process</i>	2,63	0,0028		<i>organic substance biosynthetic process</i>	2,1	1,10E-04
	<i>prenylation</i>	18,47	0,0045		<i>translation</i>	2,73	1,21E-04
	<i>protein prenylation</i>	18,47	0,0045		<i>amide biosynthetic process</i>	2,72	1,25E-04
	<i>nucleotide-sugar biosynthetic process</i>	15,39	0,0066		<i>peptide biosynthetic process</i>	2,72	1,25E-04
	<i>lipid metabolic process</i>	2,58	0,0077		<i>one-carbon metabolic process</i>	31,51	1,46E-04
	<i>mismatch repair</i>	10,26	0,0151		<i>peptide metabolic process</i>	2,64	1,59E-04
	<i>sulfur compound metabolic process</i>	10,26	0,0151		<i>cellular amide metabolic process</i>	2,62	1,74E-04

FE = fold enrichment

**Tabelle 27:** Die zehn signifikant angereicherten GO-terms hochregulierter Gene ( $FC \geq 2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach *p*-Wert.

↑	GO-term	FE	p-Wert	↑	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 8 h	<i>obsolete oxidation-reduction process</i>	5,97	4,86E-07	A1 <sup>np</sup> 8 h	<i>one-carbon metabolic process</i>	30,68	5,59E-05
	<i>one-carbon metabolic process</i>	24,99	1,04E-04		<i>S-adenosylmethionine biosynthetic process</i>	27,27	0,0018
	<i>homeostatic process</i>	5,83	1,54E-04		<i>S-adenosylmethionine metabolic process</i>	27,27	0,0018
	<i>cell redox homeostasis</i>	5,88	4,42E-04		<i>obsolete electron transport</i>	4,31	0,0132
	<i>regulation of biological quality</i>	4,1	6,42E-04		<i>mismatch repair</i>	9,09	0,0191
	<i>obsolete electron transport</i>	5,26	8,21E-04		<i>sulfur compound biosynthetic process</i>	9,09	0,0191
	<i>cellular homeostasis</i>	5,26	8,21E-04		<i>endocytosis</i>	8,18	0,0235
	<i>reactive oxygen species metabolic process</i>	33,31	8,95E-04		<i>phosphatidylcholine biosynthetic process</i>	40,91	0,0244
	<i>superoxide metabolic process</i>	33,31	8,95E-04		<i>phosphatidylcholine biosynthetic process</i>	40,91	0,0244
	<i>sulfur compound metabolic process</i>	7,84	0,0014		<i>proteolysis</i>	1,98	0,0371

FE = fold enrichment

## 3 Ergebnisse

Unabhängig von der Inkubationszeit waren bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten biologische Prozesse wie der Energiemetabolismus und der Metabolismus von herunterregulierten Genen betroffen (Tabelle 28 und Tabelle 29). Nach 8 h Inkubation war zusätzlich der Metabolismus von Aminosäuren durch herunterregulierte Gene betroffen (Tabelle 29). Bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten war nach 4 h der Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus durch herunterregulierte Gene betroffen (Tabelle 28). Nach 8 h Inkubation waren vor allem Prozesse des Proteinmetabolismus von herunterregulierten Genen betroffen (Tabelle 29).

**Tabelle 28:** Die zehn signifikant angereicherten GO-terms herunterregulierter Gene ( $FC \leq -2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach *p*-Wert.

↓	GO-term	FE	p-Wert	↓	GO-term	FE	p-Wert
	<i>alpha-amino acid metabolic process</i>	7,86	0,0014		<i>generation of precursor metabolites and energy</i>	9,34	3,13E-05
	<i>serine family amino acid metabolic process</i>	10,18	0,0027		<i>protein folding</i>	6,11	3,84E-05
	<i>response to temperature stimulus</i>	18,66	0,0041		<i>carboxylic acid metabolic process</i>	4,52	5,99E-05
	<i>response to heat</i>	18,66	0,0041		<i>oxoacid metabolic process</i>	4,52	5,99E-05
	<i>response to abiotic stimulus</i>	14,92	0,0068		<i>organic acid metabolic process</i>	4,38	7,87E-05
	<i>carbohydrate derivative catabolic process</i>	7	0,0082		<i>small molecule metabolic process</i>	3,05	1,64E-04
	<i>polysaccharide metabolic process</i>	7	0,0082		<i>obsolete electron transport</i>	6,63	2,36E-04
	<i>cysteine metabolic process</i>	12,44	0,01		<i>nucleotide phosphorylation</i>	10,5	4,43E-04
	<i>sulfur amino acid metabolic process</i>	10,66	0,0137		<i>purine ribonucleoside diphosphate metabolic process</i>	10,5	4,43E-04
	<i>serine family amino acid biosynthetic process</i>	9,33	0,018		<i>purine nucleoside diphosphate metabolic process</i>	10,5	4,43E-04

FE = fold enrichment

**Tabelle 29:** Die zehn signifikant angereicherten GO-terms herunterregulierter Gene ( $FC \leq -2$ ,  $FDR p < 0,05$ ) mit den höchsten *fold enrichment* Werten bei *E. histolytica* Trophozoiten nach 8 h Co-Inkubation mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden sortiert nach *p*-Wert.

↓	GO-term	FE	p-Wert	↓	GO-term	FE	p-Wert
B2 <sup>p</sup> 8 h	<i>obsolete electron transport</i>	7,14	5,90E-04	A1 <sup>np</sup> 8 h	<i>carboxylic acid metabolic process</i>	5,45	1,14E-05
	<i>obsolete oxidation-reduction process</i>	4,05	0,0075		<i>oxoacid metabolic process</i>	5,45	1,14E-05
	<i>organic substance catabolic process</i>	2,71	0,0088		<i>organic acid metabolic process</i>	5,28	1,52E-05
	<i>catabolic process</i>	2,63	0,0105		<i>cellular amino acid metabolic process</i>	6,96	5,27E-05
	<i>protein modification by small protein removal</i>	6,26	0,013		<i>cysteine metabolic process</i>	25,35	1,42E-04
	<i>protein modification by small protein conjugation</i>	4,34	0,018	<i>sulfur amino acid metabolic process</i>	21,73	2,46E-04	

## 3 Ergebnisse

<i>or removal</i>						
<i>purine-containing compound catabolic process</i>	54,23	0,018		<i>regulation of biosynthetic process</i>	3,9	9,22E-04
<i>macromolecule diacylation</i>	54,23	0,018		<i>regulation of macromolecule biosynthetic process</i>	3,9	9,22E-04
<i>ceramide catabolic process</i>	54,23	0,018		<i>regulation of cellular macromolecule biosynthetic process</i>	3,9	9,22E-04
<i>histone deacetylation</i>	54,23	0,018		<i>regulation of cellular biosynthetic process</i>	3,9	9,22E-04

FE = fold enrichment

## 4 Diskussion

### 4 Diskussion

Amöbiasis, eine Infektionskrankheit ausgelöst durch den Parasiten *E. histolytica*, führte 2016 bei mehr als 26.000 Menschen zum Tod<sup>91</sup>. Die Mehrheit der Infektionen verläuft symptomlos, wobei es bei 10 % der Infektionen zu einem invasiven Verlauf der Krankheit kommt<sup>3; 60; 64; 66</sup>. Ausgelöst durch weitgehend unbekannte Faktoren penetriert der Parasit dabei die Mukosa des Kolons, was zu massiven Gewebeschäden führt<sup>3; 64; 66</sup>. Bei 3-9 % der Infektionen mit invasivem Verlauf entwickelt sich eine extraintestinale Amöbiasis gekennzeichnet durch Abszessbildung, hauptsächlich manifestiert in der Leber<sup>70; 71</sup>. In den meisten Studien zur Erforschung der invasiven Amöbiasis wurde das pathogene *E. histolytica* Isolat HM-1:IMSS mit dem nicht pathogenen *E. histolytica* Isolat Rahman oder der nicht pathogenen *Entamoeba* Spezies *E. dispar* verglichen<sup>130; 170; 171; 172</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden genetisch identische Klone des *E. histolytica* HM-1:IMSS Isolats verwendet, die sich in ihrer Fähigkeit ALA im Tiermodell zu induzieren, unterscheiden<sup>147</sup>. Dazu steht der A1<sup>np</sup> Klon als nicht pathogener Klon und der B2<sup>p</sup> Klon als pathogener Klon am BNITM zur Verfügung<sup>147; 152</sup>. Mögliche Unterschiede in der Wirt-Parasit-Interaktion zwischen den beiden *E. histolytica* Klonen wurden mit Hilfe einer aus primären intestinalen Sphäroiden generierten Epithelzellschicht im *transwell*-System (SDM-Kulturen) untersucht. Zunächst wurde die Kultur intestinaler Sphäroide etabliert, aus denen im nächsten Schritt differenzierte SDM-Kulturen generiert wurden. Die SDM-Kulturen wurden hinsichtlich präsenter Zelltypen, ihrer Polarisierung und elektrophysiologischer Dichte charakterisiert, bevor sie mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten co-inkubiert wurden. Der Einfluss der Co-Inkubation auf die Barrierefunktion der Epithelzellen (EC) sowie auf das Transkriptom der Zellen und der *E. histolytica* Trophozoiten wurde untersucht.

#### 4.1 Etablierung intestinaler Sphäroidkulturen

Die Langzeitkultur intestinaler Organoiden generiert aus kompletten Krypten oder einzelnen LGR5<sup>+</sup>-Stammzellen aus murinem Dünndarmgewebe, im Folgenden als Enteroide bezeichnet, wurde 2009 zuerst von Sato *et al.* beschrieben<sup>164</sup>. Für die Kultivierung von Enteroiden über einen längeren Zeitraum ist der Zusatz der Stammzellnischenfaktoren EGF, R-Spondin 1 und Noggin sowie die Einbettung in einer extrazellulären Matrix (ECM) nötig<sup>166</sup>. Diese Faktoren koordinieren die Aktivierung des Wnt- (vermittelt durch R-Spondin 1) und EGF-Signalwegs sowie die Inhibierung des BMP-Signalwegs (vermittelt durch Noggin)<sup>164; 184; 185; 186</sup>. Für die Langzeitkultur muriner Organoiden aus Kolongewebe, im Folgenden als Kolonoide bezeichnet, war es nötig, dem Kulturmedium zusätzlich WNT3a zuzufügen<sup>166</sup>. WNT3a aktiviert den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, der die Proliferation in intestinalen Krypten stimuliert und essenziell zum Erhalt der Stammzellen ist<sup>187</sup>. Ohne zusätzliches WNT3a überlebten intestinale Krypten initial, waren aber nicht passagierfähig<sup>166</sup>. Kolonoide verlieren kurz nach Initiierung der Kultur ohne WNT3a im Medium die Expression von WNT-Reportertransgenen<sup>166</sup>. Im

#### 4 Diskussion

Gegensatz zu Enteroiden enthalten Kolonoide keine Paneth Zellen, die für den Erhalt von intestinalen Stammzellen essenzielle WNT-Liganden sezernieren<sup>41; 188</sup>. Werden humane Kolonoide unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie murine Kolonoide, zerfallen sie innerhalb von sieben Tagen<sup>166</sup>. Die Zugabe von Gastrin, Nikotinamid, TGF- $\beta$ -Inhibitor (A83-01) und p38-Inhibitor (SB202190) verhindert den Zerfall und macht eine Kulturperiode von über sechs Monaten möglich<sup>166</sup>. Die Verwendung von PGE2, das den kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg stimuliert, erhöhte zudem die Proliferationsfähigkeit humaner Kolonoide signifikant<sup>189; 190</sup>. Humane Enteroide konnten unter denselben Bedingungen kultiviert werden, wie humane Kolonoide<sup>166</sup>. Humane und murine Organoide zeigen in der Präsenz von WNT3a keine Differenzierung und bilden Stammzell-angereicherte zystische Strukturen, sogenannte Sphäroide<sup>41; 166</sup>. Durch Entzug von WNT3a, Nikotinamid und SB202190 aus dem Kulturmedium kann eine Differenzierung initiiert werden<sup>166</sup>. Es wurde nachgewiesen, dass die Chromosomenzahl der Organoidzellen nach dreimonatiger Kultur unter den genannten Bedingungen unverändert bleibt und das Expressionsmuster dem frisch isolierter Krypten gleicht<sup>166</sup>.

WNT3a kann als rekombinantes Protein oder als *conditioned* Medium (CM) verschiedener *WNT3a*-exprimierender Zelllinien, wie z.B. L-WRN-Zellen<sup>182</sup> oder L-Wnt3a-Zellen<sup>191</sup>, im Sphäroidmedium eingesetzt werden. L-WRN-Zellen haben im Vergleich zu L-Wnt3a-Zellen den Vorteil, dass sie neben WNT3a auch R-Spondin 3 und Noggin in den Kulturüberstand sezernieren. CM als WNT3a-Quelle ist im Vergleich zu rekombinantem WNT3a kostengünstiger und potenter in der Aktivierung des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs<sup>177; 182</sup>. Zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit sollte die WNT3a-Aktivität im CM vor dem Einsatz im Kulturmedium überprüft und quantifiziert werden, da diese den Zellstatus der Sphäroide beeinflusst<sup>192</sup>. Die WNT-Aktivität im selbstproduzierten L-WRN-CM, bestimmt mit Hilfe des Luciferase Reporter Tests, war auch nach mehrfacher Optimierung des Protokolls wie der Erhöhung des Selektionsdrucks und der Selektionsdauer zu niedrig, um die Proliferationsfähigkeit der intestinalen Sphäroidkulturen zu erhalten. Mit dem selbst produzierten L-WRN-CM kultivierte Sphäroide stellten innerhalb weniger Tage das Wachstum ein und konnten nicht passagiert werden. Wurden die Sphäroide in kommerziellem L-WRN-CM kultiviert, führte das zu einer deutlichen Verbesserung der Proliferationsfähigkeit, sodass sie in einem hohen Verhältnis von bis zu 1:3 passagiert werden konnten. Kommerzielles L-WRN-CM ist kostenintensiver, erspart jedoch den zeitlichen und materiellen Aufwand der Produktion und der Qualitätskontrolle.

Zu lange Lagerungszeiten bei 4 °C konnten als Grund für die geringe WNT-Aktivität im L-WRN-CM ausgeschlossen werden, da das L-WRN-CM nach der Produktion konsequent bei -20 °C eingefroren, direkt vor der Nutzung aufgetaut und nicht länger als 2 Wochen bei 4 °C gelagert wurde. Erst bei Lagerungszeiten von über 3 Wochen bei 4 °C sinkt die WNT-Aktivität signifikant<sup>192</sup>. Es ist bekannt, dass wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen die Integrität und Funktionalität von Proteinen beeinträchtigen können. Im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestelltes L-WRN-CM durchlief einen Einfrier-Auftau-

## 4 Diskussion

Zyklus, der die WNT-Aktivität nachgewiesenermaßen nicht beeinträchtigt<sup>192</sup>. Zur sicheren Entfernung eventueller Kontaminationen des L-WRN-CM mit L-WRN-Zellen wird ein Einfrier-Auftau-Zyklus sogar empfohlen<sup>192</sup>. Der Zustand der L-WRN-Zellen wurde mikroskopisch durch Betrachtung der Zellmorphologie überprüft, wodurch auch Kontaminationen der Kultur mit anderen Zelltypen ausgeschlossen werden konnten. Weiterhin kann die Anzahl der Passagen der Kultur einen Einfluss auf die Sekretion der Wachstumsfaktoren haben, wobei dieses Risiko durch das Anlegen einer großen Anzahl an Kryokulturen bei niedriger Passagennummer geringgehalten wurde. Weitere mögliche Gründe für die geringe WNT-Aktivität sind neben anderen eine zu niedrige Aktivität der Selektionsfaktoren oder die Sezernierung unerwünschter Nebenprodukte in den Kulturüberstand durch die L-WRN-Zellen<sup>182</sup>, sowie unbekannte Produkte im fötalem Rinderserum (FBS), die *batch*-abhängig variieren können. Nicht definierte Produkte im L-WRN-CM können zelluläre Signalwege beeinflussen und so zu einer Reduktion der WNT-Aktivität führen<sup>182</sup>. Verschiedene FBS-*batches* können verschieden hohe WNT-Aktivitäten bedingen, sodass das Ausprobieren mehrerer *batches* für die L-WRN-CM Produktion sinnvoll wäre, um FBS als Ursache entweder auszuschließen oder zu identifizieren.

Humane und murine Sphäroide wurden in einem Medium kultiviert, das kommerzielles L-WRN-CM und selbst produziertes R-Spondin 1-CM, sowie rekombinantes Noggin und EGF enthält. Außerdem wurden der TGF- $\beta$ -Inhibitor A83-01 und der p38-Inhibitor SB202190, sowie Nikotinamid zugesetzt. Im Falle von humanen Sphäroiden wurde zusätzlich PGE2 verwendet. Zur Passage sowie auch zur Generierung von SDM-Kulturen bewährte sich die Aussaat von Sphäroidfragmenten gegenüber der Aussaat vereinzelter Sphäroidzellen, wie in mehreren Protokollen angegeben<sup>178; 193</sup>. Die Verwendung von Y-27632, das die Anokis der EC durch Inhibition von Rho-assoziierten Proteinkinasen (ROCK) hemmt, verbesserte die Überlebensfähigkeit der EC während des Dissoziationsprozesses merklich<sup>194; 195</sup>.

Unter diesen Kulturbedingungen zeigten die Sphäroide die typisch zystische Struktur mit einer dünnen Epithelzellschicht und heterogener Größenverteilung, vergleichbar mit den Angaben in der Literatur<sup>196; 197</sup>. Humane Kolonsphäroide verloren nach zwölf Passagen ihre Proliferationsfähigkeit und konnten nur langsam expandiert werden. Gastrin ist bekannt dafür die Kulturperiode humaner Kolonsphäroide zu verlängern, ohne die Differenzierung der intestinalen EC zu beeinflussen und könnte in Zukunft als weitere Mediumkomponente eingesetzt werden<sup>166</sup>.

### 4.2 Etablierung und Charakterisierung von Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden

Verschiedene Organoid-basierte Modelle und Techniken stehen zur Untersuchung von Wirt-Parasit-Interaktionen zur Verfügung, die vor allem für Co-Inkubationen mit Viren und Bakterien, aber auch mit protozoischen Pathogenen genutzt wurden<sup>198; 199; 200 193; 201; 202; 203; 204; 205</sup>. Eine Möglichkeit ist die Mikroinjektion der Pathogene in das Organoidlumen, was beispielsweise für *Cryptosporidium (C.)*

#### 4 Diskussion

*parvum* und *Toxoplasma gondii* gezeigt wurde<sup>206; 207; 208</sup>. Für größere Parasiten wie *E. histolytica* ist diese Technik allerdings ungeeignet, da die Trophozoiten mit einer Größe von bis zu 60  $\mu\text{M}$  nicht in das Organoidlumen injiziert werden können<sup>209</sup>. Modelle wie *apical-out* Organoide, deren Polarisierung durch Kultivierung ohne ECM umgekehrt ist, oder die Verwendung von Organoidfragmenten wurden aufgrund des erleichterten Zugangs der apikalen Seite für Infektionsexperimente unter anderem mit den Protozoen *Toxoplasma gondii* oder *Eimeria tenella* verwendet<sup>210; 211</sup>. Da der Einsatz nur eines Kulturmediums möglich ist, das für Parasit und Wirt geeignet sein muss, sind diese Modelle auf bestimmte Pathogene limitiert. Als Alternative zu den genannten Modellen erwiesen sich SDM-Kulturen im *transwell*-System für die Infektion mit *G. intestinalis*, *Toxoplasma gondii* oder *C. parvum* neben anderen als praktikables Modell, das den Einsatz zwei verschiedener Kulturmedium auf apikaler und basaler Seite der Epithelzellschicht erlaubt<sup>173; 178; 212; 213</sup>. Für Co-Inkubationsexperimente mit *E. histolytica* wurden SDM-Kulturen im *transwell*-System verwendet, da *E. histolytica* Trophozoiten in dem SDM-Kulturmedium nicht überlebensfähig sind. Neben Vorteilen wie dem erleichterten Zugang der apikalen Seite und der Möglichkeit zwei verschiedene Kulturmedien einzusetzen, können SDM-Kulturen durch Integration von Immunzellen für zukünftige Experimente erweitert werden, was beispielsweise für Makrophagen und Neutrophile gezeigt wurde<sup>214</sup>. *Air-liquid-interface* (ALI) Kulturen, SDM-Kulturen deren Mukusproduktion durch Entzug des apikalen Mediums stimuliert wird, wurden zur Untersuchung der Beteiligung des Mukus entwickelt und unter anderem für Co-Kulturen mit *C. parvum* verwendet<sup>215</sup>.

Alle SDM-Kulturen aus humanem Dünndarm bildeten elektrophysiologisch dichte Epithelzellschichten, bestimmt durch Messung des TEER. Der TEER stieg kontinuierlich an und erreichte innerhalb von zehn Tagen einen Wert von im Mittel  $\sim 200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Werten<sup>173; 178; 193</sup>. Dabei sollte erwähnt werden, dass diese Messvariante keine Informationen darüber liefert, inwiefern sich der gemessene Widerstand aus der transzellulären Barriere (apikale und basale Zellmembran) und der parazellulären Barriere (*tight junctions*, TJ) der Epithelzellschicht zusammensetzt. Die Messung der Impedanz gibt zusätzlich Aufschluss über die elektrische Kapazität einer Zellschicht, die abhängig von der Morphologie der Zellen ist und beispielsweise Informationen über die Ausprägung von Mikrovilli liefern kann<sup>216</sup>. Mittels *two-way* Impedanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass unter ähnlichen Bedingungen wie im Rahmen dieser Arbeit kultivierte humane duodenale SDM-Kulturen die para- und transzellulären Eigenschaften ihrer Spendergewebe widerspiegeln<sup>217</sup>. Neben der Messung des TEER war die Präsenz des TJ Proteins ZO-1, das auf der gesamten Oberfläche der SDM-Kulturen detektiert werden konnte, ein weiteres Zeichen der Dichtigkeit. Mit einer Zellhöhe von durchschnittlich 13  $\mu\text{M}$  waren die generierten SDM-Kulturen im Vergleich zu in der Literatur angegebenen Werten von 20  $\mu\text{M}$  flacher<sup>212</sup>. Aufgrund der flachen Zellstruktur war es wichtig, die Präsenz verschiedener Zelltypen in den SDM-Kulturen zu überprüfen, da eine dicke, säu-

#### 4 Diskussion

lenförmige Morphologie mit einem fortgeschrittenen Differenzierungsgrad assoziiert wird<sup>212; 218</sup>. Mittels IFA konnte der Enterozytenmarker NHE3, dessen Funktion die aktive Absorption von Natrium-Ionen und Wasser aus dem Darmlumen sowie die Regulierung der intrazellulären pH-Homöostase ist, nahezu flächendeckend auf der apikalen Oberfläche der SDM-Kulturen detektiert werden<sup>219</sup>. Weiterhin konnte die Akkumulation von F-Aktin, das in „Bündeln“ die apikal lokalisierten Mikrovilli der Enterozyten bildet, auf der apikalen Oberfläche der SDM-Kulturen nachgewiesen werden. Zusammen auch als *brush border* bezeichnet, weisen Mikrovilli auf vollständig differenzierte Enterozyten hin<sup>220</sup>. Die Expression von SOX9, ein Transkriptionsfaktor lokalisiert im Nukleus und zuständig für die Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, konnte ebenfalls mittels IFA detektiert werden<sup>221</sup>. Neben der Expression von SOX9 in proliferativen Zellen wird SOX9 in der Literatur auch als Marker für Enteroendokrine und Paneth Zellen beschrieben<sup>222; 223</sup>. Die zytoplasmatische Detektion von Lysozym, ein antibakterielles Enzym sezerniert von Paneth Zellen, deutete auf die Präsenz von Paneth Zellen in den duodenalen SDM-Kulturen hin<sup>224</sup>. Nicht mittels IFA detektiert werden konnte Mucin 2 (MUC2), ein Markerprotein für Goblet Zellen sowie für die Hauptkomponente der Mukusschicht (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund könnte das Vorhandensein von Nikotinamid im Differenzierungsmedium sein. Der Entzug von Nikotinamid stimuliert die Differenzierung sekretorischer Zelltypen inklusive Goblet Zellen<sup>166</sup>. Weiterhin kann die Differenzierung in Richtung Goblet Zellen durch Verwendung von *N*-[*N*-(3,5-Difluorphenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycin-*tert*-butylester (DAPT) oder Dibenzazepin (DBZ), die beide den Notch-Signalweg durch Inhibierung der  $\gamma$ -Sekretase hemmen, sowie dem Entzug des apikalen Kulturmediums (ALI-Kultur) stimuliert werden, was nicht Teil der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Kultivierungsmethode war<sup>225; 226; 204; 215; 227</sup>. Neben MUC2 konnte Synaptophysin, der Marker für Enteroendokrine Zellen, nicht mittels IFA detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend unterstützt die verwendete Kultivierungsmethode elektrophysiologisch dichte duodenale SDM-Kulturen mit Differenzierung in Richtung absorbierender Enterozyten, die flächendeckend detektiert werden konnten. Ob Enteroendokrine und Goblet Zellen in den Kulturen präsent sind, bleibt unklar und müsste durch weitere Tests, wie z.B. der Quantifizierung der *messenger* (m)RNA von Markergenen oder zusätzliche IFA weiterer Markerproteine, überprüft werden. *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) könnte Aufschluss über die genaue Zellzusammensetzung der SDM-Kulturen geben, ist aber aufgrund der dafür nötigen vereinzelt Zellen schwer umzusetzen.

Während alle duodenalen SDM-Kulturen stabile *monolayer* bildeten, entwickelte sich nur ein Teil der SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden, unabhängig von der Spezies, zu dichten Epithelzellschichten. Erfolgreich gebildete SDM-Kulturen aus Kolongewebe erreichten fünf- bis achtfach höhere TEER-Werte im Vergleich zu duodenalen SDM-Kulturen, ähnlich wie in der Literatur beschrieben<sup>228; 229</sup>. Der TEER humaner Biopsien aus Kolongewebe gemessen in einer Ussing-Kammer erreichte 2,5- bis 3-fach

## 4 Diskussion

höhere Werte, als die der Biopsien aus Dünndarmgewebe<sup>230</sup>. Diese Unterschiede im TEER könnten auf die verschiedenen Funktionen des Herkunftsgewebes der Sphäroide zurückzuführen sein. Neben der Absorption von Wasser und Elektrolyten ist der Dickdarm das Hauptreservoir kommensaler Mikroorganismen des gastro-intestinalen Trakts ausgesetzt, gegen die er eine verlässliche Barriere bilden muss. Die Hauptaufgabe des Dünndarms hingegen ist die Absorption von Nährstoffen, was eine gewisse Permeabilität des Epithels voraussetzt<sup>6; 7</sup>. TJ bilden die parazelluläre Barriere des intestinalen Epitheliums und regulieren durch Formierung von Kanälen den Fluss von Ionen und kleinen Molekülen, hauptsächlich vermittelt durch Claudine. Ihre Permeabilität variiert zwischen verschiedenen intestinalen Abschnitten, bedingt durch unterschiedliche Expression von TJ Proteinen wie Claudinen<sup>231; 232</sup>.

Der Einbruch der SDM-Kulturen aus Kolongewebe erfolgte nach dem Entzug von WNT3a aus dem Kulturmedium, weshalb eine weitere Supplementierung des Mediums mit diesem Wachstumsfaktor zu effizienterer Formierung elektrophysiologisch dichter SDM-Kulturen führen könnte. Werden Konoide kultiviert, ist die Zugabe von WNT3a für eine stabile Kultur notwendig, wohingegen Enteroide aufgrund der Präsenz von Paneth Zellen auch ohne zusätzliches WNT3a kultiviert werden können<sup>166</sup>.

### 4.3 Co-Inkubation von *E. histolytica* Trophozoiten mit Epithelzellkulturen aus intestinalen Sphäroiden

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Co-Inkubationen wurden mit extern generierten SDM-Kulturen durchgeführt. Mit 69 % war die Überlebensfähigkeit von *E. histolytica* Trophozoiten nach 24 h unter aeroben Bedingungen hoch und vergleichbar mit der anderer fakultativ anaerob lebender Darmparasiten wie *G. intestinalis*<sup>233</sup>. Um mögliche Unterschiede des Einflusses von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion intestinaler EC zu identifizieren, wurden 250 und 500 Trophozoiten mit SDM-Kulturen aus humanen Kolon- und Dünndarmsphäroiden inkubiert. Außerdem sollte geprüft werden, ob die Inkubation der Trophozoiten mit SDM-Kulturen aus Kolon- und Dünndarmsphäroiden zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Als Indikator für die Integrität der Epithelzellschicht nach Kontakt zu den Trophozoiten wurde der TEER-Wert gemessen und die TJ Proteine Occludin und Claudin 2 mittels IFA visualisiert. Weiterhin wurde untersucht, ob sich das Genexpressionsmuster der beiden Klone nach Kontakt zu den EC, sowie der EC nach Kontakt zu den beiden Klonen unterscheidet. Dazu wurden 10.000 A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten über 4 h und 8 h mit humanen SDM-Kulturen aus Kolon- und Dünndarmsphäroiden inkubiert. Eine Anzahl von 10.000 Trophozoiten wurde gewählt, um zu garantieren, dass ausreichend RNA für die Analyse des Parasitentranskriptoms zur Verfügung steht. Vor der Isolierung der RNA wurde der TEER gemessen, um einen Effekt der Trophozoiten auf die Barrierefunktion der Epithelzellschicht sicherzustellen.

## 4 Diskussion

### 4.3.1 Effekt von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten auf die Barrierefunktion intestinaler Epithelzellen

Für *E. histolytica* Trophozoiten des HM-1:IMSS Isolats wurde in mehreren Studien gezeigt, dass sie innerhalb weniger Minuten zu einer Reduktion des TEERs verschiedener Zelllinien wie Caco-, MDCK- oder T84-Zellen auf nahezu 0 % des Startwertes führen<sup>234; 235; 236; 237</sup>. Im Vergleich zu intestinalen Parasiten wie *G. intestinalis* oder *Toxoplasma gondii* führt *E. histolytica* zu einer schnelleren Reduktion des TEER, möglicherweise zurückzuführen auf unterschiedliche Mechanismen der Barriere Degradierung<sup>212</sup>. Vorangegangene Co-Inkubationen humaner SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden mit 10.000, 5.000 und 1.000 *E. histolytica* A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten zeigten, dass beide Klone die Epithelzellschicht in ähnlicher Weise schädigen und kein Unterschied im Verlauf des TEER-Wertes bestimmbar war<sup>180</sup>. Die Abnahme des TEER war abhängig von der Inkubationszeit und der eingesetzten Trophozoitenanzahl, wobei die stärkste Abnahme in den ersten Stunden der Co-Inkubation zu beobachten war<sup>180</sup>. Um die ersten Stunden der Co-Inkubation zu entzerren, wurde die Trophozoitenzahl auf 250 und 500 reduziert, da Unterschiede zwischen dem A1<sup>np</sup> und dem B2<sup>p</sup> Klon möglicherweise in der frühen Phase der Invasion liegen.

Wurden humane SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden mit einer Anzahl von 250 und 500 Trophozoiten co-inkubiert, war ein Unterschied des Effekts auf den TEER zwischen dem A1<sup>np</sup> und dem B2<sup>p</sup> Klon erkennbar. Bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten sank der TEER bereits nach 2 h Co-Inkubation, wohingegen dieser Effekt bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten erst nach 8 h auftrat. Dieses Phänomen wurde in mehreren Studien beschrieben, in denen pathogene und nicht-pathogene *E. histolytica* Trophozoiten einen unterschiedlichen Effekt auf die Barrierefunktion verschiedener Epithelzelllinien hatten. Trophozoiten des pathogenen *E. histolytica* HM-1:IMSS Isolats führten dabei zu einer rapiden Reduktion des TEER bei Caco-, MDCK- und T84-Zellen, wohingegen Trophozoiten des nicht-pathogenen *E. histolytica* Isolats HK9 und der nicht-pathogenen *Entamoeba* Spezies *E. moshkovskii* die Barrierefunktion der Zellen nicht beeinträchtigten<sup>235; 236; 237</sup>. Nach 24 h erreichte der TEER bei beiden Klonen ein ähnliches Niveau und auch mikroskopisch waren nach 24 h Inkubation keine Unterschiede detektierbar. Bei beiden Klonen waren zellfreie Bereiche zu erkennen, womöglich hervorgerufen durch Induktion der kontaktabhängigen Apoptose und anschließender Phagozytose der Zellen oder dem Ablösen der Zellen als Folge der Degradierung der ECM durch die Trophozoiten<sup>100; 114; 115; 116; 118</sup>. Die Ergebnisse stützen die Theorie, dass Unterschiede im Invasionsverhalten der beiden Klone in der frühen Phase der Co-Inkubation zu finden sind.

Die Co-Inkubation humaner SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden mit 250 und 500 A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten führte bei keinem der beiden Klone zu einer Reduktion des TEER-Wertes. Innerhalb von 24 h stieg der TEER, stärker nach Co-Inkubation mit Trophozoiten im Vergleich zur Kontrolle. Passend dazu wurde mikroskopisch in keiner der SDM-Kulturen eine Schädigung der Epithelzellschicht gefun-

#### 4 Diskussion

den. Die Co-Inkubationen der Kolon- und der Dünndarmzellen mit 10.000 Trophozoiten für die Transkriptomanalyse wurden simultan mit den gleichen Parasiten durchgeführt, wobei in beiden Fällen der TEER abnahm, sodass tote Trophozoiten als Grund für den steigenden TEER ausgeschlossen werden können. Für *G. intestinalis* Trophozoiten wurde ein Anstieg des TEER nach Co-Inkubation mit intestinalen EC beobachtet und auf die Adhärenz der Trophozoiten an die Zellen zurückgeführt<sup>238</sup>. Kraft *et al.* (2017) berichten ebenso von einem Anstieg des TEER-Wertes nach Inkubation von Caco-Zellen mit lebenden *G. intestinalis* Trophozoiten sowie nach Inkubation mit dem Überstand aus Co-Inkubationsexperimenten und führten den Anstieg auf von Trophozoiten sezernierte Produkte zurück<sup>233</sup>. Ein Anstieg des TEER wurde für die frühe Phase der Co-Inkubation von Caco-Zellen mit pathogenen *Escherichia coli* beschrieben und als Folge einer möglichen verstärkten Expression des TJ Proteins ZO-1 und der Adhäsion der Bakterien an die Zellen interpretiert<sup>239</sup>.

Die Co-Inkubation der EC mit einer Anzahl von 10.000 Trophozoiten für die Transkriptomanalyse führte zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion von Kolon- und Dünndarm-SDM-Kulturen, wobei eine effektivere Schädigung der Kolonepithelzellen (KEC) zu beobachten war. Beide Klone führten innerhalb von 8 h zu einer Reduktion des TEER auf nahezu 0 % bei Kolonepithelzellen und auf 27 % bei Dünndarmepithelzellen (DEC).

Die Ergebnisse der TEER-Messungen zeigen, dass es Unterschiede in der Interaktion der Trophozoiten mit KEC und DEC gibt und dass für die Degradierung von DEC im Vergleich zu KEC eine höhere Anzahl an Trophozoiten nötig ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte ein unterschiedlicher Grad der Glykolysierung der DEC- und KEC-Oberfläche sein. Im Membranproteom isolierter EC humaner Kolonbiopsien nahm der Anteil glykolysierter Proteine von proximal zu distal ab<sup>240</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Abundanz verschiedener O-Glykane zwischen den Abschnitten des humanen Intestinaltrakts unterscheidet und die Expression von GalNAc durch intestinale EC vom Magen in Richtung Rektum zunimmt<sup>241</sup>. In Bindungstests wurde gezeigt, dass das Adhärenzmolekül Gal/GalNAc Lektin von *E. histolytica* mit höherer Affinität an GalNAc bindet als an Gal<sup>242</sup>. Eine niedrigere Abundanz von GalNAc auf der Oberfläche von DEC im Vergleich zu KEC könnte bewirken, dass Trophozoiten schlechter an DEC adhäreren. Die kontaktabhängige Induktion der Apoptose sowie Prozesse wie die Phagozytose und die Trogozytose von Wirtszellen sind durch eine verminderte Adhärenz der Trophozoiten beeinträchtigt. *E. histolytica* Trophozoiten sind gegebenenfalls, neben der Anpassung des Gal/GalNAc Lektins, auch hinsichtlich weiterer Faktoren besser an eine Invasion des Kolonepithels angepasst und reagieren spezifischer auf KEC als auf DEC. Eine Manifestation der intestinalen Amöbiasis im Dünndarm tritt selten auf und betrifft in der Regel den distalen Teil des Ileums<sup>67; 243</sup>. Das distale Ileum ist der Ort der Exzystation und damit der erste Teil des Darms, der mit *E. histolytica* Trophozoiten in Kontakt kommt. Folglich haben Trophozoiten *in vivo* keinen Kontakt zu Zellen des Duodenums, aus denen die Dünndarm-SDM-Kulturen bestehen. Weiterhin könnte die

#### 4 Diskussion

unterschiedliche Zusammensetzung der SDM-Kulturen hinsichtlich präsenter Zelltypen den Unterschied in der Reaktion auf DEC und KEC erklären. AMP-produzierende Paneth Zellen sind im Dünndarm-SDM-Modell präsent, während sie im Kolon-SDM-Modell fehlen.

B2<sup>P</sup> Trophozoiten durchbrechen die Barriere der KEC effizienter als A1<sup>NP</sup> Trophozoiten, während hinsichtlich der DEC kein Unterschied zwischen den Klonen festzustellen war. SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden weisen eine höhere transepitheliale Durchlässigkeit auf als SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden, was sich durch die höheren TEER-Werte der Kolonepithelzellschicht verglichen mit denen der Dünndarmepithelzellschicht zeigt. Kolonozyten weisen im Vergleich zu Enterozyten eine höhere Dichte an TJ auf, was auf ihre verschiedenen Funktionen im Organismus zurückzuführen ist<sup>231; 232</sup>. Enterozyten sind für die Absorption von Nährstoffen verantwortlich, was eine gewisse transepitheliale Durchlässigkeit erfordert<sup>6; 7</sup>. Kolonozyten hingegen sind für die Rückresorption von Wasser und Elektrolyten zuständig und beherbergen eine große Population intestinaler Mikroorganismen, gegen die sie eine zuverlässige Barriere bilden müssen<sup>6; 7</sup>. B2<sup>P</sup> Trophozoiten haben im Vergleich zu A1<sup>NP</sup> Trophozoiten eine zehnfach höhere Cysteinpeptidase (CP)-Aktivität<sup>152</sup>. Insbesondere die EhCP-A5 ist maßgeblich an der intestinalen Invasion, unter anderem durch Degradierung der schützenden Mukusschicht und der TJ Proteine der EC, beteiligt<sup>102; 105; 106</sup>. Wird das *ehcp-a5* in Trophozoiten des HM-1:IMSS Isolats überexprimiert, erhöht das die Aktivität der EhCP-A5, aber auch die der EhCP-A1 und EhCP-A2, und führt zu einer signifikant höheren zytopathischen Aktivität gegenüber *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen<sup>244</sup>. Wird die CP-Aktivität inhibiert, führt das bei B2<sup>P</sup>, nicht aber bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten, zu einer verminderten Fähigkeit den TEER humaner SDM-Kulturen aus Dünndarmsphäroiden zu reduzieren<sup>180</sup>. Aufgrund der höheren CP-Aktivität in B2<sup>P</sup> Trophozoiten im Vergleich zu A1<sup>NP</sup> Trophozoiten hat eine Inhibierung der CP-Aktivität größere Auswirkungen auf das invasive Verhalten von B2<sup>P</sup> Trophozoiten<sup>152</sup>. Es ist wahrscheinlich, dass B2<sup>P</sup> Trophozoiten aufgrund ihrer höheren CP-Aktivität die TJ der KEC effektiver degradieren als A1<sup>NP</sup> Trophozoiten, wobei die Regulierung der CP-Gene nach Kontakt zu intestinalen EC eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Durch die höhere Abundanz an TJ macht sich die hohe CP-Aktivität bei KEC möglicherweise stärker bemerkbar als bei DEC. Neben der gesteigerten CP-Aktivität könnte die erhöhte Motilität des B2<sup>P</sup> Klon zusätzlich zu der effizienteren und schnelleren Degradierung der Epithelzellbarriere verglichen mit dem A1<sup>NP</sup> Klon beitragen<sup>152</sup>. Nach Kontakt zu intestinalen EC regulierten B2<sup>P</sup>-Trophozoiten, nicht aber A1<sup>NP</sup> Trophozoiten, mehrere Gene assoziiert mit der Beweglichkeit hoch. Die Beweglichkeit wurde nicht nur für *E. histolytica* Trophozoiten, sondern auch für andere Parasiten wie *Trypanosoma brucei* oder *Toxoplasma gondii*, als wesentlicher Pathogenitätsfaktor beschrieben<sup>152; 245; 246; 247</sup>.

## 4 Diskussion

### 4.3.2 Effekt auf das Transkriptom humaner Kolonepithelzellen nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten

Im nächsten Schritt wurde das Genexpressionsmuster humaner KEC nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten untersucht, um mögliche Klon-spezifische Unterschiede zu identifizieren. Die hohe Anzahl spezifisch in einer Bedingung regulierter Gene sowie die Ergebnisse der PCA induzieren, dass KEC unterschiedlich auf den Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten reagieren. B2<sup>p</sup> Trophozoiten bewirkten dazu passend eine effektivere Degradierung der Epithelzellbarriere im Vergleich zu A1<sup>np</sup> Trophozoiten. KEC reagierten schneller auf den Kontakt zu A1<sup>np</sup> Trophozoiten als auf den Kontakt zu B2<sup>p</sup> Trophozoiten und exprimierten nach 4 h Co-Inkubation verstärkt Gene wie *cytochrome C oxidase assembly factor (COX)14*, *COX5B*, *NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit (NDUFB)1* und *ubiquinol-cytochrome C reductase, complex III subunit (UQCR)11*, die an der oxidativen Phosphorylierung und dem Metabolismus beteiligt sind. Ähnliche Prozesse waren im Kolongewebe von Patienten mit remitrierender chronisch-entzündlicher Darmerkrankung (CED) aktiviert und werden mit der Regenerierung von entzündetem Gewebe assoziiert<sup>248</sup>. Im Zuge der oxidativen Phosphorylierung wird Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert, das zur Deckung des hohen Energiebedarfs für die Reparatur und Neubildung von Zellen nach einer Gewebeschädigung genutzt werden kann<sup>249</sup>. Der Kontakt zu dem kommensalen Darmbakterium *Lactobacillus gasseri* führte *in vivo* bei Ferkeln und *in vitro* bei IPEC-J2-Zellen zur erhöhten Synthese von Proteinen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind<sup>250</sup>.

Hochregulierte Gene waren nach Kontakt der EC zu B2<sup>p</sup> Trophozoiten an mehreren Signalwegen wie dem IL-17-, MAPK-, *epidermal growth factor receptor B (ErB)-*, PI3K- oder TLR-Signalweg nach 4 h Co-Inkubation und dem IL-17-, TNF-, MAPK-, NF- $\kappa$ B- oder *NOD-like receptor* Signalweg sowie Zytokin-Zytokin-Rezeptor Interaktionen nach 8 h Co-Inkubation beteiligt. Der Kontakt zu B2<sup>p</sup> Trophozoiten rief insbesondere ein Genexpressionsmuster hervor, das dem von Patienten mit aktiver CED ähnelt und durch hochregulierte Gene beteiligt an der Aktivierung der Neutrophilen-vermittelten Immunität oder der Organisation der ECM gekennzeichnet ist<sup>248</sup>. Dabei sollte erwähnt werden, dass die Signalwege ErbB, MAPK und PI3K sowohl an der Regulierung der Immunantwort und der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Epithelzellschicht als auch an der Regeneration des Epithels durch Aktivierung der Zellproliferation und -migration beteiligt sein können<sup>251; 252; 253</sup>. *CXCL8* und *IL1B* gehören zu den hochregulierten Genen nach 8 h Co-Inkubation mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten und waren nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> Trophozoiten nicht hochreguliert. Intestinale EC binden über TLR-2 und TLR-4 an die Kohlenhydraterkennungsdomäne des Gal/GalNAc Lektins der Trophozoiten, was die NF- $\kappa$ B-vermittelte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  einleitet<sup>120; 254; 255</sup>. Passend dazu waren Untereinheiten des *activator protein (AP)-1* Transkriptionsfaktors *Fos proto-oncogene (FOS)*, *FosB proto-oncogene (FOSB)*, *FOS-like 1 (FOSL1)*, *Jun proto-oncogene (JUN)* und *JunB proto-oncogene (JUNB)*, der zusammen mit NF- $\kappa$ B die Zytokinproduktion reguliert, B2<sup>p</sup>-spezifisch

#### 4 Diskussion

hochreguliert<sup>256</sup>. In mehreren Studien wurde die Freisetzung von IL-8, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , vermittelt durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B, nach Infektion mit pathogenen *E. histolytica* Trophozoiten durch intestinale EC mit einer starken Gewebeschädigung assoziiert<sup>120; 121; 257</sup>. Die Infektion mit der nicht-pathogenen Spezies *E. dispar* hingegen führte nicht zur verstärkten Freisetzung der genannten Chemo- und Zytokine<sup>120; 258</sup>. Insbesondere IL-8 wirkt chemoattraktiv auf Neutrophile, die durch die Freisetzung von ROS und NO erheblich zur Gewebeschädigung während einer *E. histolytica* Infektion beitragen<sup>121</sup>. Die wesentliche Rolle der Neutrophilen an der Gewebeschädigung während einer *E. histolytica* Infektion wurde *in vivo* anhand von humanen Xenotransplanten in SCID-Mäusen und *in vitro* anhand von HT-29 Zellen gezeigt<sup>121; 259</sup>. Andererseits wurde auch gezeigt, dass Neutrophile eine schützende Funktion haben können. Die Infektion teilweise resistenter Mausstämmen, deren Neutrophile inhibiert wurden, führte zu einer gesteigerten Anfälligkeit und einem schwereren Verlauf der Amöbiasis<sup>158</sup>. Die Aktivierung des Immunsystems kann den Wirt vor eindringenden Pathogenen schützen, wobei eine starke Immunantwort insbesondere im Kontext einer *E. histolytica* Infektion mit massiven Gewebeschädigungen assoziiert wird und die Invasion der Trophozoiten sogar begünstigen kann. Im Rahmen histologischer Studien wurde gezeigt, dass Trophozoiten durch Mikroschädigungen im intestinalen Epithel, vermutlich verursacht durch die Immunreaktion des Wirts, in die *Lamina propria* migrieren<sup>157; 260</sup>. *In vivo* führte die Inhibierung der p65 Untereinheit des NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktors zur reduzierten Freisetzung von IL-8 und IL-1 $\beta$ , was die Gewebeschäden und den Einstrom von Neutrophilen verringerte sowie die Barrierefunktion der Epithelzellschicht aufrecht erhielt<sup>121; 122</sup>. KEC wiesen nach 8 h Inkubation eine klon-unabhängig erhöhte Expression von *IL33* auf, dessen Rolle in Verbindung mit einer *E. histolytica* Infektion als schützend beschrieben wurde<sup>261</sup>. Werden Mäuse mit rekombinantem IL-33 behandelt, sind sie vor intestinalen Gewebeschäden geschützt, wohingegen die Blockierung der IL-33 Signalkaskade zu einer erhöhten Empfänglichkeit für die Ausbildung einer invasiven Amöbiasis führt<sup>261</sup>. Das Verhältnis schützender und nicht-schützender Zytokine beeinflusst den Verlauf einer *E. histolytica* Infektion und beteiligte Gene sind nach Infektion mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> unterschiedlich reguliert<sup>262</sup>.

Zusammengefasst aktivieren B2<sup>p</sup> Trophozoiten Signalwege wie den NF- $\kappa$ B-Signalweg, die zu einer verstärkten Expression von pro-inflammatorischem *CXCL8*, *IL1B* und *IL6* führen, was mit der Rekrutierung von Immunzellen wie Neutrophilen und starken Gewebeschädigungen assoziiert wird und die Invasion der Trophozoiten in das intestinale Gewebe möglicherweise begünstigt<sup>263</sup>. A1<sup>np</sup> Trophozoiten hingegen lösen bei KEC die verstärkte Expression von Genen, beteiligt an der Regeneration von beschädigtem Gewebe aus. Der Kontakt zu beiden Klonen induzierte die Hochregulierung von schützendem *IL33*, während nur bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten zusätzlich eine Vielzahl pro-inflammatorisch wirkender Gene hochreguliert war. Eine starke Immunantwort des Wirts kann die Voraussetzung für eine Gewebeinvasion der Trophozoiten bilden, jedoch beeinflussen zusätzliche Wirts- und Parasiten-

## 4 Diskussion

abhängige Faktoren wie die Zusammensetzung des Mikrobioms oder der Genotyp des Wirts den Verlauf der Infektion.

Die Analyse des mRNA-Profiles liefert keine Informationen über posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen differenziell exprimierter Gene. Insbesondere die Chemo- und Zytokine IL-8, IL-1- $\beta$ , IL-6 und IL-33 sollten in den Überständen der Co-Inkubationsexperimente quantifiziert werden, um Informationen über tatsächlich synthetisierte Genprodukte zu erhalten. Die apikalen und basalen Überstände aller Co-Inkubationsexperimente liegen vor.

### 4.3.3 Effekt auf das Transkriptom humaner Dünndarmepithelzellen nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten

DEC reagieren in ähnlicher Weise auf den Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten. Der Großteil der DEG ist bei beiden Klonen nach 8 h Co-Inkubation verändert. Zu beiden Zeitpunkten sind hochregulierte Gene in Signalwege wie den TNF-, IL-17- und NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie in die Apoptose unabhängig vom Klon involviert. *CXCL8*, *IL1B* und *IL33* waren nach Kontakt zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten hochreguliert. Beide Klone lösen eine Reaktion bei DEC aus, die der Reaktion der KEC nach Kontakt zu B2<sup>p</sup> Trophozoiten ähnelt. Passend zu den Ergebnissen der Transkriptomanalyse waren auch hinsichtlich der Fähigkeit zur Degradierung der Barrierefunktion der DEC keine Unterschiede zwischen den Klonen detektierbar.

Es wurde gezeigt, dass verschiedene intestinale Krebszelllinien aus Kolongewebe hinsichtlich der *CXCL8*-Expression und -Sekretion unterschiedlich auf eine *E. histolytica* Infektion reagieren<sup>119; 123</sup>. Wie auch die verwendeten SDM-Kulturen aus Kolon- und Dünndarmgewebe stammen die Krebszelllinien von unterschiedlichen Spendern, wobei jede Zelllinie den genetischen Hintergrund je eines Spenders repräsentiert. Spender-spezifische Faktoren können ebenso eine Ursache für das unterschiedliche Ergebnis der *E. histolytica* Infektion zwischen DEC und KEC sein, wie Gewebe-spezifische Faktoren. Beispielsweise sind Kinder, die einen Polymorphismus in dem Transkriptionsfaktor *cAMP response element modulator (CREM)* oder dem *leptin receptor (LEPR)* aufweisen, anfälliger für eine *E. histolytica* Infektion<sup>141</sup>. Mäuse mit einem Q223R *LEPR* Polymorphismus weisen eine stärkere Zerstörung der intestinalen Mukosa nach einer *E. histolytica* Infektion auf als Mäuse ohne diesen Polymorphismus. Alle Co-Inkubationsexperimente im Rahmen dieser Arbeit wurden mit intestinalen EC je eines Spenders pro Gewebe durchgeführt. Die Wiederholung der Co-Inkubationen mit Zellen weiterer Spender würde Aufschluss über den Einfluss Donor-spezifischer Faktoren geben.

Humane EC des Dünndarms weisen eine höhere Expression von TLR1-9 verglichen mit EC des Dickdarms auf, was zu einer stärkeren Reaktion auf eindringende Pathogene führen könnte<sup>264</sup>. Werden Schweine mit *Salmonella typhimurium* infiziert, zeigt sich eine starke Variation in der Regulierung immunmodulatorischer Gene zwischen verschiedenen Abschnitten des Intestinaltrakts. EC des

## 4 Diskussion

Dünndarms regulieren eine höhere Anzahl an Zytokin-kodierenden Genen hoch und zeigen eine schnellere Reaktion auf den Kontakt zu *Salmonella typhimurium* verglichen mit EC des Dickdarms<sup>265</sup>. Möglicherweise reagieren DEC schneller und/oder stärker auf *E. histolytica* Trophozoiten als KEC. In DEC war eine höhere Anzahl an Genen differentiell reguliert im Vergleich zu KEC, was einen weiteren Anhaltspunkt für eine stärkere Reaktion dieser Zellen auf die Trophozoiten darstellt. Dabei sollte allerdings angemerkt werden, dass die DEC- und KEC-Proben nicht gleichzeitig sequenziert wurden, was ebenso einen Einfluss auf die Anzahl regulierter Gene haben kann. Weiterhin könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der SDM-Kulturen hinsichtlich präsenter Zelltypen wie beispielsweise der Paneth Zellen den Unterschied in der Reaktion der DEC und KEC auf die Trophozoiten erklären. Inwieweit verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf eine *E. histolytica* Trophozoiten reagieren, könnte mittels *single-cell sequencing* untersucht werden.

### 4.3.4 Effekt auf das Transkriptom von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu Kolonepithelzellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich das Genexpressionsmuster der beiden *E. histolytica* Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Kontakt zu humanen KEC unterscheidet. Dazu wurden 10.000 Trophozoiten über 4 h und 8 h mit humanen SDM-Kulturen aus Kolonsphäroiden inkubiert.

Die gefundenen Unterschiede im TEER zwischen den Klonen finden sich auch in den Transkriptomen der Parasiten wieder. Der B2<sup>p</sup> Klon reagiert gemessen an der Anzahl an DEGs stärker auf den Kontakt zu den EC als der A1<sup>np</sup> Klon, wobei das nach 4 h herunterregulierte Gene betrifft und nach 8 h hoch- und herunterregulierte Gene. Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen den Klonen sind auch ohne Inkubation mit EC in der PCA erkennbar, werden aber mit zunehmender Inkubationszeit stärker. Das und die hohe Anzahl Klon-spezifisch regulierter Gene induziert, dass A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Trophozoiten unterschiedlich auf den Kontakt zu intestinalen EC reagieren.

Bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten waren hochregulierte Gene nach 4 h und 8 h Co-Inkubation vor allem in Prozessen des Proteinstoffwechsels involviert. Bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten waren nach 4 h Co-Inkubation hochregulierte Gene in Prozessen des Lipidmetabolismus involviert und nach 8 h in Prozesse, assoziiert mit oxidativem Stress. Die Aktivierung des Lipidmetabolismus unter aeroben Bedingungen sowie die erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress wurden bereits als wichtige Faktoren der Pathogenität beschrieben<sup>101; 266; 267; 268</sup>. So wurde gezeigt, dass pathogene Trophozoiten weniger anfällig gegenüber ROS sind<sup>269; 270</sup>. Das nicht-pathogene *E. histolytica* Rahman Isolat weist verglichen mit dem pathogenen HM-1:IMSS Isolat eine geringere Expression von antioxidativen Enzymen wie Peroxiredoxin auf<sup>170; 271</sup>. Werden Peroxiredoxine im Rahman Isolat überexprimiert, erhöht es die Toleranz gegenüber oxidativem Stress und führte zu einem erhöhten inflammatorischen Phänotyp im SCID hu-int Mausmodell<sup>130</sup>. Der effektive Umgang mit oxidativem Stress ist essenziell für das Überleben der Tro-

#### 4 Diskussion

phozoiten während des intestinalen Invasionsprozesses. Während der Invasion müssen Trophozoiten intrazellulär hypoxische Bedingungen im sauerstoffhaltigen intestinalen Gewebe aufrechterhalten, während zusätzlich NO und ROS durch Neutrophile und Makrophagen freigesetzt werden<sup>267</sup>. Einer der negativen Effekte von oxidativem Stress ist die Hemmung der Glykolyse durch Inhibierung von Co-Faktoren beteiligter Enzyme<sup>267; 272</sup>. Die Glykolyse stellt aufgrund der Abwesenheit von Mitochondrien in *E. histolyca* die primäre Energiequelle dar, während der ATP aus Glukose gewonnen wird<sup>273</sup>. Die schnelle Umstellung des Stoffwechsels zur effektiven Energiegewinnung unter hypoxischen Bedingungen, ist ebenso ein wichtiger Faktor während der intestinalen Invasion pathogener Trophozoiten.

Passend zu den Ergebnissen der Analyse der KEGG-Stoffwechselwege waren ausschließlich bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten mehrere Gene wie *ehi\_150770*, *ehi\_064470* und *ehi\_133950*, die für *heat shock protein (HSP)70* kodieren, hochreguliert. HSP70 spielt eine wesentliche Rolle bei der Bildung von ALA im Hamstermodell<sup>274</sup>. HSP70 schützt Trophozoiten vor oxidativem und nitrosativem Stress durch Reparatur denaturierter Proteine und spielt somit eine essenzielle Rolle beim invasiven Prozess der Parasiten<sup>274</sup>. Hitze- sowie oxidativer Stress führt zu einer Überexpression der *hsp70* Gene<sup>275</sup>. Weber *et al.* (2016) beschreiben die Hochregulierung von Genen, beteiligt an der Reparatur beschädigter DNA bei aus ALA isolierten Trophozoiten des HM-1:IMSS Isolats nach *ex vivo* Kontakt zu humanen Kolonexplantaten<sup>276</sup>. Mehrere Gene assoziiert mit der Reparatur beschädigter DNA wie *ehi\_054240* (*DNA repair helicase*), *ehi\_088430* (*DNA repair helicase*), *ehi\_100400* (*DNA repair protein*) und *ehi\_129310* (*DNA repair/transcription protein Mms19*) wurden B2<sup>P</sup>-spezifisch hochreguliert. Durch oxidative Schädigung von DNA während der intestinalen Invasion sind DNA-Reparaturprozesse essenziell für das Überleben der Trophozoiten.

Die Bewegungsfähigkeit, Phagozytose und Adhärenz werden mit der Pathogenität von *E. histolytica* Trophozoiten assoziiert und durch Organisation des Aktin-reichen Cytoskeletts vermittelt<sup>277; 236</sup>. Dabei wurde vermutet, dass schnellere Trophozoiten Zellmonolayer effektiver zerstören können. Durch kontrollierte Polymerisation und Depolymerisation der Mikrofilamente des Cytoskeletts durch Aktin und Aktin-assoziierte Proteine wird eine gerichtete Änderung der Zellform ermöglicht<sup>278</sup>. In allen vier Vergleichen war das für Aktin 2 kodierende Gen *ehi\_161200* am stärksten hochreguliert, mit größeren Änderungen des FC bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten. Mit Ausnahme von *actobindin* (*ehi\_039020*), das in allen Bedingungen hochreguliert war, unterschieden sich die Expressionsmuster der mit dem Cytoskelett assoziierten Gene zwischen A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup>. *Ehi\_186840*, das für das *actin-binding protein, cofilin/tropomyosin-like* (EhABP16) kodiert, ist spezifisch bei B2<sup>P</sup> nach 4 h 3,5-fach hochreguliert. EhABP16 kontrolliert die Aktin-basierte Bewegung durch schnellen Umsatz von globulärem Aktin in F-Aktin. Wird das Gen in *Dictyostelium (D.) discoideum* überexprimiert, stimuliert das die Bewegung<sup>279</sup>. Ein *knockdown* von Cofilin bei metastasierenden Krebszellen wiederum bewirkt eine Einschränkung

#### 4 Diskussion

der Beweglichkeit und der gerichteten Bewegungsfähigkeit<sup>280</sup>. Wird *ehi\_192520*, das bei A1<sup>np</sup> nach Kontakt zu Kolonzellen herunterreguliert ist, bei *E. histolytica* Trophozoiten des Isolats HM-1:IMSS überexprimiert, führt das zu einer Hochregulierung von *ehi\_186840* (EhABP16) und zur gesteigerten Migration und Zerstörung von *monolayern* aus Caco-Zellen<sup>277</sup>. Das Gen für Villidin (*ehi\_150430*), das an der Phagozytose beteiligt ist, ist ausschließlich bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation hochreguliert<sup>281</sup>. Das Gen *ehi\_110180* ist in A1<sup>np</sup> Trophozoiten herunterreguliert und kodiert für Myosin, das mit der Virulenz von *E. histolytica* assoziiert wird und am *capping* von Oberflächenrezeptoren von z.B. Immunzellen beteiligt ist<sup>282</sup>. Wird Myosin bei *E. histolytica* inhibiert, führt das zu stark verminderter Zytotoxizität gegenüber Caco-Zellen<sup>282</sup>. Im Rahmen einer vergleichenden Proteomstudie wurde gezeigt, dass es Unterschiede zwischen Zelllinie A und Zelllinie B gibt, wobei vor allem Proteine involviert in der Organisation des Cytoskeletts differenziell synthetisiert wurden<sup>147</sup>.

Mehrere *in vivo* und *in vitro* Studien beschreiben CP als wesentliche Pathogenitätsfaktoren, weswegen das Expressionsmuster der CP-Gene genauer untersucht wurde<sup>283; 284; 285</sup>. Unter axenischen Kulturbedingungen sind nur die *ehcp-a1*, *ehcp-a2*, *ehcp-a5* und *ehcp-a7* in größeren Mengen exprimiert und die jeweiligen Genprodukte machen über 90 % der CP-Aktivität der Trophozoiten aus<sup>286</sup>. Das generelle Expressionsmuster der CP-Gene nach Kontakt der Trophozoiten zu den Kolonepithelzellen unterscheidet sich zwischen dem A1<sup>np</sup> und dem B2<sup>p</sup> Klon kaum. Die beiden Homologe der *ehcp-a7* waren Klon- und Inkubationszeit-unabhängig auf einem ähnlich hohen Niveau exprimiert. Dabei sollte erwähnt werden, dass B2<sup>p</sup> Trophozoiten insbesondere das Gen *ehi\_039610* unter Kontrollbedingungen stärker exprimieren als A1<sup>np</sup> Trophozoiten. Eine erhöhte Expression von *ehcp-a7* wurde ebenso bei *E. histolytica* Trophozoiten des nicht-pathogenen Rahman Isolats und des pathogenen HM-1:IMSS Isolats nach Kontakt zu humanen Kolon-Explantaten nachgewiesen und als Reaktion der Trophozoiten auf den Kontakt zu Mukus beschrieben<sup>101</sup>. B2<sup>p</sup> Trophozoiten exprimieren das *ehcp-a1* unter Kontrollbedingungen stärker als A1<sup>np</sup> Trophozoiten. Nach Kontakt zu Kolonepithelzellen änderte sich die Expression von *ehcp-a1* bei A1<sup>np</sup> Trophozoiten kaum, während sie bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten herunterreguliert war und sich dem Expressionslevel der A1<sup>np</sup> Trophozoiten nähert. Tillack *et al.* zeigten, dass eine Überexpression von *ehcp-a1* keinen Effekt auf die zytopathische Aktivität von *E. histolytica* Trophozoiten hat, was eine untergeordnete Rolle der *ehcp-a1* während der intestinalen Invasion suggeriert<sup>244</sup>. Ausschließlich bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten waren CP-Gene herunterreguliert, wobei *ehcp-a10* unabhängig von der Inkubationszeit reguliert war. Die Gene *ehcp-a11*, *ehcp-a8* und *ehcp-a1* waren spezifisch nach 4 h und die Gene *ehcp-a4* und *ehcp-a6* spezifisch nach 8 h bei B2<sup>p</sup> Trophozoiten herunterreguliert. Im Gegensatz dazu waren im CBA/J Mausmodell der Amöbenkolitis *ehcp-a1*, *ehcp-a4* und *ehcp-a6* hoch- und nur *ehcp-a8* herunterreguliert<sup>266</sup>. He *et al.* (2010) berichten ebenso eine Hochregulierung von *ehcp-a4* als Folge des Kontakts der Trophozoiten zu Mukus-produzierenden intestinalen Zellen<sup>287</sup>. Wurde die Mukus-Produktion der Zellen stimuliert, verstärkte das die Expressi-

## 4 Diskussion

on von *ehcp-a4*, was eine Mukus-vermittelte *ehcp-a4* Expression induziert. EhCP-A4 ist in Phagosomen lokalisiert und könnte eine Rolle in der Verdauung von Komponenten des Mukus, das im verwendeten SDM-Modell fehlt, während der intestinalen Invasion spielen<sup>288</sup>. Die Expression von *ehcp-a5*, die eine zentrale Rolle bei der intestinalen Invasion spielt, war in keiner der vier Bedingungen reguliert. Vermutlich trägt weniger die Regulierung spezifischer CP-Gene, als vielmehr die höhere CP-Aktivität bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten zur effizienteren Degradierung der epithelialen Barriere bei. Aufgrund des Fehlens einer Mukusschicht im verwendeten SDM-Modell weist das Expressionsmuster Unterschiede zur Literatur auf, was die wesentliche Rolle des Mukus während des Invasionsprozesses unterstreicht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der meisten Studien sind Amylase-Gene in beiden Klonen nicht hoch- sondern herunterreguliert. Die verstärkte Expression von Genen, insbesondere von Amylase-Genen, die im Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind, ist eine Folge der Verstoffwechslung der Kohlenhydratketten von glykolisierten Mukusproteinen<sup>101</sup>. Mukus, der während der intestinalen Invasion eine zentrale Rolle spielt und die Aktivierung spezifischer Stoffwechselwege in den Trophozoiten auslöst, ist im *ex vivo* und *in vivo* System präsent, während es im verwendeten SDM-Modell fehlt<sup>101</sup>. Möglicherweise unterscheiden sich A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Mukusschicht zu durchdringen und Mukus als Kohlenhydratquelle zu nutzen. Thibeaux *et al.* (2013) zeigten, dass nicht-pathogene *E. histolytica* Trophozoiten des Rahman Isolats die Mukusschicht eines humanen *ex vivo* Kolontexplantats nicht penetrierten, wohingegen pathogene Trophozoiten des HM-1:IMSS Isolats die Mukusschicht innerhalb von 7 h durchdrangen<sup>101</sup>. Die Untersuchung der Beteiligung des Mukus würde zusätzliche Informationen zum Invasionsverhalten des A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> *E. histolytica* Klons liefern. Die Entfernung des apikalen Mediums oder die Zugabe von DAPT oder DZB in das Kulturmedium der SDM-Kulturen stimuliert die Sezernierung von Mukus und könnte zukünftig als Modell für Untersuchungen über den Einfluss des Mukus auf das Invasionsverhalten von A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten verwendet werden.

### 4.3.5 Effekt auf das Transkriptom von A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu Dünndarmepithelzellen im Vergleich zu Kolonepithelzellen

A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten beeinflussen die Barrierefunktion der Dünndarmepithelzellschicht im Gegensatz zur Kolonepithelzellschicht in ähnlicher Weise. Nach 4 h Co-Inkubation sinkt der TEER bei beiden Klonen auf 36 % des Startwertes, was dem Wert der A1<sup>NP</sup> Trophozoiten nach 4 h Co-Inkubation mit KEC entspricht. In der PCA ist unter Kontroll- und Co-Inkubationsbedingungen ein klarer Unterschied im Genexpressionsmuster zwischen A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> Trophozoiten zu erkennen, der unabhängig von der Inkubationszeit ist. Bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten ist insbesondere nach 4 h Inkubation eine höhere Anzahl DEGs reguliert im Vergleich zu A1<sup>NP</sup> Trophozoiten, wobei der Großteil der Gene

#### 4 Diskussion

Klon- und Zeit-spezifisch reguliert ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der TEER-Messung deutet das auf eine Klon-spezifische Reaktion auf den Kontakt zu DEC hin.

Der Kontakt der Trophozoiten zu DEC führt zu einer Beteiligung regulierter Gene in ähnlichen Prozessen wie nach Kontakt zu KEC. B2<sup>P</sup> Trophozoiten reagierten auf den Kontakt zu DEC zunächst durch Hochregulierung von Genen involviert in den Lipidmetabolismus und nach 8 h durch verstärkte Expression von Genen involviert in der Reaktion auf oxidativen Stress. A1<sup>NP</sup> Trophozoiten hingegen reagierten mit der Hochregulierung von Genen involviert in den Proteinmetabolismus.

Ähnlich wie nach Kontakt zu KEC waren Cytoskelett-assoziierte Gene B2<sup>P</sup>-spezifisch hochreguliert. Auch Gene, die für HSP70 kodieren, waren ausschließlich bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten hochreguliert, allerdings erst nach 8 h Co-Inkubation und damit später verglichen mit KEC. Gene, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, waren in keiner der Bedingungen hochreguliert.

Die Expression der CP-Gene zwischen KEC und DEC ist mit Ausnahme der Expression von *ehcp-a1* ähnlich. *Ehcp-a1* war nach Kontakt zu DEC bei A1<sup>NP</sup>-Trophozoiten hochreguliert, während es bei B2<sup>P</sup>-Trophozoiten nach Kontakt zu KEC herunterreguliert war. Generell waren bei beiden Geweben der Großteil der CP-Gene bei B2<sup>P</sup>-Trophozoiten herunterreguliert, wohingegen CP-Gene bei A1<sup>NP</sup>-Trophozoiten eher hochreguliert wurden, möglicherweise aufgrund der Differenz in der CP-Aktivität zwischen den Klonen. Die verstärkte Expression von *ehcp-a7* nach Kontakt zu KEC und DEC bei beiden Klonen suggeriert eine Klon- und Gewebetyp-unabhängige Beteiligung der EhCP-A7 an der intestinalen Invasion.

Zusammengefasst passen sich B2<sup>P</sup> Trophozoiten schneller und spezifischer an die Bedingungen der Co-Inkubation insbesondere mit KEC an als A1<sup>NP</sup> Trophozoiten, was in den TEER-Werten sowie im Genexpressionsmuster zu erkennen ist. Dabei scheinen insbesondere die Bewegungsfähigkeit und der effiziente Umgang mit oxidativem Stress vorteilhaft bezüglich der Degradierung der Epithelzellschichten zu sein, wobei die Regulierung der CP-Gene eine eher untergeordnete Rolle spielt. Während hochregulierte Gene bei A1<sup>NP</sup> Trophozoiten hauptsächlich im Proteinmetabolismus involviert sind, änderten sich von hochregulierten Genen betroffene Prozesse bei B2<sup>P</sup> Trophozoiten von Lipidmetabolismus hin zur Antwort auf oxidativen Stress. In mehreren Studien wurde die Fähigkeit zur schnellen und gezielten Anpassung der Genexpression als Merkmal pathogener *E. histolytica* Trophozoiten beschrieben, sodass die effizientere Degradierung der Epithelzellbarriere durch B2<sup>P</sup> Trophozoiten darin begründet liegen könnte<sup>276</sup>.

## 4 Diskussion

Es wurden wenige Unterschiede in der Reaktion der Trophozoiten auf DEC und KEC gefunden. Aufgrund der hohen Anzahl differenziell exprimierter Gene, die für hypothetische Gene mit unbekannter Funktion kodieren, können mögliche Schlüsselgene und -signalwege, die den Unterschied zwischen DEC und KEC begründen würden, möglicherweise nicht identifiziert worden sein.

### 4.3.6 Fazit

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kolon-SDM-Modell bildet die Reaktion der intestinalen EC während der invasiven Amöbiasis auf mRNA-Ebene nach und zeigt, dass B2<sup>p</sup> Trophozoiten nicht nur hinsichtlich der ALA-Bildung im Mausmodell, sondern auch bezüglich ihres invasiven Verhaltens Merkmale eines pathogenen Phänotyps aufweisen<sup>151</sup>. A1<sup>np</sup> Trophozoiten degradieren die Epithelzellarbarriere ebenso wie B2<sup>p</sup> Trophozoiten, jedoch läuft der Prozess der Zerstörung langsamer ab. Ein ähnliches Muster wurde für die ALA-Bildung induziert durch A1<sup>np</sup> Trophozoiten im Mausmodell beschrieben. A1<sup>np</sup> Trophozoiten sind in der Lage ALA zu induzieren, jedoch sind die Läsionen im Vergleich zu denen der B2<sup>p</sup> Trophozoiten kleiner und heilen vollständig aus<sup>151</sup>. Das Kolon-SDM-Modell stellt ein geeignetes System für weitere Untersuchungen der Interaktion der *E. histolytica* Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> mit humanen intestinalen EC dar. DEC reagieren anders auf den A1<sup>np</sup> Klon als KEC, was die beiden SDM-Kulturen zusammen zu einem geeigneten Modell zur Untersuchung Gewebe- bzw. Wirtsspezifischer Faktoren macht, die einen Einfluss auf das invasive Verhalten der Trophozoiten haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass humane intestinale EC verschiedener Darmabschnitte unterschiedlich auf eine *E. histolytica* Infektion reagieren. Auf Seite der Parasiten scheint die schnelle Anpassung der Genexpression sowie die Bewegungsfähigkeit und die Toleranz gegenüber oxidativem Stress vorteilhaft für eine intestinale Invasion zu sein. Die Pathogenität bezogen auf die intestinale Invasion von *E. histolytica* Trophozoiten wird von einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Faktoren auf Wirts- und Parasitenseite bestimmt. Das verwendete SDM-Modell kann durch das Hinzufügen von Immunzellen, Mukus und Bakterien zur Nachbildung des Mikrobioms einfach erweitert werden, was es zu einem nützlichen Modell zur Untersuchung dieser Faktoren auf das invasive Verhalten der *E. histolytica* Trophozoiten macht.

5 Anhang  
5 Anhang

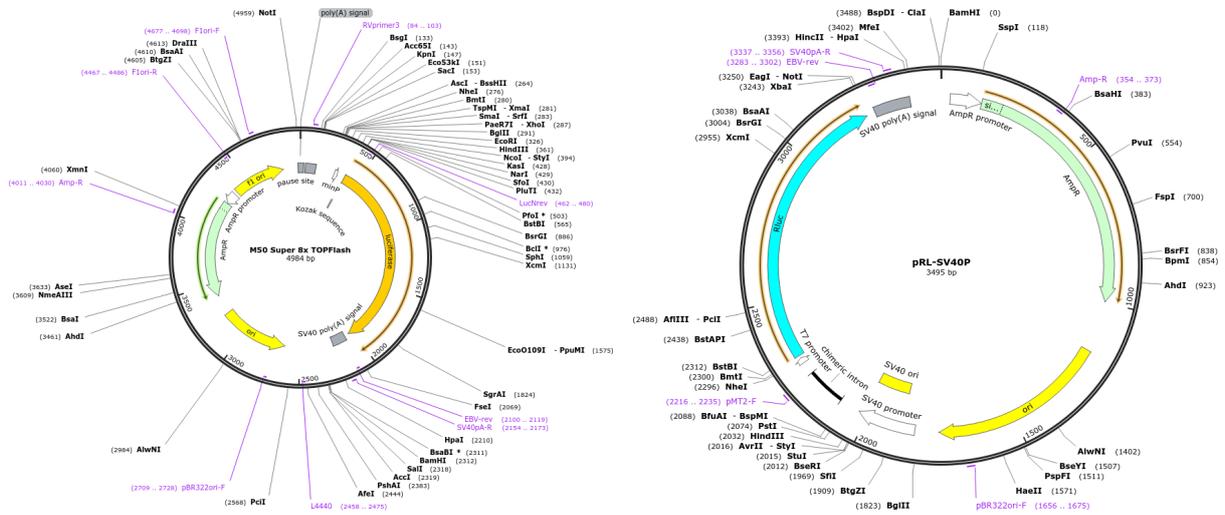


Abbildung A29: Übersichtskarten der Plasmide pRL-SV40P (A) und M50 Super 8x TOPFlash (B).

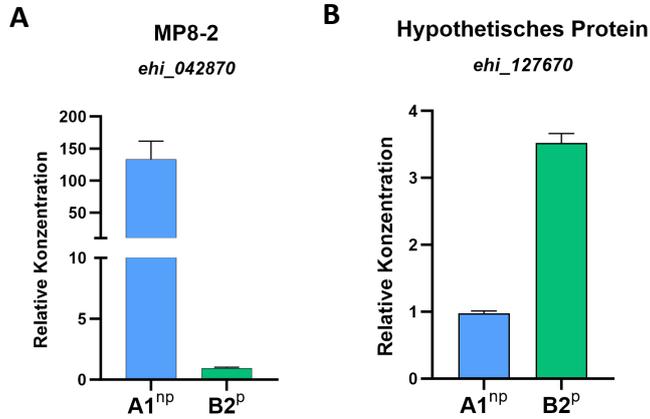
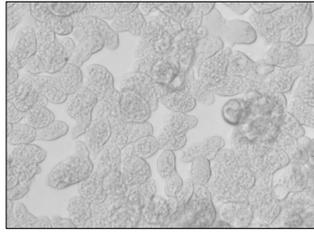


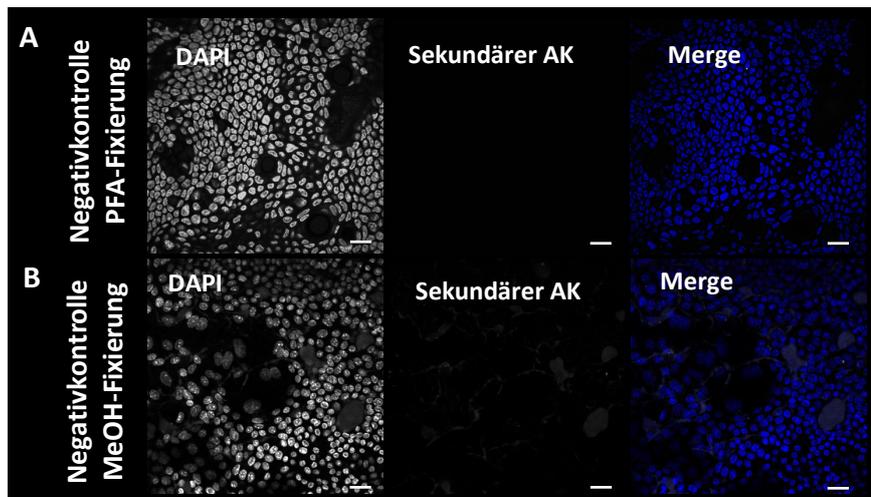
Abbildung A30: Relative mRNA-Konzentrationen der Markergene *ehi\_042870* und *ehi\_127670*. Gezeigt ist die relative mRNA-Konzentrationen der Markergene *ehi\_042870* (A) und *ehi\_127670* (B) in den *E. histolytica* Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, bestimmt mittels quantitativer *real-time* PCR. MP = Metallopeptidase.

## 5 Anhang



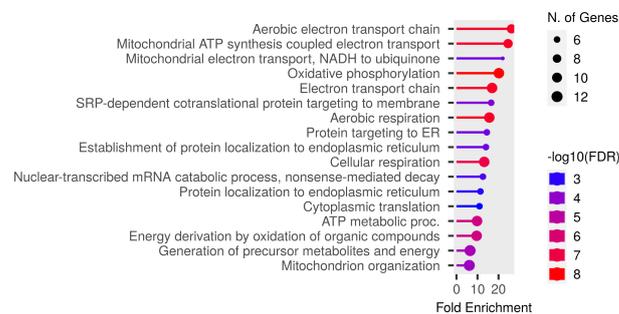
**Abbildung A31: Adhärenzte *E. histolytica* Trophozoiten nach 24 h unter aeroben Bedingungen.**

Gezeigt sind adhärenzte *E. histolytica* B2<sup>p</sup> Trophozoiten nach 24 h unter aeroben Bedingungen. Das Bild wurde am Fluoreszenzmikroskop *EVOS FL Auto* von Thermo Fisher Scientific, ausgestattet mit der *Evos FL Auto Imaging System* Software, aufgenommen. *Scale bar* = 10  $\mu$ M.



**Abbildung A32: Negativkontrollen immunofluoreszenzgefärbter humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden.**

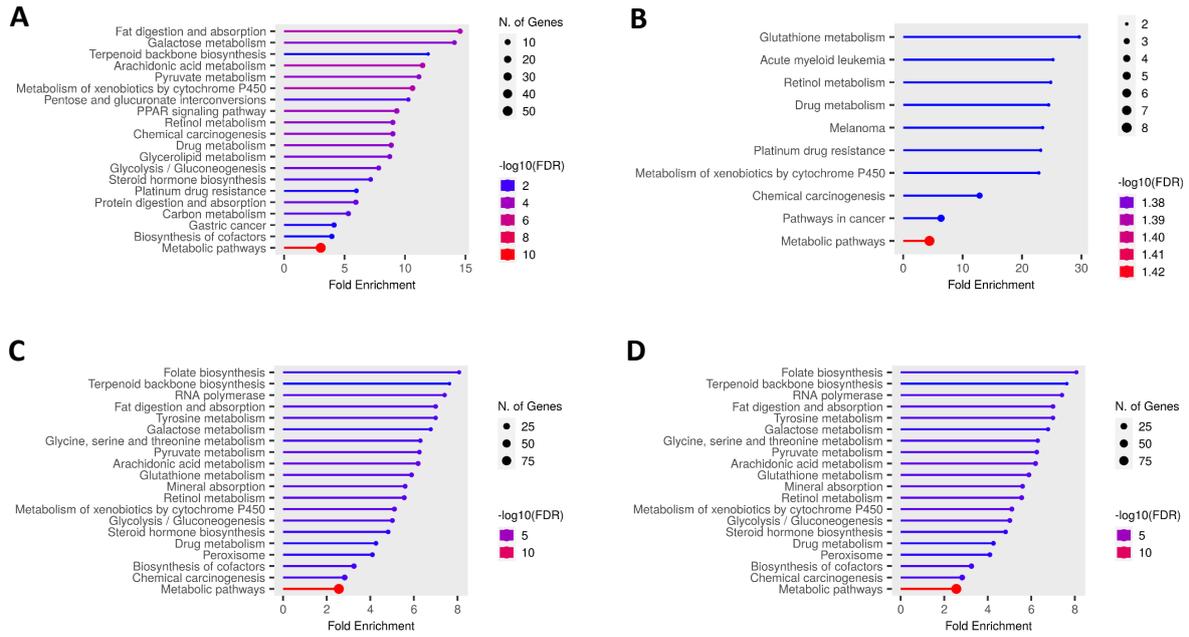
Negativkontrollen Paraformaldehyd- (PFA, A) und Methanol- (MeOH, B) fixierter humaner Epithelzellschichten aus Dünndarmsphäroiden (#SCC324). Die Proben wurden ohne primärem und mit sekundärem Antikörper (AK, Alexa Fluor 488) inkubiert. Alle Bilder wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop *FLUOVIEW FV3000* von Olympus, ausgestattet mit der *FV315-SW* Software, aufgenommen und mit *Fiji Version 2.15.1* bearbeitet. Nuclei wurden mit DAPI gefärbt und sind in blau dargestellt. *Scale bar* = 20  $\mu$ M.



**Abbildung A33: GO enrichment der Kategorie „Biologischer Prozess“ signifikant hochregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten über 4 h inkubierten Kolonepithelzellen.**

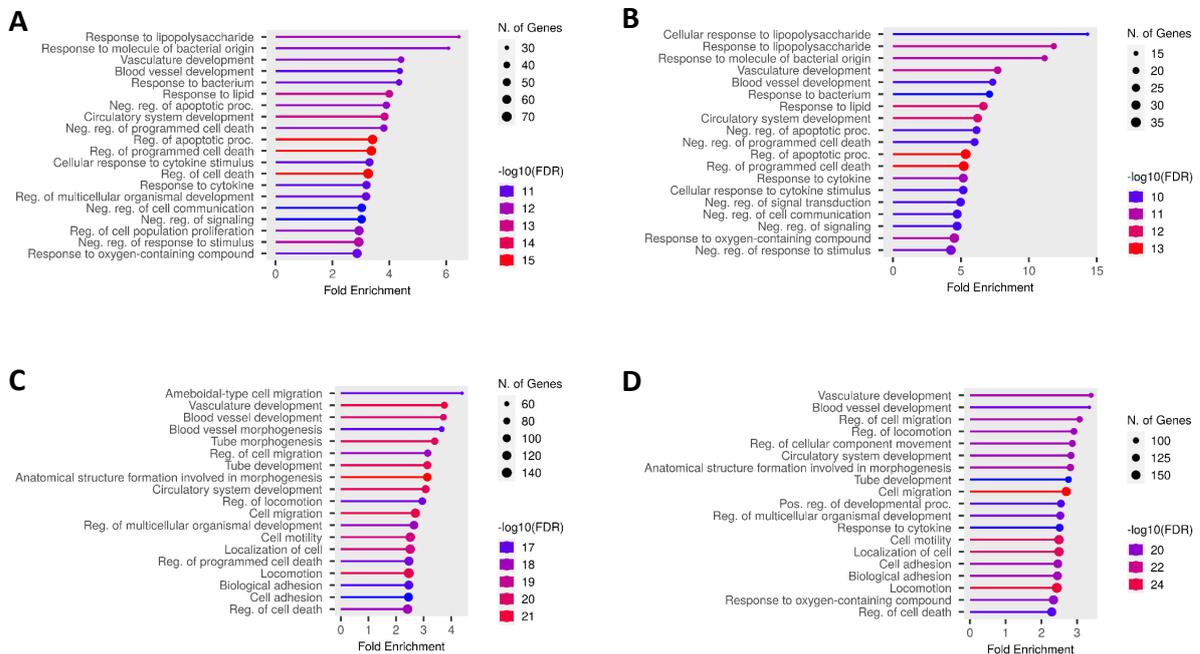
Gezeigt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR *p*-Wert  $\leq 0,05$ , dargestellt als  $-\log_{10}(\text{FDR})$ . Das *GO enrichment* wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.

5 Anhang



**Abbildung A34: KEGG-Stoffwechselwege signifikant herunterregulierter Gene bei Dünndarmepithelzellen.**

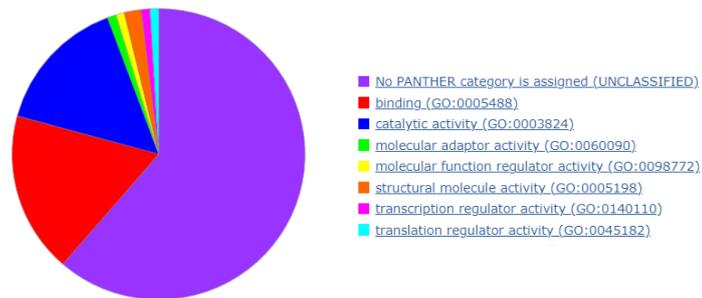
Ergebnisse der Analyse angereicherter KEGG-Stoffwechselwege signifikant herunterregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> (A, C) und B2<sup>p</sup> (B, D) Trophozoiten über 4 h (A, B) und 8 h (C, D) inkubierten Dünndarmepithelzellen im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR *p*-Wert ≤ 0,05, dargestellt als -log10(FDR). Die KEGG Stoffwechselweg Analyse wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.



**Abbildung A35: GO-terms signifikant hochregulierter Gene bei Dünndarmepithelzellen nach Kontakt zu *E. histolytica* Trophozoiten.**

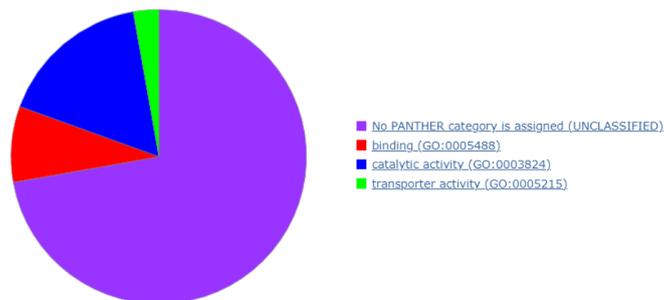
GO *enrichment* der Kategorie „Biologischer Prozess“ signifikant hochregulierter Gene bei mit A1<sup>np</sup> (A, C) und B2<sup>p</sup> (B, D) Trophozoiten über 4 h (A, B) und 8 h (C, D) inkubierten Dünndarmepithelzellen im Vergleich zur Kontrolle. Gezeigt sind die zwanzig Stoffwechselwege mit dem höchsten *fold enrichment* mit einem FDR *p*-Wert ≤ 0,05, dargestellt als -log10(FDR). Das GO *enrichment* wurde mit *shinyGO 0.77* durchgeführt.

## 5 Anhang



**Abbildung A36: GO-terms gemeinsam regulierter Gene bei *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu Kolonepithelzellen.**

PANTHER GO-*slim* Analyse der Kategorie „Molekulare Funktion“ gemeinsam regulierter Gene (FDR  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) aller Bedingungen bei A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten nach 4 h und 8 h Co-Inkubation mit Kolonepithelzellen mithilfe von *PantherDB 19.0*.



**Abbildung A37: GO-terms gemeinsam regulierter Gene bei *E. histolytica* Trophozoiten nach Kontakt zu Dünndarmepithelzellen.**

PANTHER GO-*slim* Analyse der Kategorie „Molekulare Funktion“ gemeinsam regulierter Gene (FDR  $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) aller Bedingungen bei A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> *E. histolytica* Trophozoiten nach 4 h und 8 h Co-Inkubation mit Dünndarmepithelzellen mithilfe von *PantherDB 19.0*.

## 5 Anhang

**Tabelle A30: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit A1<sup>TP</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonosphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
gene:ENSG00000250264	5.05039508	2.33639625	0.00029721	0.00610792
ATP6V1G2-DDX39B	4.16860468	2.05956457	0.00388533	0.04092601
ATAD2	3.49953617	1.80716372	2.477E-20	2.4943E-16
ANKRD37	2.85719134	1.51459765	4.9915E-05	0.0015431
DPM3	2.54361889	1.34688253	8.5803E-09	1.08E-06
MTLN	2.54223694	1.3460985	0.0001379	0.00337056
DERPC	2.53824614	1.34383198	0.00397686	0.04184637
CDKN2AIPNL	2.33711367	1.22472791	3.8912E-06	0.00019691
BOLA2B	2.32989734	1.22026639	3.6449E-10	9.4113E-08
SMIM22	2.25858132	1.17541686	1.1333E-08	1.3199E-06
COX14	2.25630662	1.17396314	5.0149E-05	0.0015431
SLPI	2.1819926	1.12564621	3.2797E-05	0.0011457
SAMD13	2.13505933	1.09427616	0.00028163	0.0058474
NDUFB1	2.07817545	1.05531746	5.5213E-08	4.8771E-06
OLFM4	2.06961894	1.04936517	3.2899E-07	2.2385E-05
ROMO1	2.06610572	1.04691408	5.1817E-07	3.3449E-05
CCL20	2.05038509	1.03589489	0.00029558	0.00608689
gene:ENSG00000144785	2.04938042	1.03518781	0.00073249	0.01199374
MPG	2.04115033	1.02938244	2.933E-06	0.00015545
UQCRQ	2.03851797	1.02752067	8.0913E-13	8.1479E-10
TIMM10	2.01301092	1.009355	0.0004955	0.0091244
COX5B	2.01106939	1.00796286	2.163E-14	5.4453E-11
MRPL54	2.00162306	1.00117031	0.00233976	0.0286287
CCDC167	1.99737709	0.99810673	0.00113723	0.0168305
TMEM258	1.99630124	0.99732944	1.5829E-10	4.5542E-08
ADIRF	1.99481834	0.99625737	3.6791E-09	5.2927E-07
BLVRB	1.99472625	0.99619077	7.7982E-05	0.00212237
gene:ENSG00000271741	1.97215067	0.97976977	0.00271249	0.03157256
LAMTOR4	1.96175994	0.97214851	8.2229E-07	5.0801E-05
C19orf33	1.95984477	0.97073939	3.8548E-11	1.4377E-08
CDKN2A	1.95473752	0.9669749	1.1026E-06	6.5698E-05
RPS28	1.95442441	0.96674379	7.0979E-10	1.6622E-07
PMVK	1.95377075	0.9662612	0.00424316	0.0438242
TRAPPC5	1.94752909	0.96164488	3.2463E-07	2.2239E-05
H2AJ	1.94511001	0.95985175	6.8412E-07	4.2525E-05
C12orf57	1.94450084	0.95939986	0.00052875	0.0094406
SUV39H2	1.93496715	0.95230907	0.00459247	0.04593368
TMEM265	1.93235245	0.95035826	2.9206E-05	0.00105414
SF3B5	1.92032637	0.94135153	1.0637E-06	6.4143E-05
COX7A2	1.91995581	0.94107311	1.2098E-14	4.061E-11
PRSS1	1.91799059	0.93959564	4.1309E-05	0.00133327
CIAO2B	1.91612967	0.9381952	3.5006E-08	3.3895E-06
COP59	1.91373954	0.9363945	3.6368E-05	0.00121671

## 5 Anhang

LGALS1	1.91356418	0.93626229	1.0602E-05	0.00045302
RPS29	1.91091831	0.9342661	4.0789E-13	4.5638E-10
PFDN4	1.88230927	0.91250369	6.7971E-05	0.00191191
TMEM256	1.88167234	0.91201543	2.0867E-05	0.00078998
RNF5	1.88073479	0.91129642	3.1675E-09	4.6907E-07
RPL35	1.88015533	0.91085185	6.6197E-09	8.7711E-07
TFF3	1.87177782	0.90440919	3.0841E-12	2.2184E-09
UQCR11	1.8716918	0.9043429	1.6899E-07	1.2605E-05
TMEM14A	1.86956212	0.90270041	5.6444E-05	0.00167402
COX6A1	1.86752511	0.90112764	1.0152E-13	1.2779E-10
ELOB	1.86687632	0.90062635	1.4742E-11	7.5435E-09
CCS	1.86532918	0.89943025	0.00353238	0.03827822
MICOS13	1.86433442	0.89866067	0.00056775	0.00994305
RPS21	1.8565874	0.89265323	7.6832E-12	4.5512E-09
DBI	1.85576631	0.89201505	1.3125E-12	1.112E-09
CARD19	1.85215207	0.88920255	0.00519354	0.04971382
S100A6	1.85119131	0.888454	1.0533E-10	3.5356E-08
TXNDC17	1.84963807	0.887243	3.5747E-11	1.4377E-08
POLR1H	1.84361493	0.88253736	0.00166709	0.02214727
MIF	1.84339078	0.88236194	3.4541E-15	1.7391E-11
NCBP2AS2	1.84184605	0.88115248	0.00146134	0.02022624
NDUFB8	1.83830142	0.87837334	9.5334E-10	2E-07
S100P	1.83175018	0.87322276	7.497E-10	1.6844E-07
SELENOH	1.83138177	0.87293257	2.4878E-06	0.00013397
PTS	1.82916673	0.87118658	0.00011471	0.00288053
OST4	1.82804722	0.87030333	1.1698E-11	6.5445E-09
ATP5F1E	1.82672396	0.86925864	1.3252E-12	1.112E-09
CKLF	1.82344921	0.86667001	0.00085409	0.01345968
NDUFA1	1.82277754	0.8661385	2.4063E-09	3.9086E-07
WIZ	-1.82103042	-0.86475503	1.9264E-05	0.00074443
TBC1D24	-1.8239872	-0.8670956	0.00415757	0.0431616
KMT2B	-1.8390975	-0.87899797	8.3578E-05	0.00223838
ZHX3	-1.8395989	-0.87939124	0.00168812	0.02236753
SCYL3	-1.85310033	-0.88994099	0.0009976	0.01515212
AGAP1	-1.85756194	-0.89341032	4.7319E-08	4.3716E-06
CEP164	-1.86423236	-0.89858169	0.00351386	0.03817105
NAA40	-1.86945456	-0.90261741	3.8218E-05	0.00126183
HERC3	-1.87172303	-0.90436697	0.00127069	0.0183848
BICRAL	-1.90304156	-0.92830707	0.00085567	0.01346337
KMT2D	-1.91621098	-0.93825641	2.492E-08	2.5607E-06
ZNF532	-1.92874378	-0.94766151	0.00516733	0.04960443
MEGF6	-1.96327429	-0.97326175	0.00179575	0.02324325
LRFN3	-1.97799582	-0.98403938	0.00335619	0.03688122
PITPNM2	-1.99007161	-0.99282035	0.00453159	0.04561285
ZC3H4	-1.99085859	-0.99339075	0.00015568	0.00369744
MDN1	-1.99194258	-0.99417606	2.8055E-09	4.2806E-07
ABCA3	-2.07643931	-1.05411171	0.00018424	0.00427304

## 5 Anhang

HDAC4	-2.08694549	-1.06139292	0.00282065	0.03246165
GIGYF1	-2.11319651	-1.07942693	1.6064E-05	0.00064449
EPPK1	-2.12331593	-1.08631905	4.6607E-07	3.0476E-05
gene:ENSG00000282034	-2.26709413	-1.1808443	1.0016E-05	0.00044044
CELSR2	-2.28877799	-1.19457753	0.0033585	0.03688122
MDC1	-2.30839413	-1.20688957	1.1328E-05	0.00047333
ZNF738	-2.45523427	-1.29586069	0.0040334	0.04222504
RASGRF2	-2.47020837	-1.30463274	0.00130897	0.01867865
gene:ENSG00000280433	-2.9324837	-1.55212309	0.0001676	0.00395258
NBPF11	-3.05645464	-1.61185916	0.00021283	0.00475568

**Tabelle A31: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
NR4A1	4.94109311	2.30483024	1.9216E-15	1.6603E-11
POLR1H	2.85509237	1.51353742	1.1053E-07	5.8211E-05
CXCL3	2.39042431	1.25726672	1.3337E-10	2.8807E-07
TMEM265	2.13186198	1.09211404	0.00088905	0.03268664
ATAD2	2.12537595	1.08771806	8.0863E-07	0.00024952
ALKBH7	2.07227292	1.05121402	8.0002E-05	0.00705324
gene:ENSG00000285130	2.05387522	1.03834854	0.00172167	0.04991693
IL33	2.04175792	1.02981182	4.1282E-06	0.00077539
DUSP1	1.98643009	0.99017802	1.929E-05	0.00245096
LSM5	1.94266682	0.95803849	3.0988E-07	0.00011641
PNPLA4	1.91837707	0.93988632	0.0003126	0.01753819
TRAPPC5	1.91697509	0.93883159	1.1935E-05	0.00169053
GOS2	1.90886102	0.93271207	0.00036156	0.01893326
NUDT22	1.89580978	0.92281422	1.9666E-05	0.00245472
NDUFA11	1.88565653	0.91506692	5.1833E-08	3.3172E-05
SMIM26	1.88179611	0.91211033	9.6828E-06	0.00141795
LGALS1	1.8622746	0.89706582	6.4685E-05	0.00576163
TUT1	1.82924695	0.87124986	0.00143349	0.04503757
TMEM258	1.81442862	0.8595153	6.7921E-07	0.00021735
ANKRD26	-1.84953693	-0.88716411	0.00150611	0.04614471
TLR4	-1.88111732	-0.91158983	4.4005E-06	0.00080894
ENTPD1	-1.88506044	-0.91461078	0.00132761	0.04248359
STC1	-1.99198311	-0.99420541	0.00139424	0.04428757
N4BP2	-2.10208818	-1.07182319	0.00064745	0.02613985
CFAP44	-2.15023449	-1.104494	0.00012874	0.00997284
gene:ENSG00000283761	-2.19901625	-1.13685826	0.00099644	0.03475446
LY75-CD302	-2.2513302	-1.17077767	0.0001263	0.00992033

## 5 Anhang

**Tabelle A32: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
ANKRD37	4.37251425	2.12846309	1.1146E-09	6.7019E-07
ATAD2	3.76641305	1.91319122	1.5052E-30	1.6291E-26
ANXA8L1	3.00732804	1.58848225	5.819E-05	0.00388756
DUSP1	2.93412334	1.55292952	2.1796E-14	3.37E-11
NR4A1	2.84662081	1.50925033	3.8209E-07	8.9898E-05
ARL14	2.39708369	1.26128028	1.6276E-09	9.2712E-07
ARRDC3	2.39465812	1.2598197	2.2271E-25	1.2052E-21
MRPL54	2.38735891	1.25541548	1.9532E-05	0.00187071
ERRFI1	2.25651493	1.17409633	1.9753E-24	7.1261E-21
FOS	2.24503458	1.16673767	1.882E-21	5.0921E-18
DUSP5	2.1859772	1.12827835	3.7204E-09	1.8302E-06
TCIM	2.1409236	1.09823332	1.3977E-07	4.1365E-05
MT1E	2.11604845	1.08137266	3.0867E-06	0.00042517
MPG	1.95773985	0.96918907	6.87E-06	0.00083543
AREG	1.94268033	0.95804852	1.0566E-16	2.2871E-13
MAGOH	1.91069479	0.93409735	5.2176E-06	0.00067227
MZT2A	1.86429175	0.89862765	2.1926E-05	0.00201105
DPM3	1.85327099	0.89007385	4.852E-05	0.00351322
MT2A	1.83996271	0.87967653	2.3175E-10	1.7916E-07
DDIT4	1.81315902	0.85850546	7.2115E-11	6.0039E-08
H1-2	1.80999504	0.85598574	6.2103E-06	0.00077258
GDF15	1.8049746	0.85197853	2.6721E-08	9.9726E-06
JUN	1.80417509	0.85133936	5.7819E-12	6.9531E-09
C15orf48	1.80290235	0.85032126	1.5983E-11	1.4415E-08
FAM117B	-1.82170548	-0.86528973	1.8403E-05	0.00177837
MYB	-1.84797543	-0.88594558	4.1092E-05	0.00311005
PTPRB	-1.85665723	-0.89270749	4.6749E-06	0.00060959

**Tabelle A33: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit B2<sup>p</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
SPOCK3	155.046319	7.27655546	0.00125675	0.02639419
NR4A1	11.9446212	3.5782892	1.848E-38	4.8708E-35
FOSB	9.98090148	3.31917013	3.6037E-19	1.2256E-16
CXCL3	5.93459717	2.5691501	6.5841E-47	3.4708E-43
CCL20	5.83337988	2.54433203	8.8968E-28	5.2111E-25
IL1B	5.7857012	2.53249182	9.9358E-16	2.4941E-13
DUSP1	5.46289602	2.44966596	5.568E-35	8.3862E-32
TNFAIP3	5.41774476	2.43769243	1.2525E-37	2.6411E-34
MUC5AC	4.45295148	2.15476189	5.0771E-07	4.2148E-05
TCIM	4.02649803	2.00952563	5.2653E-29	3.9652E-26

## 5 Anhang

CXCL1	4.02164825	2.0077869	7.6634E-25	3.8474E-22
NR4A2	3.99015108	1.99644337	9.8041E-11	1.7227E-08
CXCL8	3.82202502	1.93433722	2.9506E-33	3.4564E-30
CYP1A1	3.66117574	1.87230703	3.0723E-32	3.2391E-29
GOS2	3.61999097	1.8559861	3.322E-18	9.7287E-16
NFKBIA	3.56778032	1.83502678	1.1686E-49	1.2321E-45
IRAK2	3.47003111	1.7949486	4.4182E-11	7.895E-09
IL1A	3.38840227	1.76060516	1.3035E-08	1.4778E-06
EGR1	3.35658437	1.7469939	4.8908E-31	4.2969E-28
IL33	3.25280454	1.70168413	6.2505E-17	1.7811E-14
gene:ENSG00000285130	3.17266589	1.6656956	1.9056E-09	2.5114E-07
DUSP5	3.13875644	1.65019308	7.9471E-32	7.6169E-29
FOS	3.12741067	1.64496868	8.3675E-44	2.9406E-40
CX3CL1	3.01636665	1.5928118	2.4948E-13	5.7179E-11
PRDM1	2.98550743	1.57797616	1.7612E-06	0.00012632
CXCL2	2.97504718	1.57291255	4.0919E-09	4.9023E-07
ICAM1	2.8467758	1.50932888	2.599E-14	6.0892E-12
SLC16A14	2.84637992	1.50912824	6.9196E-06	0.00039865
TIMM8A	2.84484958	1.50835237	0.00054419	0.01430763
WNT7B	2.82182317	1.49662758	0.00121457	0.02602685
IER3	2.79009879	1.48031621	2.4035E-36	4.2234E-33
ATAD2	2.78250087	1.47638214	1.557E-20	5.8627E-18
ARL14	2.74526436	1.45694508	1.5856E-18	5.0444E-16
LIF	2.73731306	1.45276044	2.6316E-33	3.4564E-30
TNF	2.7168172	1.4419175	2.6169E-12	5.3058E-10
JUN	2.70633771	1.43634188	8.7882E-31	7.1272E-28
FKBP5	2.65878653	1.41076795	2.6447E-13	5.9326E-11
KLF2	2.65585119	1.40917431	6.506E-05	0.0026081
SLC43A2	2.65371675	1.40801439	4.9032E-07	4.1027E-05
JUNB	2.61766862	1.38828247	2.5097E-28	1.5565E-25
NOCT	2.53319997	1.34096097	0.00284338	0.04676724
DDIT4	2.52282858	1.33504218	1.8378E-22	8.0734E-20
PMAIP1	2.45251841	1.29426397	2.5678E-10	4.1018E-08
CYP1B1	2.38697869	1.25518569	3.5972E-08	3.7549E-06
CST6	2.38596429	1.25457245	0.00284314	0.04676724
DUSP23	2.38386525	1.25330269	2.4092E-05	0.00114032
FOSL1	2.371648	1.2458899	4.3993E-12	8.5892E-10
TNFAIP2	2.35892248	1.23812801	1.6724E-28	1.1755E-25
ITPKC	2.34867608	1.23184776	5.9845E-09	7.0893E-07
MT1E	2.33073048	1.22078218	9.807E-06	0.00053461
AREG	2.33062139	1.22071466	6.444E-16	1.6985E-13
CCL2	2.32246723	1.21565824	4.9646E-08	5.0329E-06
UQC3	2.32157923	1.21510652	0.00017202	0.00590768
MAP3K8	2.27909157	1.18845889	5.3779E-08	5.2499E-06
FGFBP1	2.27313553	1.1846837	8.3599E-27	4.4069E-24
RHOB	2.26795519	1.18139213	1.233E-11	2.3636E-09
PLAUR	2.2206556	1.15098566	2.651E-18	7.9855E-16

## 5 Anhang

MB21D2	2.21888417	1.14983436	2.7993E-06	0.00018446
RFLNA	2.21862277	1.14966439	0.00062292	0.01575199
DKK1	2.21693961	1.14856947	1.6894E-15	4.1421E-13
CD55	2.19565	1.1346481	4.9401E-27	2.7412E-24
RCAN1	2.19227957	1.13243179	2.6182E-16	7.2642E-14
RELB	2.1560505	1.10839097	1.1932E-05	0.00062277
ATF3	2.15496928	1.1076673	2.0425E-20	7.4255E-18
EREG	2.15345466	1.10665295	5.3493E-13	1.1749E-10
BHLHE40	2.13903191	1.09695801	6.8018E-23	3.2596E-20
BIRC3	2.12720053	1.08895604	2.2323E-10	3.6773E-08
GEM	2.11972474	1.08387693	0.0001048	0.00389068
BCL3	2.11379857	1.07983791	3.0491E-09	3.7819E-07
RASSF9	2.11301554	1.07930338	0.00053262	0.01410914
NCOA7	2.10735928	1.0754363	1.9268E-28	1.2697E-25
SDC4	2.09983239	1.07027418	1.4999E-22	6.8756E-20
NFKBIE	2.09652601	1.06800073	4.7806E-06	0.00029475
PPP1R15A	2.09551724	1.06730639	4.7476E-20	1.6684E-17
ZFP36	2.06782285	1.04811259	3.1884E-16	8.6192E-14
TMEM265	2.05891406	1.04188361	0.0024207	0.0419071
KLF6	2.05320906	1.03788053	1.6268E-18	5.0444E-16
NUAK2	2.0526766	1.03750635	0.00132454	0.02727461
TLE4	2.05229505	1.03723816	1.4902E-05	0.00074511
CSF2	2.04875985	1.03475088	1.0035E-05	0.0005398
WDR35	-2.08489966	-1.05997795	0.00053487	0.01413306
TPPP	-2.08616868	-1.06085581	0.00121782	0.0260435
FAM217B	-2.09197016	-1.06486227	0.00034945	0.010282
EGLN3	-2.10076411	-1.07091418	1.2045E-20	4.7032E-18
ZNF212	-2.13763486	-1.09601544	0.00288892	0.04707552
SLC7A6	-2.18231976	-1.1258625	0.00031043	0.00948664
ZNF180	-2.19155897	-1.1319575	0.00022775	0.00745692
ZNF37A	-2.2370458	-1.16159479	5.0715E-08	5.07E-06
FAM13A	-2.34386725	-1.22889086	6.3852E-22	2.6928E-19
SLC19A1	-2.42051478	-1.2753139	3.7877E-05	0.00169209
gene:ENSG00000289027	-2.46842032	-1.30358808	0.00123535	0.02617692
DYRK1B	-2.56791462	-1.36059723	0.00164979	0.03183951
GRAMD1B	-2.57826606	-1.36640115	1.8257E-06	0.00012747
PFKFB4	-2.60748514	-1.38265903	2.2952E-21	9.3069E-19
SLC2A3	-2.65646821	-1.40950945	4.7244E-10	6.918E-08
C8orf58	-2.75882843	-1.46405574	0.00018169	0.00617916
STC2	-2.8149735	-1.49312134	2.7981E-10	4.3959E-08
STC1	-2.89574621	-1.53393517	5.3595E-06	0.00032105
FMC1-LUC7L2	-2.93730433	-1.55449275	0.00084147	0.02025484
SLC30A10	-3.18580858	-1.67165959	1.7825E-06	0.0001266

## 5 Anhang

**Tabelle A34: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
SPOCK3	321.703706	8.32958875	9.9692E-05	0.00189561
NPPB	28.9408128	4.85503353	2.1516E-20	6.0568E-18
FRMPD1	14.8195155	3.88942637	0.00018109	0.00313082
CFI	13.8477203	3.79157659	0.00552852	0.04657694
EGR3	13.4905054	3.75387249	2.7035E-08	1.4059E-06
ACTBL2	12.8162532	3.67990265	0.00588804	0.04884317
CST6	12.0196845	3.58732712	6.4948E-08	3.1149E-06
SLC34A2	10.8449715	3.43895435	1.1137E-07	5.0599E-06
KLK13	10.5110124	3.39382973	4.7091E-06	0.00013256
gene:ENSG00000267228	10.0797208	3.33338378	0.00017442	0.00303156
ANKRD1	9.61035973	3.26459043	3.1268E-13	3.5517E-11
SERPINE1	9.43788774	3.23846401	2.1695E-21	7.0232E-19
NPTX1	8.80052328	3.13758931	0.00018998	0.00324547
NR4A1	7.74068089	2.95246047	5.7875E-43	7.4943E-40
LDLRAD2	7.69341752	2.9436246	4.0866E-05	0.00088938
EGR1	7.60851575	2.92761504	4.6916E-71	1.5188E-67
NOTCH2NLC	7.26586767	2.86113509	0.00011378	0.00211855
OSR1	6.82479841	2.77078643	1.2711E-05	0.00032336
REC8	6.7160182	2.74760614	0.00014245	0.00256544
IL1A	6.46294227	2.69219111	4.7485E-15	6.9874E-13
FOSB	6.37484003	2.67238914	1.6391E-11	1.4537E-09
ANXA8	6.06364398	2.60018505	0.00180554	0.01991362
CSF2	5.85723048	2.55021867	2.1814E-11	1.8872E-09
DUSP1	5.83445245	2.54459727	1.2915E-55	2.3891E-52
IER3	5.65246431	2.49887998	3.7342E-59	8.059E-56
SULT4A1	5.64826808	2.49780856	8.3813E-06	0.00022194
FOSL1	5.55161584	2.47290774	2.2204E-29	1.198E-26
CXCL2	5.45500589	2.44758075	2.61E-17	5.1208E-15
gene:ENSG00000254692	5.42842725	2.44053427	0.00574755	0.04780029
TNFAIP3	5.41033442	2.43571777	1.0778E-43	1.5507E-40
FOS	5.37774768	2.42700207	2.3283E-64	6.0297E-61
RRAD	5.25371251	2.39333726	2.4461E-08	1.3084E-06
PGGHG	5.17910221	2.37270203	3.5956E-09	2.2602E-07
TAGLN	4.8540369	2.27918508	1.1873E-09	8.0077E-08
WNT7A	4.8046936	2.26444443	3.4498E-13	3.8845E-11
PRDM1	4.76614805	2.25282377	2.3575E-21	7.4457E-19
SNAI2	4.76121646	2.25133022	1.0694E-06	3.7527E-05
SLC2A3	4.75923778	2.25073053	3.8763E-16	6.6045E-14
TGFB2	4.63207447	2.21165845	3.6614E-06	0.00010548
PADI1	4.55049948	2.18602491	1.4771E-09	9.8592E-08
CMTM3	4.54923708	2.18562462	6.3963E-06	0.00017437
NR4A2	4.49550423	2.16848294	3.4972E-18	7.5474E-16
SLC15A3	4.47916191	2.16322882	8.7902E-08	4.1518E-06

## 5 Anhang

SLC14A1	4.43532695	2.14904046	0.00329795	0.03165688
gene:ENSG00000284292	4.25534688	2.08927674	0.00430163	0.03884365
MUCL3	4.24405469	2.08544325	4.5952E-32	3.1317E-29
OAS2	4.23239219	2.08147332	0.00041714	0.00617323
NFKBIA	4.19719642	2.06942598	3.2988E-37	3.5597E-34
TNC	4.1716737	2.06062632	4.7974E-05	0.00101176
SERPINB2	4.10669288	2.03797706	8.2857E-05	0.00162562
ARL14	4.06846077	2.02448308	6.7592E-32	4.3762E-29
LTB	4.06516266	2.02331308	2.5047E-13	2.9219E-11
THBD	4.05327285	2.01908729	1.6274E-05	0.00039986
GSTA1	-4.05461141	-2.01956365	2.9148E-16	5.0326E-14
NCCRP1	-4.1362375	-2.04831903	0.00031789	0.00498954
AKR1C1	-4.19869623	-2.06994142	2.0322E-34	1.6447E-31
SLC52A1	-4.20400059	-2.07176287	6.3171E-06	0.00017257
CLCA4	-4.20925332	-2.07356434	0.00018719	0.00320196
gene:ENSG00000273259	-4.31736076	-2.11014965	0.00147467	0.01705751
VSIG1	-4.48812059	-2.16611144	1.054E-10	8.1239E-09
PHOSPHO2	-4.59705716	-2.2007106	0.00049448	0.0070363
GPD1	-4.63472805	-2.21248469	0.00063391	0.00870004
MUC5AC	-4.65897699	-2.2200132	1.392E-05	0.00035001
SERPINI1	-4.71699347	-2.2378676	0.00257615	0.02628727
SYT7	-4.71919781	-2.23854165	0.0035367	0.03340387
C9orf152	-4.82898128	-2.27171887	5.3431E-06	0.00014815
SYNPR	-4.92021639	-2.29872177	1.8112E-12	1.8323E-10
PAQR7	-5.67907796	-2.50565672	3.7127E-12	3.5092E-10
MAF	-6.04428062	-2.59557064	0.00127939	0.01545417
NID2	-6.29514581	-2.65423979	0.00544417	0.04606562
gene:ENSG00000256500	-6.42495306	-2.68368591	0.00404494	0.03704239
CHP2	-6.43763401	-2.68653056	2.0945E-06	6.5197E-05
MOGAT2	-6.44534876	-2.68825843	3.1015E-13	3.5517E-11
C1QTNF5	-6.8925076	-2.78502895	0.00046546	0.00674192
ARL2-SNX15	-7.35931739	-2.87957196	0.0046515	0.04122678
MEP1B	-7.57102644	-2.92048891	9.9659E-07	3.5292E-05
CYTIP	-7.57158132	-2.92059464	1.4287E-06	4.8052E-05
PCK1	-7.57618182	-2.92147095	4.9023E-44	7.935E-41
CLDN18	-7.62119564	-2.93001735	9.9523E-22	3.3044E-19
LEMD1	-7.77873291	-2.95953517	4.8546E-10	3.454E-08
SLX1B	-8.35220112	-3.06215645	8.9409E-05	0.00173577
ABCC2	-8.45586059	-3.07995159	8.4781E-15	1.1556E-12
AKR1B10	-8.49359975	-3.08637612	7.7389E-76	3.3404E-72
ERICH4	-8.97260507	-3.16552691	0.00033332	0.00515666
LEAP2	-9.74648361	-3.28488181	1.3797E-05	0.00034758
HMGCS2	-9.84907407	-3.2999881	5.2308E-06	0.00014566
PSAPL1	-10.4345488	-3.38329631	3.2851E-12	3.1325E-10
THBS2	-10.51448	-3.3943056	0.00597705	0.04939175
MUC2	-11.8199786	-3.56315551	0.00039822	0.00594754
APOA4	-12.878958	-3.68694397	8.9938E-15	1.2131E-12

## 5 Anhang

AKR1B15	-13.0472261	-3.70567122	0.00222302	0.02347953
SERPINA4	-14.9865967	-3.90560089	0.00015265	0.00271891
CYP3A4	-15.2134145	-3.92727208	4.322E-116	2.798E-112
ALDOB	-20.3313004	-4.34563059	2.135E-181	2.765E-177
RBP2	-25.6783064	-4.68247815	2.5226E-20	6.95E-18
APOA1	-38.2681123	-5.25807083	1.0593E-05	0.00027489
UGT1A3	-61.4260691	-5.94077916	0.00250945	0.02585455
G6PC1	-103.020947	-6.6867939	0.00021964	0.00366502
CA1	-186.049799	-7.53954503	3.0488E-05	0.0006866
SI	-216.136021	-7.75579572	3.8584E-24	1.4275E-21

**Tabelle A35: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit A1<sup>np</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
SPOCK3	283.4037	8.14671524	0.00030757	0.00170083
gene:ENSG00000288725	151.52278	7.2433909	0.00186712	0.00810281
gene:ENSG00000254692	144.681959	7.17674123	0.00203106	0.00872468
gene:ENSG00000284292	62.7638355	5.97186161	0.00958923	0.0331076
NMNAT2	19.2944751	4.27011589	0.00101796	0.00483678
gene:ENSG00000283239	19.2887234	4.26968576	7.4335E-06	6.166E-05
EGR3	18.8445845	4.23607808	4.2311E-12	9.5609E-11
CST6	18.6780325	4.22327058	2.1985E-08	2.9017E-07
THBD	18.3882866	4.20071515	1.6371E-29	1.2771E-27
NPPB	16.5926391	4.05247147	1.953E-39	2.3483E-37
SERPINE1	15.7293458	3.97538676	6.0806E-29	4.5539E-27
KRT16	15.6957866	3.97230543	1.8126E-41	2.3756E-39
OSR1	14.6232681	3.87019387	0.000174	0.0010314
CXCL2	14.2550458	3.83340077	7.3966E-50	1.3653E-47
SYN3	14.0184337	3.80925325	0.00048216	0.00251361
TNFAIP3	13.6058299	3.76615305	1.075E-130	2.013E-127
gene:ENSG00000288684	13.2527174	3.7282163	0.00159301	0.00706768
PADI1	12.9629669	3.69632405	3.2394E-29	2.44E-27
SERF1B	12.6493153	3.66098739	0.00741664	0.0266308
IL1A	12.6024094	3.65562768	2.4439E-49	4.3876E-47
C2CD4A	12.4047958	3.63282608	0.00034886	0.00189639
SNAI2	12.322739	3.62325105	6.1128E-11	1.1799E-09
IL11	11.3004126	3.49830355	0.00091381	0.00439663
gene:ENSG00000261915	11.2514976	3.49204514	0.00462821	0.01774642
FOSB	11.238613	3.4903921	1.0487E-25	6.4529E-24
IL1B	10.9744482	3.4560765	4.8286E-46	7.274E-44
ACTBL2	10.9106395	3.44766376	0.0131358	0.04345223
NR4A2	10.7479929	3.42599537	1.0643E-34	1.0488E-32
NPTX1	10.7368712	3.42450174	0.00119081	0.0054934
BCL2A1	9.94122911	3.31342423	0.00018588	0.00109034
SOCS3	9.82732007	3.29679804	6.1239E-10	1.0277E-08

## 5 Anhang

TMEM158	9.81457553	3.29492587	1.8437E-05	0.0001409
LTB4R2	9.80923649	3.29414085	0.01480848	0.04799207
NR4A1	9.7965248	3.29227006	4.8446E-54	1.1544E-51
CSF2	9.37191689	3.22834416	3.5222E-26	2.2966E-24
gene:ENSG00000183889	9.21666138	3.20424425	4.3483E-10	7.43E-09
FOSL1	9.21448762	3.20390394	1.771E-104	1.547E-101
NFKBIA	9.188686	3.19985857	1.427E-168	1.87E-164
FAM25G	9.04653744	3.17736571	0.00768673	0.02744272
ICAM1	8.30659802	3.05425774	7.969E-115	1.044E-111
CXCL3	8.18602594	3.03316324	1.1357E-90	7.8337E-88
IER3	8.04786051	3.0086053	1.005E-149	6.586E-146
CXCL1	7.88912107	2.97986458	2.682E-105	2.704E-102
IGSF9B	7.73735778	2.95184099	4.5646E-08	5.7357E-07
PLA2G4B	7.6927469	2.94349884	0.00028701	0.00159796
ABCB4	7.62622975	2.93096999	5.386E-33	4.8682E-31
PLCXD1	7.48554148	2.90410668	1.539E-125	2.52E-122
FAM83A	7.42089708	2.8915936	3.243E-10	5.6519E-09
INHBB	7.40784926	2.88905474	0.00727183	0.02619699
LIF	7.31015095	2.8699012	1.936E-124	2.82E-121
WNT7B	7.22792117	2.85358077	4.0608E-06	3.5152E-05
EDN2	6.93591797	2.79408684	9.2115E-06	7.4799E-05
MUCL3	6.79308383	2.76406666	4.37E-145	1.432E-141
TAGLN	6.70992717	2.74629711	2.8406E-17	1.0284E-15
SEMA7A	6.69603345	2.74330674	6.714E-112	8E-109
TNF	6.35970971	2.66896091	1.0991E-17	4.1157E-16
SDC4	6.35862907	2.66871575	2.194E-137	4.793E-134
PNMA2	6.29830922	2.65496459	0.01291904	0.04281087
NPY4R2	6.293025	2.65375367	0.01531769	0.04938782
SLC2A3	6.29001372	2.65306316	4.502E-19	1.8555E-17
TICAM2	6.27408962	2.64940614	0.00065191	0.0032811
KLK13	6.2696355	2.64838157	0.0003316	0.00181156
LYPD3	6.26075833	2.64633741	8.2385E-28	5.774E-26
LBHD1	-6.41073309	-2.68048934	0.00640137	0.02352015
APOC1	-6.51706464	-2.7042223	0.01112468	0.03759672
ADH4	-6.60621225	-2.72382332	9.7012E-07	9.4883E-06
PDF	-6.92402373	-2.79161067	0.01200441	0.04013516
PHOSPHO2	-7.15896675	-2.83975138	0.00673625	0.02454414
SLC52A1	-7.16097683	-2.8401564	7.0361E-07	7.0821E-06
VSIG1	-7.46365346	-2.899882	7.5277E-10	1.2488E-08
C9orf152	-7.60584027	-2.92710764	1.6228E-05	0.00012578
CCL28	-8.56998702	-3.09929302	1.7311E-15	5.2886E-14
gene:ENSG00000256861	-8.72096095	-3.12448711	0.00022031	0.00126695
PSAPL1	-9.00658082	-3.17097952	2.8278E-06	2.5298E-05
SOX6	-9.72032396	-3.2810044	0.01358298	0.04468336
SELENOP	-10.8296886	-3.43691985	2.8182E-07	3.0374E-06
AKR1B15	-11.3929847	-3.51007384	0.00981042	0.03376453
KPNA7	-11.3965401	-3.51052399	0.00961144	0.03317553

## 5 Anhang

RSAD2	-11.6321982	-3.54005185	0.00041588	0.0022067
APOA1	-12.0742376	-3.59386019	0.00899253	0.03135305
CYTIP	-12.2139294	-3.6104555	0.00036373	0.00196418
APOA4	-12.3882002	-3.6308947	1.9081E-05	0.00014531
CHP2	-12.6995381	-3.66670412	0.00041543	0.00220609
GPD1	-13.0672697	-3.70788583	0.00505277	0.01913668
ZNF625-ZNF20	-13.2006633	-3.72253852	0.000534	0.00274777
gene:ENSG00000259171	-13.3851295	-3.74255919	1.9147E-11	3.9271E-10
MEP1B	-14.7989969	-3.88742748	0.00522843	0.01970206
ABCC2	-18.6485155	-4.22098888	9.7128E-11	1.8263E-09
RBP2	-21.1934877	-4.40554912	2.8996E-09	4.4499E-08
CLDN18	-22.0268342	-4.46119025	1.0169E-38	1.1794E-36
MAF	-23.0641138	-4.52757796	0.00051773	0.00267775
ALDOB	-23.2339967	-4.53816544	9.287E-146	4.057E-142
CYP3A4	-23.9289651	-4.5806861	2.455E-88	1.6088E-85
A1CF	-24.7863874	-4.63147611	0.00036211	0.00195624
ANPEP	-52.3690365	-5.71064216	1.2544E-47	2.0811E-45
SI	-63.62743	-5.99157695	9.2254E-20	3.9773E-18
HMGCS2	-75.2288258	-6.23321367	0.01354472	0.04457988
G6PC1	-81.8404356	-6.35474192	0.01180881	0.03958216
gene:ENSG00000270149	-207.239126	-7.69515259	0.00285203	0.011659
CA1	-211.122825	-7.72193875	0.00197288	0.00850825

**Tabelle A36: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit B2<sup>o</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
SPOCK3	324.061407	8.34012341	0.00011126	0.00961352
EGR3	15.7255702	3.97504042	5.6016E-08	1.8183E-05
NR4A1	7.68672677	2.94236939	3.9301E-33	1.5733E-29
EGR1	7.28538761	2.86500573	6.1407E-39	3.6875E-35
NPPB	7.28036357	2.8640105	7.8055E-05	0.00721106
CXCL2	6.83472445	2.77288318	8.0169E-09	3.566E-06
REC8	6.61912866	2.72664131	0.00069309	0.03538214
IER3	5.47919525	2.45396402	1.0585E-22	2.1188E-19
FOSB	5.21387553	2.38235614	4.1326E-08	1.4181E-05
PGGHG	5.00982186	2.32475931	3.444E-06	0.00068938
FOS	4.96724556	2.31244607	6.1734E-51	7.4142E-47
SULT4A1	4.94828511	2.30692863	0.00062386	0.03257616
TNFAIP3	4.70671197	2.23471957	2.1259E-09	1.3438E-06
DUSP1	4.69078274	2.22982868	5.0018E-24	1.2014E-20
CXCL3	4.53678379	2.18166991	1.1079E-09	7.8273E-07
SERPINB2	4.46913652	2.15999612	0.00018151	0.0136249
IL1A	4.46681039	2.15924501	3.8034E-07	9.9301E-05
CSF2	4.41964839	2.1439316	4.6271E-05	0.00506051
FOSL1	4.30261946	2.10521525	1.9443E-13	2.1228E-10

## 5 Anhang

CXCL1	4.24733905	2.08655928	4.5063E-09	2.255E-06
WNT7A	3.9940389	1.99784838	4.8848E-06	0.00088286
IL1B	3.75839117	1.91011523	3.1504E-09	1.8017E-06
NR4A2	3.58997904	1.84397542	7.3518E-07	0.00017659
NFKBIA	3.50459192	1.80924646	6.1995E-09	2.8637E-06
IFITM2	3.45019968	1.78667986	8.2255E-05	0.00748399
TNF	3.41628426	1.77242802	0.00077225	0.03787877
ATAD2	3.38560825	1.75941505	1.4824E-24	4.4508E-21
MUC12	3.24610327	1.6987089	2.0331E-05	0.00277474
CXCL8	3.18206222	1.66996205	1.5761E-06	0.00034416
STX11	3.16553275	1.66244832	1.219E-05	0.00183001
GEM	3.13091252	1.6465832	9.6438E-10	7.2389E-07
ARL14	3.11464548	1.63906796	7.166E-15	8.6064E-12
HBEGF	3.10508111	1.63463096	1.0149E-10	9.3758E-08
gene:ENSG00000275993	3.05817963	1.61267315	4.3539E-09	2.255E-06
FOXC2	3.0554835	1.61140069	4.6771E-05	0.00506051
LTB	3.05252242	1.61000189	0.00073716	0.03688892
ICAM1	2.98208081	1.57631935	0.00029226	0.01889867
KLF6	2.97761774	1.57415856	4.7688E-08	1.5909E-05
JUNB	2.95424861	1.56279124	3.6504E-22	6.2631E-19
PRDM1	2.93083272	1.55131063	2.7489E-07	7.5032E-05
TNS4	2.9162401	1.54410951	2.2684E-05	0.00302704
TAGLN	2.87118821	1.5216479	0.00101555	0.04585229
PIM1	2.86131278	1.51667721	1.2762E-07	3.8317E-05
CCN1	2.64217014	1.40172337	0.00042214	0.02449213
PRSS2	2.62299809	1.39121676	0.00025589	0.01771629
MUCL3	2.61828133	1.38862012	0.00036185	0.02192527
TCIM	2.60370676	1.38056698	2.9196E-13	2.922E-10
CCL20	2.57443585	1.36425632	5.7661E-06	0.00100364
LOXL4	2.48905672	1.31559911	2.869E-05	0.00362176
ZFP36	2.47065899	1.3048959	3.0577E-17	4.0804E-14
PPP1R15A	2.44914779	1.29227983	2.2896E-08	8.3327E-06
LIF	2.39717001	1.26133223	1.0665E-18	1.6011E-15
SERPINA1	2.39212731	1.25829417	0.00036305	0.02192527
DUSP5	2.35453955	1.23544496	3.1396E-07	8.3793E-05
AREG	2.33171575	1.22139193	5.7124E-09	2.7443E-06
SDC4	2.33021583	1.22046358	1.6129E-05	0.00230606
RCAN1	2.32430034	1.2167965	1.8102E-05	0.00249888
PMAIP1	2.32007581	1.21417195	9.0803E-06	0.00145406
GABBR1	2.29270785	1.19705253	3.7991E-06	0.00074799
DUSP6	2.28739396	1.19370487	4.8394E-10	3.8747E-07
NR1D1	2.27542288	1.18613469	7.3671E-06	0.00121204
MAFF	2.24245239	1.16507736	6.0279E-07	0.00015082
EPHA2	2.22480663	1.15367995	2.0841E-10	1.7879E-07
CSRNP1	2.17965276	1.12409832	1.1211E-07	3.5432E-05
GJB4	2.17766035	1.12277895	5.5697E-05	0.00555243
EDN1	2.17073003	1.11818031	2.8461E-05	0.00362176

## 5 Anhang

DSG3	2.16393958	1.11366022	0.0002706	0.01795502
PLCXD1	2.16246114	1.11267421	4.6665E-07	0.00011924
ARRDC3	2.13350465	1.09322525	3.6091E-05	0.00420825
DKK1	2.12232734	1.08564719	3.4031E-09	1.8578E-06
ETS1	2.11284076	1.07918404	0.00021509	0.01575155
HIVEP2	2.09848859	1.06935062	6.8024E-06	0.00113468
BIRC3	2.09246872	1.06520606	6.1034E-06	0.00104717
AKAP12	2.07129417	1.05053246	1.3282E-05	0.00194534
ZBTB21	2.04486332	1.03200442	3.2634E-06	0.00067574
NRP1	2.02232002	1.01601131	2.895E-05	0.00362176
ZC3H12A	1.97440231	0.98141599	2.5607E-06	0.00053954
RAB6B	1.97230632	0.97988364	0.00073609	0.03688892
CD44	1.97147173	0.97927302	0.00050379	0.02775471
TBC1D9	1.9608794	0.97150081	0.00023332	0.01677948
ATF3	1.9591829	0.97025208	9.4336E-09	4.0463E-06
FAM217B	-1.95645661	-0.96824311	0.00086762	0.04118646
CEBPA	-1.9778724	-0.98394935	5.9049E-05	0.00581292
GLYCTK	-1.98372856	-0.98821463	0.00026034	0.01771629
GCNT4	-2.01468393	-1.01055352	0.00088115	0.04166363
IFIT3	-2.01513664	-1.01087766	0.00013891	0.01134877
HPGD	-2.12873492	-1.08999631	7.7892E-07	0.00018343
EPHX2	-2.16971885	-1.11750811	0.00075922	0.03760509
ACKR4	-2.23798853	-1.16220264	7.2566E-05	0.00691679
ISX	-2.25146053	-1.17086119	0.00039188	0.02318444
CLIC6	-2.27031464	-1.18289225	0.00044316	0.02546563
FGF19	-2.40441072	-1.26568336	0.00080316	0.03858388
ADH4	-2.45008165	-1.29282983	0.00024335	0.01729384
GSTA1	-2.47829746	-1.30934936	0.00076087	0.03760509
CLDN18	-2.50515397	-1.32489928	3.2889E-05	0.00398985
S100P	-2.63129513	-1.39577307	1.2603E-06	0.0002856
EPN3	-2.69551253	-1.43055962	1.2411E-05	0.00184019
LEAP2	-4.02562341	-2.00921222	0.00063244	0.03288127
CYTIP	-4.08997781	-2.03209302	5.3335E-05	0.00552198
CA1	-6.66676625	-2.73698715	1.8111E-08	7.0166E-06

**Tabelle A37: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit B2<sup>P</sup> Trophozoiten inkubierten humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
SPOCK3	677.717232	9.40453964	6.7426E-05	0.00047093
gene:ENSG00000287542	273.730639	8.09661312	0.0008367	0.00429658
gene:ENSG00000254692	224.592662	7.81116698	0.00126265	0.00613566
IL17C	159.907393	7.32109283	0.00209836	0.00947278
gene:ENSG00000288725	94.550691	6.5630161	0.00719871	0.02676005
CTAGE8	75.1068931	6.23087341	0.01171504	0.04010562
CXCL2	42.6696026	5.41513677	4.6386E-67	1.7781E-64

## 5 Anhang

C2CD4A	38.0214144	5.2487403	1.4843E-07	1.874E-06
CST6	30.9098339	4.949994	1.1435E-11	2.5739E-10
CSF2	26.4008317	4.72251148	7.7583E-47	1.4445E-44
TNFAIP3	26.3265191	4.71844488	4.539E-149	2.958E-145
IL1A	25.2978893	4.66094511	4.068E-67	1.6066E-64
NPTX1	24.651831	4.6236229	3.959E-06	3.7175E-05
FOSB	24.5571577	4.61807169	9.6272E-37	1.1203E-34
NPPB	24.2996295	4.60286241	8.5464E-48	1.6625E-45
SERPINE1	23.8704974	4.57715673	1.2861E-37	1.6273E-35
IL1B	22.5546493	4.49535295	1.7435E-66	6.1415E-64
OSR1	20.4585822	4.35463426	2.1114E-05	0.00016698
IL11	20.378533	4.34897829	2.4074E-05	0.0001881
KRT16	19.9989619	4.32185321	1.4748E-43	2.3158E-41
CXCL3	19.8632842	4.31203227	7.7554E-91	7.2197E-88
CXCL1	19.5838265	4.29159078	4.7022E-95	5.5713E-92
EGR3	18.1390328	4.18102563	1.9541E-11	4.2876E-10
NFKBIA	17.7644785	4.15092343	1.122E-130	3.657E-127
ICAM1	16.2479593	4.02218663	1.3343E-96	1.739E-93
SOCS3	15.6413068	3.96728914	2.678E-14	7.9869E-13
NR4A1	15.3677759	3.94183648	2.5609E-64	8.3439E-62
SYN3	15.1033179	3.91679361	0.00016595	0.00104334
BCL2A1	14.8774045	3.89505096	1.88E-05	0.0001506
LTB4R2	14.4114003	3.84913861	0.00481764	0.01913111
C2CD4B	14.2289132	3.83075357	2.4066E-07	2.8976E-06
ANKRD33B	14.1964417	3.82745746	0.00476359	0.01896268
gene:ENSG00000285330	14.1854134	3.82633629	0.00409515	0.01668085
gene:ENSG00000285641	14.0669229	3.81423488	0.01303891	0.04369474
THBD	13.3593519	3.73977811	1.0642E-21	5.4607E-20
PADI1	13.1187458	3.7135579	2.7055E-27	1.9589E-25
IER3	13.0938158	3.71081368	7.1699E-95	7.7871E-92
NMNAT2	12.783954	3.67626222	0.01157438	0.03969707
FOSL1	12.0437141	3.59020846	5.007E-82	3.2628E-79
TNF	11.7859777	3.55899953	5.4798E-28	4.0122E-26
TMEM158	11.2287179	3.48912131	1.7311E-05	0.00013981
gene:ENSG00000286239	11.0315993	3.46357006	0.0025832	0.01128624
LIF	10.80437	3.43354305	1.3E-84	8.9172E-82
GFPT2	10.7168701	3.42181172	0.01278122	0.04304505
GOS2	10.7110001	3.42102129	3.7602E-35	4.0169E-33
SDC4	10.546423	3.39868186	8.548E-114	1.393E-110
NR4A2	10.2394011	3.35605943	2.643E-30	2.2081E-28
TICAM2	9.9386962	3.3130566	0.00038505	0.00217999
SNAI2	9.75818219	3.28661242	4.5044E-09	7.3474E-08
ATAD2	9.75560766	3.28623174	1.2077E-71	5.6215E-69
TNFRSF9	9.57444337	3.25918862	1.7653E-13	4.8333E-12
FAM83A	9.56116791	3.25718686	8.8564E-13	2.2657E-11
PLCXD1	9.35275323	3.22539112	3.7807E-80	2.2397E-77
TGFB11	9.32296118	3.22078826	0.00023178	0.00140305

## 5 Anhang

WNT7B	8.84126278	3.14425244	2.9368E-07	3.4606E-06
gene:ENSG00000283239	8.4955782	3.08671214	0.00846082	0.03063053
TAGLN	8.47204943	3.08271101	1.0086E-17	4.0573E-16
ZFP36	8.39362708	3.06929437	3.4602E-77	1.9607E-74
ANXA8	8.31404319	3.05555024	6.7299E-05	0.0004703
ICAM4	8.26852254	3.04762956	0.00075243	0.0039023
SEMA7A	8.11755785	3.02104576	1.0646E-88	9.2497E-86
CXCL8	7.98044624	2.99646942	6.9526E-64	2.1073E-61
LYPD3	7.79237086	2.96206234	1.7501E-28	1.3339E-26
DUSP1	7.61872868	2.92955028	3.7379E-64	1.1882E-61
ABCB4	7.60092588	2.92617517	2.2073E-28	1.6629E-26
gene:ENSG00000183889	7.57857394	2.9219264	1.0786E-06	1.1401E-05
PRDM1	7.5654252	2.91942117	2.3233E-52	5.3123E-50
HBEGF	7.50555955	2.90795963	4.4568E-57	1.1389E-54
WNT7A	7.50068946	2.90702321	2.0757E-33	2.0039E-31
STX11	7.46613251	2.90036111	3.1304E-18	1.3077E-16
TGFB2	7.44989215	2.89721954	9.4355E-10	1.68E-08
EGR1	7.41841996	2.89111194	8.976E-101	1.2998E-97
NWD2	-7.40829603	-2.88914175	0.01091507	0.03781397
ZNF485	-7.54790162	-2.91607562	0.00528728	0.02069965
GATD3	-8.03888184	-3.00699484	0.00066768	0.00352162
GCHFR	-8.11248957	-3.02014472	7.2116E-05	0.00049914
GPD1	-8.25334733	-3.04497936	0.00332253	0.01402175
CNKSR3	-8.55233087	-3.09631767	2.3314E-19	1.0813E-17
CLDN18	-8.93469961	-3.15941923	1.0423E-44	1.7416E-42
RSAD2	-9.03424552	-3.17540412	0.00026624	0.00157725
MDP1	-9.66214539	-3.27234356	0.0014562	0.00692826
ZNF568	-9.9976585	-3.32159025	0.01470744	0.04819766
gene:ENSG00000283580	-9.99907195	-3.3217942	0.01416554	0.04675094
ABCC2	-11.9084841	-3.57391787	2.9925E-12	7.1825E-11
SCO2	-15.0092488	-3.90777987	9.0453E-08	1.198E-06
SLC52A1	-17.4749799	-4.12721889	5.3556E-07	6.038E-06
DDC	-18.5389513	-4.21248773	0.00120134	0.00587286
APOA4	-19.5439403	-4.28864946	1.3862E-05	0.00011391
NELL2	-21.9776901	-4.45796786	0.00075001	0.00389439
ALDOB	-22.1897694	-4.47182277	6.557E-126	1.424E-122
RBP2	-23.6365779	-4.56294927	8.3952E-10	1.5154E-08
CHP2	-24.5846306	-4.61968477	0.00048245	0.00266768
MAF	-25.2995875	-4.66104196	0.00033897	0.00194615
CYP3A4	-26.8792385	-4.74842036	6.7173E-88	5.1498E-85
A1CF	-27.0870781	-4.75953287	0.00021207	0.00129762
ANPEP	-58.1647403	-5.86207295	3.2485E-50	7.0563E-48
CA1	-58.2019437	-5.86299543	3.2277E-06	3.0886E-05
HMGCS2	-76.5893388	-6.25907168	0.00952316	0.03375915
G6PC1	-83.3646725	-6.38136424	0.00819225	0.02984892
SI	-115.780899	-6.85525346	6.5425E-17	2.486E-15

## 5 Anhang

**Tabelle A38: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_161200	actin 2 protein, putative	17.3171969	4.11413352	1.8036E-63	6.8906E-60
EHI_143430	60S ribosomal protein L39, putative	17.1046964	4.0963206	3.6485E-39	1.8585E-36
EHI_181610	hypothetical protein	13.5837142	3.76380611	1.8218E-28	3.9772E-26
EHI_036560	hypothetical protein	10.9600197	3.45417849	2.7681E-10	1.195E-08
EHI_092470	60S ribosomal protein L40, putative	8.29132945	3.05160345	5.3683E-53	8.2038E-50
EHI_068480	hypothetical protein	7.64467455	2.93445508	2.7401E-33	1.102E-30
EHI_119590	60S ribosomal protein L40, putative	7.43516815	2.89436537	2.6622E-90	2.0342E-86
EHI_009500	hypothetical protein	6.19702578	2.63157597	3.5199E-31	1.0758E-28
EHI_027570	hypothetical protein	5.94966128	2.57280754	2.7001E-10	1.1723E-08
EHI_148580	choline/ethanolamine kinase, putative	5.76926023	2.52838634	1.5326E-19	1.7743E-17
EHI_039610	cysteine proteinase, putative	5.28173243	2.40101122	2.5823E-44	1.9731E-41
EHI_126030	hypothetical protein	5.25485929	2.39365213	8.9153E-10	3.5114E-08
EHI_197980	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family	5.16037018	2.36747456	2.1371E-07	5.5544E-06
EHI_063550	myb-like DNA-binding domain containing protein	5.11690841	2.35527241	2.2362E-11	1.1467E-09
EHI_153540	hypothetical protein	5.0320913	2.3311581	7.8951E-09	2.6812E-07
EHI_150460	hypothetical protein	4.94316029	2.30543369	4.3397E-07	1.0395E-05
EHI_027330	hypothetical protein	4.94202634	2.3051027	5.1775E-05	0.00074785
EHI_120900	calcium-binding protein 1 (EhCBP1)	4.93804804	2.30394087	1.3581E-54	3.459E-51
EHI_006040	hypothetical protein	4.88255794	2.28763716	1.8481E-23	3.0045E-21
EHI_054480	hypothetical protein	4.87784877	2.28624503	5.8603E-23	8.6113E-21
EHI_124540	hypothetical protein	4.85630178	2.27985808	9.5007E-09	3.184E-07
EHI_155380	hypothetical protein	4.83913443	2.27474902	1.4713E-08	4.7713E-07
EHI_048140	hypothetical protein	4.80511118	2.26456981	4.6139E-45	3.9172E-42
EHI_155240	casein kinase, putative	4.80114742	2.26337923	3.8336E-10	1.6095E-08
EHI_074010	hypothetical protein	4.74380411	2.24604444	7.325E-15	5.6535E-13
EHI_114950	hypothetical protein, conserved	4.63476535	2.2124963	5.04E-12	2.8526E-10
EHI_010260	hypothetical protein	4.57624293	2.19416364	1.547E-16	1.4241E-14
EHI_194730	mucin-like protein 1 precursor, putative	4.57280164	2.19307834	1.0484E-11	5.6018E-10
EHI_200240	hypothetical protein	4.56211775	2.18970368	9.9442E-09	3.2752E-07
EHI_010850	cysteine proteinase, putative	4.54532343	2.18438296	2.8943E-42	1.7012E-39
EHI_045140	hypothetical protein	4.53836735	2.18217339	1.4737E-08	4.7713E-07
EHI_126250	ribosomal protein S29, putative	4.4317518	2.14787708	2.665E-33	1.102E-30
EHI_048990	60S ribosomal protein L37	4.41635171	2.14285507	1.2016E-45	1.3116E-42
EHI_180000	eukaryotic translation initiation factor 4E, putative	4.40805013	2.14014063	5.2067E-11	2.518E-09
EHI_022010	hypothetical protein	4.31422288	2.10910071	1.71E-18	1.8403E-16
EHI_045450	Ras family GTPase	4.17327463	2.06117986	2.8286E-06	5.6876E-05
EHI_050270	UDP-N-acetylglucosamine transporter, putative	4.1415627	2.05017523	5.6892E-17	5.5027E-15
EHI_118250	hypothetical protein	4.13297909	2.04718206	0.0004023	0.00446152
EHI_004930	hypothetical protein	3.97714468	1.99173305	0.00074325	0.00735642
EHI_030070	hypothetical protein	3.97302872	1.99023922	7.245E-12	3.9262E-10
EHI_012420	myb-like DNA-binding domain containing protein	3.97208817	1.98989765	1.4593E-22	2.1039E-20

## 5 Anhang

EHI_194390	Rho family GTPase	3.88506856	1.95794006	6.2158E-22	8.4812E-20
EHI_021450	40S ribosomal protein S28, putative	3.882054	1.95682019	3.9162E-16	3.3622E-14
EHI_023340	leucine-rich repeat containing protein	3.84590678	1.94332379	6.402E-11	3.0384E-09
EHI_148690	hypothetical protein	3.84061716	1.94133816	8.6191E-07	1.9313E-05
EHI_170340	60S ribosomal protein L40, putative	3.83768452	1.94023612	3.737E-26	7.5144E-24
EHI_150140	hypothetical protein	3.82390662	1.93504729	0.00447605	0.03160954
EHI_099230	hypothetical protein, conserved	3.8107713	1.93008303	7.1395E-11	3.3675E-09
EHI_183410	hypothetical protein	3.79310341	1.9233787	0.00062587	0.00642777
EHI_022930	hypothetical protein	3.7903303	1.92232357	0.00034694	0.00399238
EHI_137740	hypothetical protein	3.74930304	1.90662244	1.8166E-06	3.8133E-05
EHI_113590	hypothetical protein	3.7296992	1.89905928	4.6161E-46	5.8786E-43
EHI_153520	hypothetical protein	3.71349733	1.89277854	6.8103E-08	1.9563E-06
EHI_038920	DNA topoisomerase III, putative	3.69215534	1.88446325	1.1369E-10	5.233E-09
EHI_037230	chaperone protein dnaK, putative	-3.70900354	-1.89103165	6.1918E-09	2.1803E-07
EHI_144390	hypothetical protein	-3.77827134	-1.91772631	0.00021897	0.00270301
EHI_099740	Flap nuclease, putative	-3.77977816	-1.91830156	0.00073784	0.0073219
EHI_035790	hypothetical protein	-3.78103386	-1.91878077	3.7217E-06	7.2545E-05
EHI_122710	hypothetical protein, conserved	-3.88177016	-1.9567147	7.3517E-09	2.5304E-07
EHI_176580	AIG1 family protein, putative	-3.88228914	-1.95690757	0.00344749	0.0261215
EHI_183460	elongation factor 1 beta, putative	-3.88304437	-1.95718819	1.162E-06	2.5515E-05
EHI_007000	hypothetical protein	-3.9592183	-1.98521562	1.4798E-12	9.0457E-11
EHI_021560	thioredoxin, putative	-4.04869274	-2.01745616	6.6925E-24	1.1117E-21
EHI_133900	galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative	-4.08483305	-2.03027711	1.7573E-42	1.119E-39
EHI_052720	hypothetical protein	-4.13899195	-2.04927944	1.8027E-05	0.00028999
EHI_194600	molybdenum cofactor sulfuryase, putative	-4.14449103	-2.05119494	7.3122E-19	7.9818E-17
EHI_052860	heat shock protein 70, putative	-4.2129828	-2.07484203	5.3673E-37	2.5632E-34
EHI_089670	AIG1 family protein	-4.26224987	-2.09161517	1.3148E-07	3.5752E-06
EHI_157360	AIG1 family protein, putative	-4.26426354	-2.0922966	3.1101E-06	6.2211E-05
EHI_074750	Ras family GTPase	-4.30393595	-2.10565661	0.00151978	0.01327161
EHI_164430	actinin-like protein, putative	-4.33233722	-2.11514554	1.0567E-25	1.9225E-23
EHI_126220	zinc finger protein, putative	-4.334107	-2.11573477	2.3741E-06	4.8633E-05
EHI_098080	hypothetical protein	-4.45128841	-2.15422298	5.7198E-05	0.00081387
EHI_099760	hypothetical protein, conserved	-4.47632509	-2.16231482	1.8081E-05	0.00029025
EHI_159670	hypothetical protein	-4.48561725	-2.16530652	5.2759E-05	0.00076062
EHI_086380	hypothetical protein	-4.55075227	-2.18610505	0.00036193	0.00412373
EHI_047730	glucose-6-phosphate isomerase, putative	-4.55778956	-2.18833431	1.6437E-30	4.8306E-28
EHI_141890	zinc finger protein containing CCHC type domain	-4.64909411	-2.21694963	0.00098	0.009188
EHI_144610	methionine gamma-lyase	-4.71368601	-2.23685566	2.6648E-10	1.1635E-08
EHI_165780	RNA recognition motif domain containing protein	-4.77699998	-2.25610487	2.7222E-07	6.8876E-06
EHI_101730	surface antigen ariel1, putative	-4.80575219	-2.26476226	0.00019769	0.00246421
EHI_180420	hypothetical protein, conserved	-4.82632601	-2.27092537	9.767E-09	3.2554E-07
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-4.9881201	-2.3184962	2.59E-25	4.3979E-23
EHI_114770	hypothetical protein	-5.08943946	-2.34750677	9.5229E-11	4.41E-09
EHI_112830	hypothetical protein	-5.17745398	-2.37224282	6.0232E-29	1.3946E-26
EHI_051870	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type, putative	-5.2025044	-2.37920628	3.6637E-05	0.0005457

## 5 Anhang

EHI_023300	TPR repeat protein	-5.50958421	-2.46194345	2.3278E-33	1.0463E-30
EHI_150390	aspartate ammonia-lyase, putative	-5.56799201	-2.47715714	3.0602E-30	8.6604E-28
EHI_095850	hypothetical protein, conserved	-5.5703389	-2.4777651	2.0007E-10	8.9401E-09
EHI_151510	hypothetical protein	-6.16923057	-2.62509057	0.00041034	0.00453096
EHI_068570	hypothetical protein	-6.17506245	-2.62645373	0.00221974	0.01829668
EHI_178850	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type, putative	-6.18775557	-2.62941621	3.2092E-31	1.0217E-28
EHI_004550	hypothetical protein	-6.2342285	-2.64021103	1.4291E-29	3.5225E-27
EHI_050290	SGS domain protein	-6.50637675	-2.70185436	0.00138967	0.01236146
EHI_045340	glutamate synthase beta subunit, putative	-6.53394038	-2.70795329	9.561E-13	5.9882E-11
EHI_102270	heat shock protein 90, putative	-6.89804088	-2.78618668	8.9952E-17	8.4855E-15
EHI_060340	cysteine synthase A, putative	-7.23414063	-2.85482164	1.7831E-08	5.7006E-07
EHI_176700	AIG1 family protein, putative	-7.40372766	-2.88825183	1.1487E-09	4.4782E-08
EHI_155570	glutamyl-tRNA synthetase, putative	-9.32780155	-3.2215371	7.8424E-40	4.2803E-37
EHI_144270	AIG1 family protein	-10.5151473	-3.39439716	5.8557E-17	5.5929E-15

**Tabelle A39: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_161200	actin 2 protein, putative	12.3652764	3.62822258	3.8758E-11	2.1364E-09
EHI_068480	hypothetical protein	11.6248978	3.53914612	7.514E-64	1.4496E-60
EHI_039610	cysteine proteinase, putative	10.2648634	3.35964252	2.1123E-94	1.63E-90
EHI_150970	hypothetical protein	9.35318617	3.2254579	1.1903E-14	9.8767E-13
EHI_143430	60S ribosomal protein L39, putative	8.0213829	3.00385098	1.1505E-23	2.0178E-21
EHI_022010	hypothetical protein	6.9629898	2.79970691	8.9058E-49	1.1454E-45
EHI_009500	hypothetical protein	6.94891615	2.79678797	3.145E-48	3.4671E-45
EHI_010850	cysteine proteinase, putative	6.48139629	2.69630465	1.5286E-65	3.932E-62
EHI_174250	S-adenosylmethionine synthetase, putative	5.86812204	2.55289888	4.0355E-39	2.5952E-36
EHI_083410	ubiquitin, putative	5.81380641	2.53948303	1.4254E-47	1.3749E-44
EHI_124540	hypothetical protein	5.77935803	2.53090925	1.0136E-08	3.9111E-07
EHI_065710	hypothetical protein	5.71007608	2.51350997	1.123E-23	2.0154E-21
EHI_083270	ubiquitin, putative	5.4823905	2.45480509	8.7084E-46	6.7203E-43
EHI_158220	hypothetical protein	5.33344105	2.41506664	4.1935E-45	2.9419E-42
EHI_048140	hypothetical protein	5.31554607	2.41021791	4.9414E-78	1.9067E-74
EHI_027570	hypothetical protein	5.22029381	2.38413101	1.2981E-07	4.0232E-06
EHI_053170	RNA-binding protein, putative	5.19569831	2.37731766	4.9443E-63	7.6311E-60
EHI_062680	hypothetical protein	5.17936944	2.37277647	5.1193E-13	3.7624E-11
EHI_092470	60S ribosomal protein L40, putative	5.16411468	2.36852104	9.6694E-28	2.2612E-25
EHI_021390	hypothetical protein	5.02199449	2.32826045	2.3083E-11	1.3294E-09
EHI_054480	hypothetical protein	4.95102686	2.30772778	3.9538E-20	5.2606E-18
EHI_142060	zinc finger domain containing protein	4.93556758	2.303216	2.0142E-09	8.6352E-08
EHI_114950	hypothetical protein, conserved	4.90358747	2.29383761	2.7683E-13	2.0741E-11
EHI_198550	glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase. putative	4.87667397	2.28589752	1.0056E-12	6.9291E-11
EHI_006040	hypothetical protein	4.76533619	2.252578	9.0814E-16	8.2448E-14
EHI_035100	hypothetical protein	4.62871796	2.21061266	7.8649E-06	0.00015724

## 5 Anhang

EHI_113590	hypothetical protein	4.52048207	2.17647663	1.0432E-33	4.0253E-31
EHI_148580	choline/ethanolamine kinase, putative	4.52003295	2.17633329	5.1963E-12	3.208E-10
EHI_113980	hypothetical protein	4.46263838	2.15789691	1.565E-09	6.8621E-08
EHI_119590	60S ribosomal protein L40, putative	4.43840667	2.15004186	1.7989E-28	4.6274E-26
EHI_153540	hypothetical protein	4.4302753	2.14739635	1.0381E-06	2.5842E-05
EHI_114190	hypothetical protein	4.33841101	2.11716674	1.2829E-11	7.6157E-10
EHI_138060	hypothetical protein, conserved domain containing	4.30050797	2.10450708	1.3778E-14	1.1192E-12
EHI_110500	beta-N-acetylhexosaminidase, putative	4.2724391	2.09505993	5.5247E-16	5.1366E-14
EHI_183000	Gal/GalNAc lectin Igl2, putative	4.2103364	2.07393551	3.2002E-26	6.6746E-24
EHI_010260	hypothetical protein	4.18039841	2.06364044	2.1335E-10	1.0904E-08
EHI_048680	60S ribosomal protein L12, putative	4.13754788	2.04877601	0.00065523	0.00702276
EHI_197000	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate3-phosphatase, putative	4.12864872	2.04566968	1.3065E-07	4.0329E-06
EHI_023400	Ribosomal protein S30, putative	4.10628993	2.03783549	3.2628E-06	7.194E-05
EHI_049400	chaperone proteinDNAJ, putative	4.06785153	2.02426703	1.2864E-16	1.2566E-14
EHI_156440	hypothetical protein	4.03047915	2.01095136	6.7629E-05	0.00103962
EHI_050270	UDP-N-acetylglucosamine transporter, putative	3.94872241	1.98138595	3.209E-18	3.7521E-16
EHI_197560	hypothetical protein	3.93564102	1.97659864	2.8496E-05	0.00049417
EHI_155680	hypothetical protein	3.89673274	1.96226499	1.6286E-24	3.2226E-22
EHI_044950	hypothetical protein	3.87624935	1.95466138	0.00033829	0.00401013
EHI_120300	hypothetical protein	3.79960714	1.92585026	8.8418E-17	8.7477E-15
EHI_063550	myb-like DNA-binding domain containing protein	3.75240768	1.90781658	6.3902E-08	2.0984E-06
EHI_048990	60S ribosomal protein L37	3.73088091	1.89951631	2.1095E-35	9.0441E-33
EHI_058800	hypothetical protein	3.69843514	1.88691498	0.00192406	0.01726512
EHI_155380	hypothetical protein	3.69072374	1.88390375	8.5525E-05	0.00128319
EHI_194060	CAAX amino terminal protease family	3.67814372	1.87897785	0.00056919	0.00625698
EHI_126250	ribosomal protein S29, putative	3.67772096	1.87881202	1.7467E-13	1.3215E-11
EHI_023260	nicotinate phosphoribosyltransferase, putative	-3.69102328	-1.88402084	4.23E-06	9.0174E-05
EHI_112830	hypothetical protein	-3.72314877	-1.89652327	5.976E-17	6.068E-15
EHI_125950	alcohol dehydrogenase, putative	-3.76778162	-1.91371535	2.117E-34	8.5983E-32
EHI_080880	hypothetical protein	-3.79901115	-1.92562395	7.4423E-12	4.4869E-10
EHI_052720	hypothetical protein	-3.86956702	-1.95217215	0.00058101	0.00635978
EHI_165780	RNA recognition motif domain containing protein	-3.87624793	-1.95466085	5.6209E-06	0.00011567
EHI_060340	cysteine synthase A, putative	-3.89951061	-1.96329308	2.849E-05	0.00049417
EHI_172960	ARP2/3 complex 21 kDa subunit, putative	-3.96585034	-1.98763024	0.00049781	0.00559183
EHI_180420	hypothetical protein, conserved	-3.96908237	-1.9888055	6.1032E-06	0.00012526
EHI_103390	hypothetical protein	-3.98351286	-1.99404123	0.0028927	0.02431699
EHI_167310	grainin 2	-4.01057742	-2.00380996	1.4661E-24	2.9774E-22
EHI_007000	hypothetical protein	-4.04147415	-2.01488162	4.5565E-09	1.8905E-07
EHI_017010	hypothetical protein	-4.10475214	-2.03729511	0.0022846	0.02005716
EHI_097910	hypothetical protein	-4.15420893	-2.05457378	0.00600921	0.04420697
EHI_099670	hypothetical protein, conserved	-4.18653776	-2.06575764	9.1753E-05	0.00135382
EHI_194600	molybdenum cofactor sulfurase, putative	-4.24596812	-2.08609354	2.1009E-12	1.4098E-10
EHI_163480	90 kDa heat shock protein, putative	-4.24761259	-2.08665219	1.0897E-30	3.3636E-28

## 5 Anhang

EHI_077750	hypothetical protein	-4.27083816	-2.09451923	3.025E-06	6.7469E-05
EHI_096750	alanine aminotransferase, putative	-4.2741516	-2.09563808	3.4729E-05	0.00058135
EHI_102270	heat shock protein 90, putative	-4.31890076	-2.11066417	1.0309E-22	1.6235E-20
EHI_042690	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-4.45326077	-2.15486209	0.00359028	0.02910316
EHI_131360	surface antigen ariel1, putative	-4.57635735	-2.19419971	4.8788E-12	3.0362E-10
EHI_112870	fatty acid elongase, putative	-4.5989108	-2.20129221	0.0002958	0.00362906
EHI_101730	surface antigen ariel1, putative	-4.72142471	-2.23922227	7.7831E-05	0.00118465
EHI_104360	nucleoside diphosphate kinase, putative	-4.75811656	-2.25039062	3.5518E-12	2.2841E-10
EHI_111040	DEAD/DEAH box helicase, putative	-4.85240051	-2.27869863	0.00015995	0.00213898
EHI_176580	AIG1 family protein, putative	-5.07188391	-2.34252172	0.001562	0.01444258
EHI_178850	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type, putative	-5.15223638	-2.36519879	4.5923E-23	7.5402E-21
EHI_109870	hypothetical protein	-5.18844275	-2.3753016	9.8808E-05	0.00142524
EHI_144390	hypothetical protein	-5.19188636	-2.37625881	0.00010484	0.00149823
EHI_047730	glucose-6-phosphate isomerase, putative	-5.27640427	-2.39955511	8.7774E-24	1.6127E-21
EHI_068570	hypothetical protein	-5.46979751	-2.45148743	0.00370016	0.0297998
EHI_189540	hypothetical protein	-5.4883689	-2.45637745	5.7694E-08	1.9274E-06
EHI_183460	elongation factor 1 beta, putative	-5.56653599	-2.47677983	1.2483E-07	3.8843E-06
EHI_097870	hypothetical protein, conserved	-5.76482971	-2.52727799	3.1912E-05	0.00054605
EHI_004550	hypothetical protein	-5.77561564	-2.52997474	3.3973E-19	4.2978E-17
EHI_184520	hypothetical protein	-5.79970418	-2.53597932	0.00014246	0.00194236
EHI_074750	Ras family GTPase	-5.85440378	-2.54952225	0.00237394	0.02074713
EHI_035820	hypothetical protein, conserved	-5.99301872	-2.58328288	3.3262E-06	7.2878E-05
EHI_028880	geranylgeranyl pyrophosphate synthetase, putative	-5.99899575	-2.58472101	5.1708E-09	2.1113E-07
EHI_183280	DnaJ family protein	-6.04312966	-2.5952959	9.4094E-05	0.00137523
EHI_080200	surface antigen ariel1, putative	-6.1839117	-2.62851972	1.5253E-10	7.9532E-09
EHI_155570	glutamyl-tRNA synthetase, putative	-6.37684644	-2.67284314	3.96E-28	9.5499E-26
EHI_150390	aspartate ammonia-lyase, putative	-7.45294793	-2.89781118	1.9389E-27	4.4008E-25
EHI_095850	hypothetical protein, conserved	-7.56513277	-2.9193654	3.9623E-10	1.8759E-08
EHI_157360	AIG1 family protein, putative	-9.6276283	-3.26718044	6.2937E-08	2.0756E-06
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-9.63337162	-3.26804082	2.521E-20	3.474E-18
EHI_089670	AIG1 family protein	-16.7410507	-4.06531817	3.9375E-08	1.3505E-06

**Tabelle A40: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten B2P Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_161200	actin 2 protein, putative	33.5896861	5.06994641	2.7193E-37	1.5726E-34
EHI_143430	60S ribosomal protein L39, putative	23.4468959	4.55132504	2.541E-30	9.0968E-28
EHI_014170	hypothetical protein	16.1060053	4.00952681	5.6562E-82	4.2523E-78
EHI_079300	long-chain-fatty-acid--CoA ligase, putative	14.3517643	3.84315619	8.0088E-73	3.0105E-69
EHI_041465	AIG family protein	8.56826996	3.09900394	4.9263E-25	9.7464E-23
EHI_182800	hypothetical protein	8.21033142	3.03744046	3.4435E-16	2.7837E-14
EHI_181610	hypothetical protein	7.69441455	2.94381156	8.3569E-17	7.1394E-15
EHI_035100	hypothetical protein	7.62910018	2.93151291	1.1544E-11	4.7167E-10
EHI_120900	calcium-binding protein 1 (EhCBP1)	7.55038748	2.91655068	1.4785E-37	9.2628E-35

## 5 Anhang

EHI_068480	hypothetical protein	7.20694704	2.84938824	9.8412E-66	2.4662E-62
EHI_092470	60S ribosomal protein L40, putative	6.19848385	2.63191538	3.4394E-22	5.6212E-20
EHI_065250	Lecithin:cholesterol acyltransferase, putative	5.91264148	2.5638028	1.2577E-37	8.5957E-35
EHI_089100	mucin-like protein 1 precursor, putative	5.85118592	2.54872906	3.1189E-14	1.9844E-12
EHI_152780	hypothetical protein	5.77791815	2.53054977	7.1588E-21	1.0764E-18
EHI_180390	AIG1 family protein, putative	5.64501948	2.49697856	9.9925E-39	8.3471E-36
EHI_174250	S-adenosylmethionine synthetase, putative	5.57237549	2.47829248	1.038E-42	1.1148E-39
EHI_194730	mucin-like protein 1 precursor, putative	5.11136589	2.35370887	1.781E-18	1.8094E-16
EHI_009500	hypothetical protein	5.07328912	2.34292138	7.2713E-28	2.1866E-25
EHI_124540	hypothetical protein	5.04874869	2.33592587	7.0179E-08	1.4779E-06
EHI_182660	hypothetical protein	4.81698555	2.26813059	3.8767E-11	1.45E-09
EHI_189960	ADP-ribosylation factor 1, putative	4.81086306	2.26629573	1.5704E-17	1.4758E-15
EHI_183000	Gal/GalNAc lectin IgI2, putative	4.72931516	2.24163129	5.239E-27	1.2705E-24
EHI_103550	clathrin adaptor complex, small chain, putative	4.66818366	2.22286132	1.5778E-05	0.00018829
EHI_095300	hypothetical protein	4.65784107	2.21966141	1.8178E-07	3.5498E-06
EHI_010260	hypothetical protein	4.59974255	2.20155311	3.5662E-13	1.8238E-11
EHI_074750	Ras family GTPase	4.5393748	2.18249361	6.2908E-06	8.3706E-05
EHI_166860	hypothetical protein	4.41957734	2.14390841	5.083E-07	8.7247E-06
EHI_183230	hypothetical protein	4.38285445	2.13187077	2.2376E-07	4.2481E-06
EHI_158220	hypothetical protein	4.37697813	2.12993518	9.7252E-28	2.8055E-25
EHI_049430	protein tyrosine phosphatase, putative	4.24703692	2.08645665	1.5254E-13	8.4325E-12
EHI_062680	hypothetical protein	4.21523195	2.07561202	1.1061E-09	3.174E-08
EHI_048170	Protein transport protein SEC61 gamma subunit, putative	4.11447703	2.04070907	0.00015517	0.00134712
EHI_050140	casein kinase, putative	4.05333252	2.01910853	3.3918E-13	1.7586E-11
EHI_004490	thioredoxin, putative	4.04916951	2.01762604	3.3294E-28	1.0429E-25
EHI_083410	ubiquitin, putative	4.03759204	2.01349515	6.5433E-19	7.5681E-17
EHI_105080	zinc finger protein, putative	4.02684428	2.00964968	1.2097E-11	4.9161E-10
EHI_067980	hypothetical protein	3.85963864	1.94846578	1.2635E-07	2.5536E-06
EHI_188130	LSM domain containing protein	3.81714485	1.93249394	1.2624E-06	2.0065E-05
EHI_197000	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate3-phosphatase, putative	3.77385378	1.91603853	1.5565E-08	3.7386E-07
EHI_083270	ubiquitin, putative	3.72799059	1.89839822	4.3802E-17	3.9203E-15
EHI_153030	hypothetical protein	3.69057693	1.88384636	1.5656E-16	1.3225E-14
EHI_052740	dynammin-like protein	3.6852572	1.88176531	1.3191E-24	2.5428E-22
EHI_024990	hypothetical protein	3.6112261	1.85248875	3.8402E-07	6.8577E-06
EHI_021280	LIM zinc finger domain containing protein	-3.60958443	-1.85183275	0.00269902	0.01524508
EHI_115710	calmodulin-dependent calcineurin A subunit,gamma isoform, putative	-3.64971369	-1.86778329	0.00170851	0.01035424
EHI_098850	protein phosphatase regulatory subunit, putative	-3.65396463	-1.86946267	0.00241682	0.01382775
EHI_041580	hypothetical protein, conserved	-3.71619829	-1.89382748	0.00326201	0.01773231
EHI_152000	Legume-like lectin family protein, membrane-bound	-3.77950415	-1.91819697	0.00033843	0.00260154
EHI_095050	hypothetical protein, conserved	-3.81759049	-1.93266235	6.0243E-17	5.2663E-15
EHI_169830	hypothetical protein, conserved	-3.84972064	-1.94475376	6.1747E-05	0.00061242
EHI_080880	hypothetical protein	-3.85227637	-1.94571121	6.8473E-16	5.4187E-14
EHI_180420	hypothetical protein, conserved	-3.94231868	-1.9790444	1.0605E-05	0.00013234
EHI_008210	ribosomal protein S4, putative	-3.94510654	-1.98006426	5.1496E-22	8.2372E-20

## 5 Anhang

EHI_094010	hypothetical protein	-3.95677925	-1.98432658	1.0614E-05	0.00013234
EHI_144270	AIG1 family protein	-4.00198699	-2.00071648	3.2745E-11	1.2309E-09
EHI_065870	RNA-binding protein, putative	-4.02644185	-2.0095055	0.00253997	0.01447724
EHI_095850	hypothetical protein, conserved	-4.02739807	-2.00984808	1.2138E-13	6.9658E-12
EHI_006730	hypothetical protein	-4.02941533	-2.01057052	0.00158327	0.0097088
EHI_107660	hypothetical protein, conserved	-4.0296357	-2.01064942	8.058E-05	0.0007649
EHI_183280	DnaJ family protein	-4.06330511	-2.0226537	0.00015743	0.00135606
EHI_092730	ADP-ribosylation factor 1, putative	-4.08703247	-2.03105371	7.4945E-05	0.00072608
EHI_098230	hypothetical protein, conserved	-4.09681506	-2.03450277	0.00685228	0.0325841
EHI_072740	hypothetical protein	-4.11711471	-2.04163364	3.8092E-06	5.3729E-05
EHI_042370	galactose-specific adhesin 170kD subunit, putative	-4.20120712	-2.07080391	1.9482E-25	4.0685E-23
EHI_150390	aspartate ammonia-lyase, putative	-4.21727922	-2.07631254	1.9784E-23	3.7183E-21
EHI_098730	ribosomal RNA methyltransferase, putative	-4.22713655	-2.07968072	0.00565018	0.02769103
EHI_153330	40S ribosomal protein S12, putative	-4.27160678	-2.09477885	2.4617E-23	4.4064E-21
EHI_170330	RIO1 family protein	-4.31640645	-2.10983072	3.2413E-05	0.00035265
EHI_007000	hypothetical protein	-4.31830584	-2.11046542	4.0141E-13	2.0254E-11
EHI_039210	tRNA -methyltransferase catalytic subunit, putative	-4.38517972	-2.13263597	5.9734E-06	7.9908E-05
EHI_151400	cysteine proteinase, putative	-4.47001419	-2.16027941	0.00044021	0.00328978
EHI_164740	hypothetical protein	-4.48798394	-2.16606751	1.626E-12	7.4995E-11
EHI_045930	hypothetical protein	-4.5366143	-2.18161601	7.757E-06	0.00010107
EHI_120350	hypothetical protein	-4.55759117	-2.18827152	4.1957E-07	7.3356E-06
EHI_141810	hypothetical protein	-4.56831687	-2.19166272	0.01143473	0.04998042
EHI_178850	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type, putative	-4.78385357	-2.25817323	3.7689E-27	9.4448E-25
EHI_040600	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase, putative	-4.80036673	-2.26314463	2.5389E-05	0.00028617
EHI_120600	hypothetical protein	-4.83134028	-2.27242347	2.2425E-59	3.3718E-56
EHI_014030	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha, putative	-4.84161531	-2.27548845	2.9364E-26	6.5975E-24
EHI_186970	hypothetical protein, conserved	-4.95955937	-2.31021195	0.00016248	0.00138496
EHI_118440	beta-amylase, putative	-4.96909435	-2.31298294	3.0789E-12	1.3778E-10
EHI_012440	hypothetical protein	-5.04043389	-2.33354793	1.6145E-05	0.00019236
EHI_189540	hypothetical protein	-5.06642497	-2.3409681	5.5892E-12	2.374E-10
EHI_043240	glycogen phosphorylase, putative	-5.25954263	-2.39493735	4.3206E-07	7.519E-06
EHI_160670	alcohol dehydrogenase 3, putative	-5.26201446	-2.39561521	2.1774E-11	8.352E-10
EHI_025710	iron-sulfur flavoprotein, putative	-5.31649155	-2.4104745	7.9838E-06	0.00010367
EHI_099760	hypothetical protein, conserved	-5.74607257	-2.52257621	5.4093E-09	1.4121E-07
EHI_073580	leucine-rich repeat containing protein	-5.80169468	-2.53647437	2.1127E-06	3.1577E-05
EHI_126220	zinc finger protein, putative	-5.88807188	-2.55779528	1.8439E-06	2.7892E-05
EHI_151510	hypothetical protein	-5.96171811	-2.57572816	2.4363E-05	0.0002771
EHI_112830	hypothetical protein	-5.96679607	-2.57695647	1.6774E-36	7.8819E-34
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-6.02915205	-2.59195511	2.9001E-32	1.1475E-29
EHI_152180	RNA recognition motif domain containing protein	-6.3026022	-2.65594761	8.1827E-05	0.00077478
EHI_164430	actinin-like protein, putative	-6.4479851	-2.68884841	1.6896E-34	7.4721E-32
EHI_045340	glutamate synthase beta subunit, putative	-6.62475586	-2.72786729	1.5645E-18	1.6733E-16
EHI_126560	AIG1 family protein, putative	-6.70034055	-2.74423442	0.00116838	0.00750761
EHI_004820	hypothetical protein	-6.93667666	-2.79424464	0.00102377	0.00674559
EHI_079720	DnaJ family protein	-8.06090065	-3.01094104	8.4472E-07	1.3866E-05

## 5 Anhang

EHI_116830	D-phosphoglycerate dehydrogenase	-10.4032524	-3.37896273	1.4569E-15	1.1064E-13
EHI_184520	hypothetical protein	-11.5545957	-3.53039488	2.8639E-05	0.0003185

**Tabelle A41: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit humanen Epithelzellen aus Kolonsphäroiden inkubierten B2<sup>P</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_161200	actin 2 protein, putative	23.0514888	4.52678803	4.863E-36	8.8947E-34
EHI_068480	hypothetical protein	22.9743793	4.52195398	1.588E-220	6.099E-217
EHI_183000	Gal/GalNAc lectin IgI2, putative	17.9595224	4.16667708	1.227E-167	1.886E-164
EHI_143430	60S ribosomal protein L39, putative	15.6620425	3.96920047	4.508E-105	4.329E-102
EHI_014170	hypothetical protein	15.1095997	3.91739354	1.32E-241	1.014E-237
EHI_041465	AIG family protein	13.0367387	3.7045111	1.3242E-56	4.6238E-54
EHI_053820	hypothetical protein	11.5721273	3.53258219	4.3456E-05	0.0005282
EHI_101420	hypothetical protein, conserved	11.0483266	3.46575597	5.653E-22	6.1164E-20
EHI_174250	S-adenosylmethionine synthetase, putative	10.471851	3.38844457	3.121E-175	7.533E-172
EHI_101430	hypothetical protein, conserved	9.29356082	3.21623147	4.5351E-20	4.4665E-18
EHI_083270	ubiquitin, putative	8.90651654	3.15486128	3.922E-175	7.533E-172
EHI_083410	ubiquitin, putative	8.42539867	3.07474495	1.73E-165	2.215E-162
EHI_054480	hypothetical protein	7.66713796	2.93868814	5.771E-60	2.2166E-57
EHI_120900	calcium-binding protein 1 (EhCBP1)	7.59110744	2.92431037	1.3194E-65	6.7572E-63
EHI_009500	hypothetical protein	7.3319105	2.87418917	4.8268E-49	1.3243E-46
EHI_180390	AIG1 family protein, putative	6.6409501	2.73138966	4.888E-60	1.9763E-57
EHI_138060	hypothetical protein, conserved domain containing	6.58944072	2.72015602	2.8594E-41	5.7805E-39
EHI_052740	dynamamin-like protein	6.47529446	2.6949458	2.64E-120	2.897E-117
EHI_095310	hypothetical protein	6.40069362	2.67822825	4.7662E-06	7.2075E-05
EHI_065710	hypothetical protein	6.38901696	2.67559397	2.767E-48	7.3296E-46
EHI_193940	hypothetical protein	6.29541	2.65430034	8.6493E-05	0.00095192
EHI_105080	zinc finger protein, putative	6.25114226	2.64411983	1.2866E-19	1.2202E-17
EHI_062680	hypothetical protein	6.23414158	2.64019092	4.4383E-16	3.1864E-14
EHI_022270	hypothetical protein	6.06930103	2.60153038	1.9168E-11	8.3191E-10
EHI_163240	phosphatidate cytidyltransferase, putative	6.04067182	2.59470901	9.7387E-11	3.7594E-09
EHI_153540	hypothetical protein	5.79974493	2.53598945	1.3724E-08	3.4795E-07
EHI_092470	60S ribosomal protein L40, putative	5.77323781	2.52938065	1.8306E-27	2.4246E-25
EHI_170370	hypothetical protein	5.71326172	2.51431462	1.9327E-18	1.7264E-16
EHI_079300	long-chain-fatty-acid--CoA ligase, putative	5.67764247	2.505292	1.819E-44	4.1098E-42
EHI_197000	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate3-phosphatase, putative	5.65508208	2.49954796	8.5792E-15	5.5852E-13
EHI_028940	hypothetical protein	5.64107383	2.49596982	2.3053E-07	4.588E-06
EHI_119590	60S ribosomal protein L40, putative	5.61228295	2.48858775	1.4438E-32	2.3598E-30
EHI_158220	hypothetical protein	5.60855871	2.48763007	1.928E-103	1.646E-100
EHI_035100	hypothetical protein	5.37959582	2.42749778	2.1078E-10	7.674E-09
EHI_182660	hypothetical protein	5.22858063	2.38641936	2.406E-14	1.515E-12
EHI_114790	SNF7 family protein	5.2044789	2.37975372	4.8577E-34	8.481E-32
EHI_137740	hypothetical protein	5.12299273	2.35698684	1.8626E-12	9.4133E-11

## 5 Anhang

EHI_194730	mucin-like protein 1 precursor, putative	5.10415333	2.35167167	9.4746E-11	3.6783E-09
EHI_171450	hypothetical protein	4.98008742	2.31617107	2.1083E-07	4.2397E-06
EHI_022010	hypothetical protein	4.8067822	2.26507144	1.0385E-45	2.4176E-43
EHI_089100	mucin-like protein 1 precursor, putative	4.7981892	2.26249005	1.6526E-10	6.1331E-09
EHI_170340	60S ribosomal protein L40, putative	4.77254327	2.25475828	5.1734E-22	5.6775E-20
EHI_048990	60S ribosomal protein L37	4.76334652	2.25197551	8.5371E-33	1.4257E-30
EHI_021390	hypothetical protein	4.55648918	2.18792264	8.8027E-12	4.0013E-10
EHI_023400	Ribosomal protein S30, putative	4.47087726	2.16055794	0.00900273	0.04764879
EHI_177460	translation initiation factor eIF-5A, putative	4.33850918	2.11719938	0.0004906	0.00435195
EHI_027570	hypothetical protein	4.32923637	2.11411257	2.4853E-06	4.0534E-05
EHI_009480	immediate-early protein, putative	4.30563729	2.10622679	5.3996E-14	3.2155E-12
EHI_113980	hypothetical protein	4.300062	2.10435746	4.2755E-11	1.785E-09
EHI_056120	hypothetical protein	4.29901641	2.10400662	8.94E-06	0.00012718
EHI_161000	ser/thr protein phosphatase family protein	4.29765425	2.10354942	6.9264E-06	0.00010116
EHI_074160	UBX domain protein	4.25211828	2.08818173	1.3088E-10	5.0272E-09
EHI_054490	hypothetical protein	4.24126507	2.08449465	1.7627E-12	8.9676E-11
EHI_049620	Fe-S cluster assembly protein NifU, putative	4.23491239	2.08233212	3.6008E-88	2.7662E-85
EHI_053170	RNA-binding protein, putative	4.21674292	2.07612907	5.5358E-54	1.6356E-51
EHI_145840	peroxiredoxin	4.2097487	2.07373411	1.2971E-86	9.0584E-84
EHI_073160	hypothetical protein	4.20151398	2.07090928	0.00867149	0.04633966
EHI_082540	hypothetical protein	-4.22522007	-2.07902649	6.5872E-09	1.7693E-07
EHI_041910	hypothetical protein	-4.22934428	-2.080434	0.004512	0.02744354
EHI_014120	RNA recognition motif domain containing protein	-4.23173916	-2.0812507	6.4961E-05	0.00073931
EHI_118090	hypothetical protein	-4.26226653	-2.09162081	1.614E-10	6.019E-09
EHI_132390	hypothetical protein	-4.30869973	-2.10725256	0.00400458	0.0250923
EHI_152330	Arginase, putative	-4.3445307	-2.11920034	2.8672E-10	1.015E-08
EHI_151440	cysteine proteinase, putative	-4.42770949	-2.14656057	0.00360563	0.0228913
EHI_118440	beta-amylase, putative	-4.65930879	-2.22011595	4.8283E-07	9.1357E-06
EHI_157120	kinase, PfkB family	-4.68723273	-2.22873643	2.1195E-05	0.00027927
EHI_095850	hypothetical protein, conserved	-4.69305758	-2.23052816	4.5022E-11	1.8695E-09
EHI_152870	hypothetical protein, conserved	-4.75524401	-2.24951937	8.6564E-11	3.4102E-09
EHI_175060	hypothetical protein	-4.76411466	-2.25220814	0.00772361	0.04222045
EHI_112830	hypothetical protein	-4.77743826	-2.25623723	8.5149E-26	1.055E-23
EHI_035690	galactose-inhibitable lectin 35 kDa subunit precursor	-4.82204056	-2.26964379	3.9438E-67	2.164E-64
EHI_166490	alcohol dehydrogenase, putative	-4.90536955	-2.29436183	1.1379E-18	1.0284E-16
EHI_112870	fatty acid elongase, putative	-4.92394994	-2.29981609	3.456E-05	0.00042752
EHI_136470	hypothetical protein	-4.93893699	-2.30420056	1.7442E-07	3.573E-06
EHI_098500	tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase, putative	-4.94314476	-2.30542916	0.00011656	0.00123847
EHI_189540	hypothetical protein	-4.97493143	-2.31467664	7.6026E-07	1.3614E-05
EHI_133900	galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative	-5.08702135	-2.34682115	2.3019E-64	1.1052E-61
EHI_115360	hypothetical protein	-5.1001358	-2.35053566	0.00136785	0.01029166
EHI_007000	hypothetical protein	-5.13914492	-2.36152833	3.0851E-10	1.0773E-08
EHI_009800	phosphatidylserine synthase, putative	-5.33794342	-2.41628401	5.3547E-05	0.00062801
EHI_069730	hypothetical protein	-5.36321281	-2.4230975	0.00092135	0.00734392
EHI_068680	nucleolar phosphoprotein Nopp34, putative	-5.40815941	-2.43513768	0.00387162	0.0243785

## 5 Anhang

EHI_049690	galactose-specific adhesin light subunit, putative	-5.74379679	-2.52200471	9.4764E-55	2.9119E-52
EHI_159870	galactose-inhibitable lectin small subunit, putative	-5.76633768	-2.52765533	0.00051924	0.00455359
EHI_040370	hypothetical protein	-5.79093725	-2.53379686	0.00050309	0.00444732
EHI_073580	leucine-rich repeat containing protein	-5.82792995	-2.54298354	9.9195E-05	0.00107327
EHI_072740	hypothetical protein	-5.92410137	-2.56659633	4.4112E-06	6.7773E-05
EHI_120600	hypothetical protein	-5.96245786	-2.57590717	6.8714E-62	3.1051E-59
EHI_152180	RNA recognition motif domain containing protein	-5.98331374	-2.58094471	0.00222676	0.01546651
EHI_151800	ganglioside gm2 activator protein, putative	-5.98750557	-2.58195509	8.4946E-05	0.00093708
EHI_042370	galactose-specific adhesin 170kD subunit, putative	-5.99392703	-2.58350152	6.1649E-47	1.5277E-44
EHI_148290	thiamine pyrophosphokinase, putative	-6.17219955	-2.62578471	0.00183682	0.01312603
EHI_056500	START domain containing protein	-6.30563327	-2.65664127	0.0093293	0.04888518
EHI_046620	hypothetical protein	-6.3196541	-2.6598456	0.00928064	0.04869798
EHI_172850	surface antigen ariel1, putative	-6.52001745	-2.70487583	0.00833402	0.0448333
EHI_024240	aldehyde-alcohol dehydrogenase 2, putative	-6.52436	-2.70583639	7.0289E-12	3.2528E-10
EHI_012440	hypothetical protein	-6.7563015	-2.75623371	2.4356E-05	0.00031498
EHI_014030	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha, putative	-8.52845907	-3.0922851	2.1225E-44	4.6586E-42
EHI_025710	iron-sulfur flavoprotein, putative	-14.3771021	-3.84570101	0.00016379	0.00168669
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-16.5662212	-4.05017265	4.4308E-39	8.5094E-37

**Tabelle A42: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_148580	choline/ethanolamine kinase, putative	8.73158723	3.126243931	1.279E-27	8.0881E-25
EHI_161200	actin 2 protein, putative	6.94186968	2.795324281	0.0007986	0.0084736
EHI_197340	sulfotransferase, putative	6.30552555	2.65661662	2.132E-32	2.311E-29
EHI_131880	acyl-coA synthetase, putative	6.21445544	2.635627976	2.745E-59	1.0414E-55
EHI_143430	60S ribosomal protein L39, putative	5.9461809	2.571963355	0.000259	0.00344143
EHI_195110	S-adenosylmethionine synthetase, putative	5.88145655	2.556173484	2.609E-05	0.00052233
EHI_114190	hypothetical protein	5.87052365	2.553489196	4.315E-39	8.0331E-36
EHI_174250	S-adenosylmethionine synthetase, putative	4.6383502	2.213611749	1.116E-28	9.4073E-26
EHI_152560	hypothetical protein	4.48587379	2.165389032	1.46E-07	6.0867E-06
EHI_126030	hypothetical protein	4.34236165	2.118479884	4.424E-09	2.7513E-07
EHI_090430	hypothetical protein	4.24117303	2.084463344	3.319E-21	1.0947E-18
EHI_099230	hypothetical protein, conserved	3.85268808	1.945865386	9.188E-10	6.7678E-08
EHI_009500	hypothetical protein	3.84752332	1.943930072	2.949E-20	8.6047E-18
EHI_194580	CAAX amino terminal protease family	3.82373039	1.934980804	2.876E-07	1.1423E-05
EHI_117870	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E, putative	3.75107411	1.907303765	2.79E-05	0.00055422
EHI_153710	methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase, putative	3.66196147	1.872616611	2.858E-12	3.497E-10
EHI_058500	peptidase, C54 family	3.59394919	1.845570011	2.148E-15	3.7041E-13
EHI_076840	LSM domain containing protein	3.59053894	1.844200409	0.0002244	0.00304005

## 5 Anhang

EHI_068480	hypothetical protein	3.57091012	1.83629182	5.299E-21	1.6753E-18
EHI_010850	cysteine proteinase, putative	3.53371628	1.821186211	9.03E-22	3.114E-19
EHI_121720	hypothetical protein	3.49509483	1.8053316	8.272E-09	4.7909E-07
EHI_076790	hypothetical protein	3.42405194	1.775704585	1.721E-09	1.1873E-07
EHI_197560	hypothetical protein	3.41913695	1.773632211	0.0001955	0.00272658
EHI_065250	Lecithin:cholesterol acyltransferase, putative	3.4150659	1.77191342	2.538E-23	1.1326E-20
EHI_181610	hypothetical protein	3.35715144	1.747237618	0.005224	0.03683523
EHI_029030	hypothetical protein	3.27731128	1.712512708	0.0005519	0.00637279
EHI_092490	hypothetical protein	3.21585987	1.685204543	2.492E-28	1.8903E-25
EHI_150460	hypothetical protein	3.1615822	1.66064673	1.688E-05	0.00035965
EHI_039610	cysteine proteinase, putative	3.07735439	1.621690594	4.028E-19	1.0914E-16
EHI_177460	translation initiation factor eIF-5A, putative	3.0444563	1.606184606	0.0023958	0.02033245
EHI_194240	hypothetical protein	3.01613231	1.592699718	7.098E-06	0.00017151
EHI_119590	60S ribosomal protein L40, putative	2.99294088	1.581563781	5.562E-07	1.9813E-05
EHI_159580	protein kinase, putative	2.96761147	1.56930222	6.415E-08	2.9146E-06
EHI_163240	phosphatidate cytidyltransferase, putative	2.96599938	1.568518297	2.471E-09	1.6592E-07
EHI_110600	hypothetical protein	2.93940833	1.555525785	0.0009606	0.00994323
EHI_006770	hypothetical protein, conserved	2.91779654	1.544879284	0.0010864	0.01091143
EHI_155240	casein kinase, putative	2.91070792	1.541370077	4.007E-07	1.4671E-05
EHI_048140	hypothetical protein	2.86253425	1.517292953	1.118E-22	4.4661E-20
EHI_159710	alanine aminotransferase, putative	2.85673812	1.514368789	5.801E-07	2.0565E-05
EHI_092470	60S ribosomal protein L40, putative	2.85274675	1.512351677	0.0001599	0.00232855
EHI_024690	hypothetical protein	2.85169	1.511817161	2.43E-09	1.6463E-07
EHI_198550	glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase, putative	2.83244616	1.502048535	2.634E-08	1.3596E-06
EHI_096260	hypothetical protein	2.82494511	1.498222834	3.531E-05	0.00065667
EHI_030730	hypothetical protein	2.81537986	1.493329589	7.571E-06	0.00018098
EHI_069200	hypothetical protein	2.81129454	1.491234611	0.000582	0.00666971
EHI_050270	UDP-N-acetylglucosamine transporter, putative	2.78984332	1.480184099	2.923E-15	4.8218E-13
EHI_054480	hypothetical protein	2.72346971	1.445445824	4.022E-07	1.4671E-05
EHI_189500	calponin homology domain protein, putative	-2.70875152	-1.43762806	1.464E-10	1.3065E-08
EHI_045340	glutamate synthase beta subunit, putative	-2.70992042	-1.438250488	2.158E-08	1.1532E-06
EHI_074120	HAD hydrolase, family IA, variant 3	-2.74318704	-1.455852996	0.0004188	0.00506966
EHI_004430	hypothetical protein	-2.74462137	-1.456607141	0.0004591	0.00542575
EHI_180420	hypothetical protein, conserved	-2.75343187	-1.461230913	3.557E-13	4.8194E-11
EHI_006980	Gal/GalNAc lectin subunit Igl1	-2.77707889	-1.47356816	1.389E-17	2.849E-15
EHI_133900	galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative	-2.77880107	-1.474462556	1.075E-18	2.6301E-16
EHI_183280	DnaJ family protein	-2.79936365	-1.485098913	7.972E-08	3.537E-06
EHI_035790	hypothetical protein	-2.80197348	-1.486443303	2.932E-11	3.0477E-09
EHI_103520	hypothetical protein	-2.81057316	-1.490864371	2.993E-07	1.1707E-05
EHI_045480	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-2.8263616	-1.498946056	3.533E-10	2.8309E-08
EHI_107660	hypothetical protein, conserved	-2.83196203	-1.501801924	3.31E-10	2.7299E-08
EHI_072240	glucose-6-phosphate isomerase, putative	-2.84321824	-1.50752484	9.119E-06	0.00021157
EHI_144270	AIG1 family protein	-2.86303348	-1.51754454	3.343E-12	3.9633E-10
EHI_196940	heat shock protein 90, putative	-2.86310482	-1.517580488	0.0049103	0.03507945

## 5 Anhang

EHI_199590	70 kDa heat shock protein, putative	-2.88723686	-1.529689469	2.405E-24	1.2165E-21
EHI_173430	hypothetical protein	-2.89339147	-1.532761532	0.000449	0.0053311
EHI_148870	hypothetical protein	-2.9168921	-1.54443202	1.543E-10	1.3613E-08
EHI_112830	hypothetical protein	-2.96372158	-1.567409926	4.428E-19	1.1584E-16
EHI_098080	hypothetical protein	-2.99852363	-1.584252344	2.751E-09	1.8307E-07
EHI_079720	DnaJ family protein	-3.002599	-1.586211813	3.477E-10	2.8309E-08
EHI_067260	hypothetical protein	-3.01259945	-1.591008868	5.107E-11	5.0982E-09
EHI_060340	cysteine synthase A, putative	-3.0179262	-1.593557528	6.6E-11	6.4195E-09
EHI_163480	90 kDa heat shock protein, putative	-3.04163682	-1.604847902	5.554E-18	1.2395E-15
EHI_012350	hypothetical protein	-3.09144333	-1.628280559	1.257E-06	4.0074E-05
EHI_012980	dihydropyrimidine dehydrogenase, putative	-3.11840202	-1.640806929	1.361E-18	3.2266E-16
EHI_148360	hypothetical protein	-3.13660315	-1.649203006	8.234E-06	0.00019401
EHI_085680	WD repeat protein	-3.15325626	-1.65684242	4.201E-06	0.00010992
EHI_049690	galactose-specific adhesin light subunit, putative	-3.15606481	-1.658126829	3.957E-26	2.1444E-23
EHI_042690	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-3.18031216	-1.669168378	6.351E-07	2.2206E-05
EHI_192430	hypothetical protein	-3.18122094	-1.669580572	1.174E-05	0.00026435
EHI_178850	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, FKBP-type, putative	-3.2013628	-1.678686183	2.729E-08	1.3898E-06
EHI_103260	NADPH-dependent FMN reductase domain containing protein	-3.20431123	-1.680014279	7.761E-11	7.3603E-09
EHI_155570	glutamyl-tRNA synthetase, putative	-3.20549672	-1.680547932	1.989E-11	2.1558E-09
EHI_000410	alcohol dehydrogenase, putative	-3.20726693	-1.68134443	3.654E-06	9.9021E-05
EHI_067590	troponin-like protein, putative	-3.25241206	-1.701510047	8.972E-08	3.9346E-06
EHI_151800	ganglioside gm2 activator protein, putative	-3.37872422	-1.756478597	3.726E-09	2.3558E-07
EHI_201720	fumarate hydratase class 1, putative	-3.53594356	-1.822095246	7.751E-13	9.9675E-11
EHI_023130	hypothetical protein, conserved	-3.55333555	-1.829985726	1.067E-08	6.0853E-07
EHI_040600	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase, putative	-3.55829868	-1.831187612	7.123E-10	5.4046E-08
EHI_179340	HMG box protein	-3.70664924	-1.8901156	1.441E-13	2.0627E-11
EHI_150390	aspartate ammonia-lyase, putative	-3.75596918	-1.909185225	1.112E-27	7.6701E-25
EHI_025710	iron-sulfur flavoprotein, putative	-3.75763467	-1.909824811	1.173E-09	8.4128E-08
EHI_102270	heat shock protein 90, putative	-3.86711913	-1.951259209	0.0004309	0.00516475
EHI_130490	hypothetical protein	-3.89910458	-1.963142851	0.0006249	0.00706784
EHI_198620	hypothetical protein	-3.95762305	-1.984634208	5.572E-19	1.4092E-16
EHI_065330	Gal/GalNAc lectin subunit IgI2	-4.01840806	-2.006624074	7.998E-33	1.0114E-29
EHI_144610	methionine gamma-lyase	-4.11208119	-2.03986875	6.704E-22	2.4222E-19
EHI_120600	hypothetical protein	-4.27461544	-2.095794636	1.28E-14	1.9416E-12
EHI_114770	hypothetical protein	-4.4536442	-2.154986305	8.023E-20	2.2546E-17
EHI_151440	cysteine proteinase, putative	-4.65535758	-2.218891986	7.401E-10	5.5504E-08
EHI_087410	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-4.71710589	-2.237901988	0.0004015	0.00491297
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-14.106138	-3.818251152	1.119E-43	2.8305E-40

## 5 Anhang

**Tabelle A43: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 8 h mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten A1<sup>np</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_031640	hypothetical protein	10.03950872	3.32761677	6.9807E-65	4.2603E-61
EHI_148580	choline/ethanolamine kinase, putative	9.473486925	3.24389554	1.8165E-53	5.5432E-50
EHI_174250	S-adenosylmethionine synthetase, putative	6.453270554	2.69003051	4.8141E-44	9.7936E-41
EHI_082580	hypothetical protein	5.056135308	2.33803507	3.0329E-14	2.9381E-12
EHI_195110	S-adenosylmethionine synthetase, putative	4.977126632	2.31531309	0.00206445	0.0145657
EHI_177460	translation initiation factor eIF-5A, putative	4.797207781	2.26219493	1.5661E-11	1.0986E-09
EHI_114190	hypothetical protein	4.723843722	2.23996124	2.8903E-24	1.176E-21
EHI_013340	hypothetical protein	4.638038601	2.21351483	3.5852E-07	9.856E-06
EHI_153710	methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase, putative	4.496157125	2.16869245	2.7764E-21	8.0687E-19
EHI_155380	hypothetical protein	4.456751306	2.15599246	1.4489E-07	4.5116E-06
EHI_062680	hypothetical protein	4.211295125	2.07426398	9.9702E-15	1.0491E-12
EHI_197680	hypothetical protein	4.07750244	2.02768574	4.4211E-06	8.9345E-05
EHI_067200	hypothetical protein	3.727061056	1.89803845	6.9724E-14	6.4474E-12
EHI_160920	hypothetical protein	3.703387082	1.88884535	5.3857E-12	3.9129E-10
EHI_141010	hypothetical protein	3.490936177	1.80361398	1.3899E-18	2.5705E-16
EHI_092490	hypothetical protein	3.430940572	1.77860414	1.3306E-35	1.6353E-32
EHI_130930	purine nucleoside phosphorylase, putative	3.408538791	1.7691534	1.3109E-34	1.1429E-31
EHI_194390	Rho family GTPase	3.369854201	1.75268617	1.6853E-18	3.0251E-16
EHI_048140	hypothetical protein	3.342531853	1.74094131	1.3398E-35	1.6353E-32
EHI_045140	hypothetical protein	3.302963779	1.72376115	1.6189E-11	1.1132E-09
EHI_024990	hypothetical protein	3.249900092	1.70039537	4.2488E-07	1.1423E-05
EHI_050270	UDP-N-acetylglucosamine transporter, putative	3.228988363	1.69108224	1.5632E-17	2.2582E-15
EHI_120300	hypothetical protein	3.218946827	1.68658875	1.6587E-20	4.4737E-18
EHI_197340	sulfotransferase, putative	3.214375437	1.68453844	4.437E-10	2.3547E-08
EHI_023340	leucine-rich repeat containing protein	3.213060767	1.68394827	6.2699E-12	4.5018E-10
EHI_039610	cysteine proteinase, putative	3.183639411	1.67067694	4.0684E-18	6.8971E-16
EHI_074110	oxysterol-binding protein, putative	3.165712383	1.66253019	1.3084E-21	4.2026E-19
EHI_088080	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	3.137065976	1.64941587	1.4437E-05	0.0002434
EHI_120900	calcium-binding protein 1 (EhCBP1)	3.087587429	1.62647999	1.9052E-20	4.8449E-18
EHI_050140	casein kinase, putative	3.086447261	1.62594714	1.7963E-09	8.4328E-08
EHI_044680	hypothetical protein	3.079144974	1.62252979	3.469E-07	9.6233E-06
EHI_010850	cysteine proteinase, putative	3.023794505	1.5963601	5.8946E-22	1.9986E-19
EHI_009480	immediate-early protein, putative	3.021874341	1.59544367	1.3942E-10	8.2611E-09
EHI_029560	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase, putative	3.007258212	1.58844875	3.9019E-35	3.9688E-32
EHI_009500	hypothetical protein	2.9804603	1.57553516	4.1932E-11	2.6733E-09
EHI_065250	Lecithin:cholesterol acyltransferase, putative	2.977116426	1.57391564	2.3236E-17	3.1514E-15
EHI_103570	hypothetical protein	2.944726192	1.5581335	0.00043845	0.00416799
EHI_090430	hypothetical protein	2.936283436	1.55399124	8.4088E-17	1.0919E-14
EHI_159580	protein kinase, putative	2.906661109	1.53936288	4.205E-11	2.6733E-09

## 5 Anhang

EHI_073330	phospholipase, patatin family protein	2.859887816	1.51595856	1.7167E-09	8.1218E-08
EHI_112060	DNA mismatch repair protein mutS, putative	2.851508523	1.51172535	1.8516E-14	1.8833E-12
EHI_126980	hypothetical protein	2.842905593	1.50736619	0.00127589	0.01004744
EHI_074180	cysteine proteinase 1, putative	2.80657815	1.48881223	3.8518E-24	1.4692E-21
EHI_152350	casein kinase II regulatory subunit family protein	2.793880437	1.48227028	4.2448E-05	0.0006067
EHI_151930	hypothetical protein, conserved	2.792959729	1.48179477	1.5701E-31	9.5821E-29
EHI_180000	eukaryotic translation initiation factor 4E, putative	2.701676199	1.43385478	2.5186E-08	9.2917E-07
EHI_110600	hypothetical protein	2.700249371	1.43309265	0.00028316	0.00292905
EHI_012260	hypothetical protein	2.697936918	1.43185662	0.00017336	0.00195571
EHI_197150	hypothetical protein	2.697623392	1.43168895	2.168E-05	0.00034672
EHI_030800	LIM zinc finger domain containing protein	2.693104424	1.42927017	7.6218E-27	3.8763E-24
EHI_114340	acetylornithine deacetylase, putative	2.65361194	1.40795741	7.2685E-20	1.643E-17
EHI_197980	Myb family DNA-binding protein, SHAQKYF family	2.647287693	1.40451499	0.0004002	0.00389538
EHI_092450	malate dehydrogenase, putative	2.641608756	1.40141681	1.9167E-18	3.3422E-16
EHI_114950	hypothetical protein, conserved	2.638108088	1.39950368	2.0763E-07	6.2116E-06
EHI_000570	hypothetical protein	2.631578483	1.39592842	2.7396E-14	2.6967E-12
EHI_183150	hypothetical protein	2.627726003	1.39381485	1.3312E-07	4.2315E-06
EHI_029620	aldose reductase, putative	-2.615682382	-1.38718737	1.3359E-19	2.9117E-17
EHI_024230	cysteine synthase A, putative	-2.623046163	-1.3912432	2.708E-14	2.6967E-12
EHI_077640	ATP-dependent helicase, putative	-2.630746018	-1.39547197	6.5999E-10	3.3848E-08
EHI_107660	hypothetical protein, conserved	-2.642699762	-1.40201253	1.3859E-06	3.156E-05
EHI_026450	hypothetical protein	-2.655317852	-1.40888457	3.177E-11	2.0848E-09
EHI_183460	elongation factor 1 beta, putative	-2.683969423	-1.42436824	2.0086E-10	1.1565E-08
EHI_152180	RNA recognition motif domain containing protein	-2.687694908	-1.42636938	9.5692E-05	0.00118942
EHI_179340	HMG box protein	-2.709323142	-1.43793247	3.7844E-14	3.6088E-12
EHI_072240	glucose-6-phosphate isomerase, putative	-2.71201142	-1.43936325	0.00022903	0.00246951
EHI_155570	glutamyl-tRNA synthetase, putative	-2.713846312	-1.44033902	4.7216E-20	1.1083E-17
EHI_110260	pumilio family RNA-binding protein	-2.73145999	-1.44967229	2.2011E-05	0.00034982
EHI_151800	ganglioside gm2 activator protein, putative	-2.779855887	-1.47501009	1.1628E-06	2.7506E-05
EHI_012980	dihydropyrimidine dehydrogenase, putative	-2.835110729	-1.50340508	4.816E-14	4.5219E-12
EHI_194600	molybdenum cofactor sulfurase, putative	-2.836587841	-1.50415654	2.5072E-12	1.9369E-10
EHI_055630	ATP-binding cassette, sub-family C, putative	-2.874062576	-1.52309147	1.519E-08	5.8307E-07
EHI_180430	Rho family GTPase	-2.928734287	-1.55027731	0.00011933	0.00144215
EHI_150390	aspartate ammonia-lyase, putative	-2.941629286	-1.55661544	5.0733E-22	1.8213E-19
EHI_119040	AIG1 family protein, putative	-2.94623411	-1.55887207	0.0003164	0.00321836
EHI_192040	hypothetical protein	-3.002284981	-1.58606093	0.0050011	0.02884847
EHI_151890	EF-hand calcium-binding domain containing protein	-3.129435648	-1.64590251	0.00010668	0.00131002
EHI_134960	Skp1 family protein	-3.186926328	-1.67216567	2.5606E-15	2.8939E-13
EHI_110420	tryptophanyl-tRNA synthetase, putative	-3.198663908	-1.67746941	3.5701E-05	0.00052629
EHI_092730	ADP-ribosylation factor 1, putative	-3.199820541	-1.677991	1.3773E-05	0.00023415
EHI_198580	hypothetical protein	-3.306576602	-1.72533832	1.1174E-17	1.7049E-15
EHI_016460	hypothetical protein	-3.348370036	-1.74345897	5.0463E-06	9.871E-05
EHI_060340	cysteine synthase A, putative	-3.353533631	-1.74568207	9.8431E-11	5.9478E-09

## 5 Anhang

EHI_045480	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-3.357292844	-1.74729838	1.0108E-15	1.2338E-13
EHI_173500	hypothetical protein	-3.429139141	-1.77784644	0.00384419	0.02341424
EHI_144610	methionine gamma-lyase	-3.442606016	-1.78350108	9.055E-15	9.6952E-13
EHI_133940	hypothetical protein, conserved	-3.503018661	-1.80859867	6.3278E-09	2.6818E-07
EHI_089990	lysozyme, putative	-3.588217972	-1.84326753	3.0196E-05	0.00045279
EHI_087410	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-3.700152247	-1.88758463	0.00108902	0.00881472
EHI_192430	hypothetical protein	-3.742580339	-1.90403329	4.9914E-05	0.00070163
EHI_180420	hypothetical protein, conserved	-3.919617477	-1.97071287	8.4566E-11	5.2132E-09
EHI_078530	hypothetical protein	-3.963267019	-1.98669017	8.9476E-05	0.00112592
EHI_120600	hypothetical protein	-4.028615324	-2.01028405	2.0763E-27	1.152E-24
EHI_082540	hypothetical protein	-4.039415265	-2.01414647	2.3958E-16	2.9839E-14
EHI_151440	cysteine proteinase, putative	-4.150213202	-2.05318545	1.5325E-07	4.7237E-06
EHI_025710	iron-sulfur flavoprotein, putative	-4.195776215	-2.06893773	6.6442E-09	2.7637E-07
EHI_178580	ATP-binding cassette protein, putative	-4.419926904	-2.14402251	1.913E-24	8.3392E-22
EHI_114770	hypothetical protein	-5.004758732	-2.32330052	1.8468E-17	2.5616E-15
EHI_138480	iron-sulfur flavoprotein, putative	-5.171681749	-2.3706335	7.9679E-19	1.5687E-16
EHI_198620	hypothetical protein	-5.631591784	-2.49354276	2.433E-19	5.1202E-17
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-5.800202019	-2.53610315	6.6376E-32	4.501E-29

**Tabelle A44: Liste der 100 differenziell exprimierten Gene (FDR  $p \leq 0,05$ ) mit den höchsten FC von für 4 h mit humanen Epithelzellen aus Dünndarmsphäroiden inkubierten B2<sup>P</sup> Trophozoiten und der zugehörigen Kontrolle.**

Name	Genprodukt	Fold change	Log fold change	p-Wert	FDR p-Wert
EHI_161200	actin 2 protein, putative	15.6824617	3.9710801	8.526E-07	2.929E-05
EHI_120900	calcium-binding protein 1 (EhCBP1)	12.8514046	3.6838541	1.025E-69	7.607E-66
EHI_098470	ribosomal protein L18, putative	11.9816093	3.5827498	0.0005281	0.0054811
EHI_143430	60S ribosomal protein L39, putative	10.6262927	3.4095665	5.38E-13	7.129E-11
EHI_163240	phosphatidate cytidyltransferase, putative	9.31243306	3.2191581	1.213E-16	2.414E-14
EHI_065250	Lecithin:cholesterol acyltransferase, putative	7.80029139	2.963528	7.627E-31	4.716E-28
EHI_174250	S-adenosylmethionine synthetase, putative	7.795168	2.9625801	7.308E-61	2.712E-57
EHI_195110	S-adenosylmethionine synthetase, putative	7.31326041	2.8705147	5.264E-05	0.0008919
EHI_048170	Protein transport protein SEC61 gamma subunit, putative	6.89050809	2.7846104	1.324E-08	7.068E-07
EHI_062680	hypothetical protein	6.28886738	2.6528002	8.484E-22	2.862E-19
EHI_079300	long-chain-fatty-acid-CoA ligase, putative	6.03102631	2.5924035	7.045E-24	2.904E-21
EHI_152780	hypothetical protein	5.42223533	2.4388877	3.081E-20	9.526E-18
EHI_182800	hypothetical protein	5.2389111	2.389267	2.679E-09	1.744E-07
EHI_180390	AIG1 family protein, putative	5.20289587	2.3793148	7.528E-10	5.643E-08
EHI_010850	cysteine proteinase, putative	5.01840303	2.3272283	2.443E-31	1.813E-28
EHI_105350	hypothetical protein	4.8291422	2.2717669	3.699E-14	5.49E-12
EHI_001780	hypothetical protein	4.81100283	2.2663376	1.954E-27	1.115E-24
EHI_153710	methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase, putative	4.80976666	2.2659669	7.83E-17	1.66E-14
EHI_041465	AIG family protein	4.70284552	2.2335339	1.033E-13	1.446E-11
EHI_029030	hypothetical protein	4.70231548	2.2333713	2.697E-05	0.0005212
EHI_058920	hypothetical protein	4.67171338	2.2239518	3.864E-31	2.607E-28

## 5 Anhang

EHI_095820	ATP-binding cassette protein, putative	4.47916352	2.1632293	4.344E-26	2.303E-23
EHI_073400	hypothetical protein	4.21094367	2.0741436	5.193E-10	4.015E-08
EHI_132390	hypothetical protein	4.16892159	2.0596742	7.352E-13	9.572E-11
EHI_014340	hypothetical protein	4.15262248	2.0540227	1.361E-19	4.039E-17
EHI_096260	hypothetical protein	3.86885318	1.951906	7.364E-09	4.236E-07
EHI_103550	clathrin adaptor complex, small chain, putative	3.8144566	1.9314775	1.288E-06	4.102E-05
EHI_092470	60S ribosomal protein L40, putative	3.81182046	1.9304802	1.047E-08	5.671E-07
EHI_051580	hypothetical protein	3.78013157	1.9184365	0.0054403	0.0317242
EHI_068120	Ras family GTPase	3.74982794	1.9068244	1.102E-06	3.57E-05
EHI_140740	hypothetical protein	3.71156251	1.8920267	1.261E-23	4.925E-21
EHI_092490	hypothetical protein	3.70334808	1.8888302	9.424E-25	4.114E-22
EHI_183400	galactose-inhibitable lectin 35 kDa subunit precursor, putative	3.65088431	1.868246	0.0003703	0.0041015
EHI_155230	hypothetical protein	3.64759127	1.8669441	9.458E-06	0.000212
EHI_144280	hypothetical protein	3.63757737	1.8629779	7.421E-06	0.0001744
EHI_121720	hypothetical protein	3.62514703	1.8580395	4.1E-06	0.0001114
EHI_027800	galactose binding lectin 35 kDa subunit, putative	3.60201959	1.848806	1.481E-22	5.234E-20
EHI_039020	actobindin, putative	3.49554169	1.805516	3.036E-08	1.502E-06
EHI_131500	hypothetical protein	3.45831881	1.7900709	2.26E-05	0.0004462
EHI_090430	hypothetical protein	3.44306325	1.7836927	8.18E-10	6.07E-08
EHI_183230	hypothetical protein	3.41832513	1.7732896	9.285E-07	3.118E-05
EHI_031380	hypothetical protein	3.39342776	1.7627433	5.07E-05	0.0008704
EHI_081710	hypothetical protein	3.37819683	1.7562534	5.627E-12	6.327E-10
EHI_049430	protein tyrosine phosphatase, putative	3.34979888	1.7440745	8.175E-13	1.046E-10
EHI_158570	actobindin, putative	3.33493228	1.7376575	9.273E-14	1.323E-11
EHI_048140	hypothetical protein	3.32597488	1.7337773	6.582E-16	1.163E-13
EHI_081920	hypothetical protein	3.28493876	1.7158665	5.713E-11	5.367E-09
EHI_099870	ATP-binding cassette, putative	3.2820346	1.7145904	1.003E-12	1.262E-10
EHI_189480	iron-sulfur flavoprotein, putative	3.21703278	1.6857306	0.0018504	0.0139832
EHI_153160	hypothetical protein	3.21066212	1.6828708	2.183E-11	2.219E-09
EHI_122850	hypothetical protein	3.14619818	1.6536095	5.108E-12	6.017E-10
EHI_169250	hypothetical protein	3.12840322	1.6454265	0.0012231	0.010303
EHI_076840	LSM domain containing protein	3.12762973	1.6450697	0.0005804	0.0059326
EHI_009620	hypothetical protein	3.06446402	1.6156348	5.213E-18	1.209E-15
EHI_183000	Gal/GalNAc lectin Igl2, putative	3.0523445	1.6099178	1.653E-10	1.41E-08
EHI_004490	thioredoxin, putative	3.03505644	1.6017233	4.605E-08	2.177E-06
EHI_012260	hypothetical protein	2.94244779	1.5570168	0.0003971	0.0043382
EHI_192590	beta-amylase, putative	-2.9185895	-1.545271	1.266E-15	2.185E-13
EHI_022950	DnaJ family protein	-2.9284669	-1.550146	1.11E-09	7.772E-08
EHI_122780	DNA-directed RNA polymerase subunit N, putative	-2.941834	-1.556716	0.0009147	0.0082783
EHI_138480	iron-sulfur flavoprotein, putative	-2.9443822	-1.557965	3.178E-08	1.551E-06
EHI_035660	queuine tRNA-ribosyltransferase, putative	-2.9459642	-1.55874	9.287E-11	8.405E-09
EHI_189540	hypothetical protein	-2.9465036	-1.559004	1.281E-11	1.339E-09
EHI_045480	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-2.9770511	-1.573884	3.621E-11	3.582E-09
EHI_060400	LSM domain containing protein	-2.9793602	-1.575003	3.084E-05	0.0005779
EHI_159520	hypothetical protein	-3.0659352	-1.616327	5.963E-06	0.0001482
EHI_028910	ARF GTPase activating protein, putative	-3.1014074	-1.632923	5.999E-06	0.0001484

## 5 Anhang

EHI_006980	Gal/GalNAc lectin subunit Igl1	-3.1618703	-1.660778	2.242E-23	8.318E-21
EHI_045610	diacylglycerol kinase, putative	-3.2890668	-1.717678	1.401E-07	5.873E-06
EHI_164430	actinin-like protein, putative	-3.324305	-1.733053	6.276E-10	4.753E-08
EHI_042690	high mobility group (HMG) box domain containing protein	-3.33934	-1.739563	3.076E-06	8.846E-05
EHI_198580	hypothetical protein	-3.4700957	-1.794975	1.352E-10	1.18E-08
EHI_120350	hypothetical protein	-3.4887301	-1.802702	1.844E-09	1.255E-07
EHI_197520	hypothetical protein	-3.4922885	-1.804173	3.752E-08	1.796E-06
EHI_201720	fumarate hydratase class 1, putative	-3.5356749	-1.821986	2.474E-14	3.746E-12
EHI_021560	thioredoxin, putative	-3.5776305	-1.839004	6.484E-19	1.782E-16
EHI_003260	hypothetical protein	-3.5799676	-1.839947	1.698E-16	3.231E-14
EHI_012980	dihydropyrimidine dehydrogenase, putative	-3.635135	-1.862009	4.22E-25	1.981E-22
EHI_115160	AIG1 family protein	-3.6748333	-1.877679	4.177E-06	0.0001123
EHI_150390	aspartate ammonia-lyase, putative	-3.7937575	-1.923627	4.271E-25	1.981E-22
EHI_164440	actinin-like protein, putative	-3.8932115	-1.960961	2.703E-16	4.893E-14
EHI_192040	hypothetical protein	-3.9224013	-1.971737	8.365E-06	0.0001928
EHI_067590	troponin-like protein, putative	-4.004919	-2.001773	2.883E-08	1.455E-06
EHI_098230	hypothetical protein, conserved	-4.0262941	-2.009453	6.266E-05	0.0010087
EHI_176700	AIG1 family protein, putative	-4.3230258	-2.112041	1.551E-14	2.398E-12
EHI_054690	metal dependent hydrolase, putative	-4.3773757	-2.130066	3.646E-06	0.0001013
EHI_099330	hypothetical protein	-4.4411967	-2.150948	0.0002411	0.0029335
EHI_089990	lysozyme, putative	-4.6603724	-2.220445	2.561E-09	1.682E-07
EHI_118440	beta-amylase, putative	-4.8377801	-2.274345	1.015E-18	2.689E-16
EHI_040600	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase, putative	-4.9507651	-2.307652	1.014E-09	7.167E-08
EHI_116830	D-phosphoglycerate dehydrogenase	-5.0711673	-2.342318	8.935E-05	0.0013261
EHI_035790	hypothetical protein	-5.2532162	-2.393201	1.737E-08	9.206E-07
EHI_049690	galactose-specific adhesin light subunit, putative	-5.383478	-2.428539	9.15E-38	1.132E-34
EHI_096790	hypothetical protein, conserved	-5.3898108	-2.430235	2.682E-16	4.893E-14
EHI_065330	Gal/GalNAc lectin subunit Igl2	-6.1447945	-2.619365	3.968E-33	3.681E-30
EHI_151800	ganglioside gm2 activator protein, putative	-6.6657571	-2.736769	1.553E-15	2.619E-13
EHI_120600	hypothetical protein	-7.0821758	-2.824193	1.173E-20	3.784E-18
EHI_058330	galactose-inhibitable lectin, putative	-8.1431554	-3.025588	8.576E-32	7.071E-29
EHI_144610	methionine gamma-lyase	-8.9901836	-3.168351	8.085E-36	8.571E-33
EHI_090410	hypothetical protein	-11.102828	-3.472855	5.45E-14	7.93E-12

## 6 Literaturverzeichnis

## 6 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. W1, p. W147-53, Jul 08 2016. ISSN 1362-4962.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27190236>
- <sup>2</sup> HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, May 22 2015. ISSN 1471-2105.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25994840>
- <sup>3</sup> HAQUE, R. et al. Amebiasis. **N Engl J Med**, v. 348, n. 16, p. 1565-73, Apr 17 2003. ISSN 1533-4406. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12700377>
- <sup>4</sup> COMMUNITY, G. The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. **Nucleic Acids Res**, v. 52, n. W1, p. W83-W94, Jul 05 2024. ISSN 1362-4962. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38769056>
- <sup>5</sup> GHOSH, S.; PADALIA, J.; MOONAH, S. Tissue Destruction Caused by Entamoeba histolytica Parasite: Cell Death, Inflammation, Invasion, and the Gut Microbiome. **Curr Clin Microbiol Rep**, v. 6, n. 1, p. 51-57, 2019. ISSN 2196-5471.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31008019>
- <sup>6</sup> MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 10, p. 667-85, Oct 2014. ISSN 1474-1741.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25234148>
- <sup>7</sup> KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, n. 2, p. 145-59, Apr 2016. ISSN 1532-1916.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086882>
- <sup>8</sup> PODOLSKY, D. K. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. **Am J Physiol**, v. 277, n. 3, p. G495-9, Sep 1999. ISSN 0002-9513. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484372>
- <sup>9</sup> PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, Mar 2014. ISSN 1474-1741.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566914>
- <sup>10</sup> RAO, M. C. Physiology of Electrolyte Transport in the Gut: Implications for Disease. **Compr Physiol**, v. 9, n. 3, p. 947-1023, Jun 12 2019. ISSN 2040-4603.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31187895>

## 6 Literaturverzeichnis

- 11 JOHANSSON, M. E.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 6, p. 352-61, Jun 2013. ISSN 1759-5053. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478383>
- 12 JOHANSSON, M. E. et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 39, p. 15064-9, Sep 30 2008. ISSN 1091-6490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806221>
- 13 HANSSON, G. C. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. **Curr Opin Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 57-62, Feb 2012. ISSN 1879-0364. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22177113>
- 14 VAN DER SLUIS, M. et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 117-29, Jul 2006. ISSN 0016-5085. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831596>
- 15 GUSTAFSSON, J. K. et al. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 302, n. 4, p. G430-8, Feb 15 2012. ISSN 1522-1547. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22159279>
- 16 BEUMER, J.; CLEVERS, H. Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. **Development**, v. 143, n. 20, p. 3639-3649, Oct 15 2016. ISSN 1477-9129. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802133>
- 17 CLEVERS, H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. **Cell**, v. 154, n. 2, p. 274-84, Jul 18 2013. ISSN 1097-4172. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23870119>
- 18 NOAH, T. K.; DONAHUE, B.; SHROYER, N. F. Intestinal development and differentiation. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 19, p. 2702-10, Nov 15 2011. ISSN 1090-2422. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978911>
- 19 BARKER, N. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, v. 449, n. 7165, p. 1003-7, Oct 25 2007. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934449>
- 20 BEUMER, J.; CLEVERS, H. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 22, n. 1, p. 39-53, Jan 2021. ISSN 1471-0080. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32958874>
- 21 RITSMA, L. et al. Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. **Nature**, v. 507, n. 7492, p. 362-365, Mar 20 2014. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24531760>

## 6 Literaturverzeichnis

- 22 POWELL, D. W. et al. Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. **Annu Rev Physiol**, v. 73, p. 213-37, 2011. ISSN 1545-1585. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21054163>
- 23 CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. **Am J Anat**, v. 141, n. 4, p. 537-61, Dec 1974. ISSN 0002-9106. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4440635>
- 24 SNOECK, V.; GODDEERIS, B.; COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. **Microbes Infect**, v. 7, n. 7-8, p. 997-1004, Jun 2005. ISSN 1286-4579. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925533>
- 25 KNOOP, K. A.; NEWBERRY, R. D. Goblet cells: multifaceted players in immunity at mucosal surfaces. **Mucosal Immunol**, v. 11, n. 6, p. 1551-1557, Nov 2018. ISSN 1935-3456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867079>
- 26 PROPHETER, D. C. et al. Resistin-like molecule  $\beta$  is a bactericidal protein that promotes spatial segregation of the microbiota and the colonic epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 42, p. 11027-11033, Oct 17 2017. ISSN 1091-6490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28973871>
- 27 HERBERT, D. R. et al. Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. **J Exp Med**, v. 206, n. 13, p. 2947-57, Dec 21 2009. ISSN 1540-9538. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995957>
- 28 BERGSTRÖM, J. H. et al. Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 48, p. 13833-13838, Nov 29 2016. ISSN 1091-6490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27849619>
- 29 GERBE, F. et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. **J Cell Biol**, v. 192, n. 5, p. 767-80, Mar 07 2011. ISSN 1540-8140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383077>
- 30 MCKINLEY, E. T. et al. Optimized multiplex immunofluorescence single-cell analysis reveals tuft cell heterogeneity. **JCI Insight**, v. 2, n. 11, Jun 02 2017. ISSN 2379-3708. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28570279>
- 31 MOLTKE, J. Intestinale Tuft Cells. In: SAID, H. (Ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. Academic Press, v.6, 2018. cap. 31, p.721-733. ISBN 9780128099544.
- 32 SILVERMAN, J. B. et al. Intestinal Tuft Cells: Morphology, Function, and Implications for Human Health. **Annu Rev Physiol**, v. 86, p. 479-504, Feb 12 2024. ISSN 1545-1585. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37863104>

## 6 Literaturverzeichnis

- 33 HOWITT, M. R. et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. **Science**, v. 351, n. 6279, p. 1329-33, Mar 18 2016. ISSN 1095-9203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26847546>
- 34 BEUMER, J. et al. Enteroendocrine cells switch hormone expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient. **Nat Cell Biol**, v. 20, n. 8, p. 909-916, Aug 2018. ISSN 1476-4679. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30038251>
- 35 FURNESS, J. B. et al. The gut as a sensory organ. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, n. 12, p. 729-40, Dec 2013. ISSN 1759-5053. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24061204>
- 36 EGEROD, K. L. et al. A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. **Endocrinology**, v. 153, n. 12, p. 5782-95, Dec 2012. ISSN 1945-7170. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064014>
- 37 MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway Immunologie**. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg: 2018. ISBN 978-3-662-56003-7.
- 38 MACH, J. et al. Development of intestinal M cells. **Immunol Rev**, v. 206, p. 177-89, Aug 2005. ISSN 0105-2896. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048549>
- 39 PAUŽUOLIS, M. et al. Organoids as a tool to study the impact of heterogeneity in gastrointestinal epithelium on host-pathogen interactions. **Clin Exp Immunol**, Jan 20 2024. ISSN 1365-2249. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38245816>
- 40 CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 5, p. 349-59, May 2006. ISSN 1471-0056. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619050>
- 41 SATO, T. et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 415-8, Jan 20 2011. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113151>
- 42 SASAKI, N. et al. Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 37, p. E5399-407, Sep 13 2016. ISSN 1091-6490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573849>
- 43 BULL, M. J.; PLUMMER, N. T. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. **Integr Med (Encinitas)**, v. 13, n. 6, p. 17-22, Dec 2014. ISSN 1546-993X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26770121>
- 44 TIAN, K. et al. Commensal microbiome and gastrointestinal mucosal immunity: Harmony and conflict with our closest neighbor. **Immun Inflamm Dis**, v. 12, n. 7, p. e1316, Jul 2024. ISSN 2050-4527. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39023417>

## 6 Literaturverzeichnis

- 45 LUCKEY, T. D. Introduction to intestinal microecology. **Am J Clin Nutr**, v. 25, n. 12, p. 1292-4, Dec 1972. ISSN 0002-9165. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4639749>
- 46 NATIVIDAD, J. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 42-51, Mar 2013. ISSN 1096-1186. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23089410>
- 47 CUMMINGS, J. H. et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v. 28, n. 10, p. 1221-7, Oct 1987. ISSN 0017-5749. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3678950>
- 48 MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189-200, May 03 2016. ISSN 1949-0984. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26963409>
- 49 CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clin Transl Immunology**, v. 5, n. 4, p. e73, Apr 2016. ISSN 2050-0068. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27195116>
- 50 GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-9, Feb 08 2003. ISSN 0140-6736. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583961>
- 51 BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915-20, Mar 25 2005. ISSN 1095-9203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790844>
- 52 HARRIS, M. A.; REDDY, C. A.; CARTER, G. R. Anaerobic bacteria from the large intestine of mice. **Appl Environ Microbiol**, v. 31, n. 6, p. 907-12, Jun 1976. ISSN 0099-2240. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/938042>
- 53 DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 20-32, Jan 2016. ISSN 1740-1534. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26499895>
- 54 WEINER, H. L. et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. **Annu Rev Immunol**, v. 12, p. 809-37, 1994. ISSN 0732-0582. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8011298>
- 55 RINTTILÄ, T. et al. Real-time PCR analysis of enteric pathogens from fecal samples of irritable bowel syndrome subjects. **Gut Pathog**, v. 3, n. 1, p. 6, Apr 26 2011. ISSN 1757-4749. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518462>
- 56 PONNUSAMY, K. et al. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 6, p. 817-827, Jun 2011. ISSN 1473-5644. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330412>

## 6 Literaturverzeichnis

- 57 NAGALINGAM, N. A.; LYNCH, S. V. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 18, n. 5, p. 968-84, May 2012. ISSN 1536-4844. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21936031>
- 58 LÖSCH, F. Massenhafte Entwicklung von Amöben im Dickdarm. **Archiv für pathologische Anatomie**, v. 65, p. 196–211, 1875.
- 59 SCHAUDINN, F. **Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. (Vorläufige Mitteilung)**. Arbeit. Kaiserlichen Gesundheitsamte, p.547-576. 1903
- 60 STANLEY, S. L. Amoebiasis. **Lancet**, v. 361, n. 9362, p. 1025-34, Mar 22 2003. ISSN 0140-6736. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660071>
- 61 DESPOMMIER, D.; GWADZ, R.; HOTEZ, P. *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903). In: (Ed.). **Parasitic Diseases**: Springer, New York, 1995. p.151-159. ISBN 978-1-4612-7554-1.
- 62 HUNG, C. C. et al. Increased risk for *Entamoeba histolytica* infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 2, p. e175, Feb 27 2008. ISSN 1935-2735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18301730>
- 63 WATANABE, K. et al. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 9, p. e1318, Sep 2011. ISSN 1935-2735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931875>
- 64 SHIRLEY, D. T. et al. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. **Open Forum Infect Dis**, v. 5, n. 7, p. ofy161, Jul 2018. ISSN 2328-8957. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30046644>
- 65 BURCHARD, G.; VAN LUNZEN, J.; TANNICH, E. Amöbenruhr und Amöbenleberabszess. **Deutsches Ärzteblatt**. 93 (51-52): 3410–3416 p. 1996.
- 66 KANTOR, M. et al. *Entamoeba Histolytica*: Updates in Clinical Manifestation, Pathogenesis, and Vaccine Development. **Can J Gastroenterol Hepatol**, v. 2018, p. 4601420, 2018. ISSN 2291-2797. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30631758>
- 67 ADAMS, E. B.; MACLEOD, I. N. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. **Medicine (Baltimore)**, v. 56, n. 4, p. 315-23, Jul 1977. ISSN 0025-7974. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/195178>
- 68 MISRA, S. P.; MISRA, V.; DWIVEDI, M. Ileocecal masses in patients with amebic liver abscess: etiology and management. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 12, p. 1933-6, Mar 28 2006. ISSN 1007-9327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610001>
- 69 SINHARAY, R. et al. Caecal amoebic colitis mimicking a colorectal cancer. **J Surg Case Rep**, v. 2011, n. 11, p. 1, Nov 01 2011. ISSN 2042-8812. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24972391>

## 6 Literaturverzeichnis

- 70 PRAKASH, V.; BHIMJI, S. Amebic Liver. StatPearls Publishing. In: (Ed.). **Amebic Liver**, 2017.
- 71 BANSAL, Y. et al. Clinical and laboratory profile of patients with amoebic liver abscess. **Trop Parasitol**, v. 12, n. 2, p. 113-118, 2022. ISSN 2229-5070.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36643982>
- 72 BLESSMANN, J. et al. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 5, p. 578-83, May 2002. ISSN 0002-9637. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12201594>
- 73 CORDEL, H. et al. Imported amoebic liver abscess in France. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2333, 2013. ISSN 1935-2735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23951372>
- 74 ORBISON, J. A. et al. Amebic brain abscess; review of the literature and report of five additional cases. **Medicine (Baltimore)**, v. 30, n. 3, p. 247-82, Sep 1951. ISSN 0025-7974.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14881991>
- 75 ORTIZ-CASTILLO, F. et al. Amoebic toxic colitis: analysis of factors related to mortality. **Pathog Glob Health**, v. 106, n. 4, p. 245-8, Aug 2012. ISSN 2047-7732.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265426>
- 76 TAKAHASHI, T. et al. Fulminant amebic colitis: analysis of 55 cases. **Dis Colon Rectum**, v. 40, n. 11, p. 1362-7, Nov 1997. ISSN 0012-3706.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369114>
- 77 ARISTIZÁBAL, H.; ACEVEDO, J.; BOTERO, M. Fulminant amebic colitis. **World J Surg**, v. 15, n. 2, p. 216-21, 1991. ISSN 0364-2313. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2031357>
- 78 STARK, D. et al. Comparison of stool antigen detection kits to PCR for diagnosis of amebiasis. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 5, p. 1678-81, May 2008. ISSN 1098-660X.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367563>
- 79 HAQUE, R. et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab Entamoeba histolytica II antigen detection and antibody tests. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 9, p. 3235-9, Sep 2000. ISSN 0095-1137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970364>
- 80 MIRELMAN, D.; NUCHAMOWITZ, Y.; STOLARSKY, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of Entamoeba histolytica and E. dispar. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 9, p. 2405-7, Sep 1997. ISSN 0095-1137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276425>
- 81 KATZENSTEIN, D.; RICKERSON, V.; BRAUDE, A. New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. **Medicine (Baltimore)**, v. 61, n. 4, p. 237-46, Jul 1982. ISSN 0025-7974.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6806561>

## 6 Literaturverzeichnis

- 82 KRUPP, I. M. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 19, n. 1, p. 57-62, Jan 1970. ISSN 0002-9637. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5416291>
- 83 QVARNSTROM, Y. et al. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5491-7, Nov 2005. ISSN 0095-1137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272475>
- 84 POWELL, S. J.; WILMOT, A. J.; ELSDON-DEW, R. Single and low dosage regimens of metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 63, n. 2, p. 139-42, Jun 1969. ISSN 0003-4983. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4313446>
- 85 PREVENTION, C. F. D. C. A. <https://www.cdc.gov/amebiasis/about/>. Zugriff am 16.07.2024.
- 86 VOOLMANN, T.; BOREHAM, P. Metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis* in Brisbane. **Med J Aust**, v. 159, n. 7, p. 490, Oct 04 1993. ISSN 0025-729X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8412928>
- 87 SUNDAR, S. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 4, p. 1104-7, Oct 2000. ISSN 1058-4838. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049798>
- 88 NASH, T. E. et al. Treatment of patients with refractory giardiasis. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 1, p. 22-8, Jul 01 2001. ISSN 1058-4838. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389490>
- 89 SINGH, A. et al. Creep in nitroimidazole inhibitory concentration among the *Entamoeba histolytica* isolates causing amoebic liver abscess and screening of andrographolide as a repurposing drug. **Sci Rep**, v. 13, n. 1, p. 12192, Jul 27 2023. ISSN 2045-2322. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37500681>
- 90 CARRERO, J. C. et al. Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. **Int J Med Microbiol**, v. 310, n. 1, p. 151358, Jan 2020. ISSN 1618-0607. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31587966>
- 91 COLLABORATORS, G. D. D. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 11, p. 1211-1228, Nov 2018. ISSN 1474-4457. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30243583>
- 92 LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-128, Dec 15 2012. ISSN 1474-547X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245604>

## 6 Literaturverzeichnis

- 93 KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-22, Jul 20 2013. ISSN 1474-547X. <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680352>
- 94 ALVARADO-ESQUIVEL, C.; HERNANDEZ-TINOCO, J.; SANCHEZ-ANGUIANO, L. F. Seroepidemiology of Entamoeba histolytica Infection in General Population in Rural Durango, Mexico. **J Clin Med Res**, v. 7, n. 6, p. 435-9, Jun 2015. ISSN 1918-3003.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883706>
- 95 SWAMINATHAN, A. et al. A global study of pathogens and host risk factors associated with infectious gastrointestinal disease in returned international travellers. **J Infect**, v. 59, n. 1, p. 19-27, Jul 2009. ISSN 1532-2742. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19552961>
- 96 SHIRLEY, D. A.; MOONAH, S. Fulminant Amebic Colitis after Corticosteroid Therapy: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 7, p. e0004879, Jul 2016. ISSN 1935-2735.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27467600>
- 97 HAQUE, R. et al. Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar infection in children in Bangladesh. **J Infect Dis**, v. 175, n. 3, p. 734-6, Mar 1997. ISSN 0022-1899.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041357>
- 98 ACUNA-SOTO, R.; MAGUIRE, J. H.; WIRTH, D. F. Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. **Am J Gastroenterol**, v. 95, n. 5, p. 1277-83, May 2000. ISSN 0002-9270.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10811339>
- 99 PETRI, W. A.; HAQUE, R.; MANN, B. J. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite Entamoeba histolytica. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 39-64, 2002. ISSN 0066-4227.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142490>
- 100 CHADEE, K. et al. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of Entamoeba histolytica. **J Clin Invest**, v. 80, n. 5, p. 1245-54, Nov 1987. ISSN 0021-9738.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2890655>
- 101 THIBEAUX, R. et al. Identification of the virulence landscape essential for Entamoeba histolytica invasion of the human colon. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003824, 2013. ISSN 1553-7374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385905>
- 102 LIDELL, M. E. et al. Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 24, p. 9298-303, Jun 13 2006. ISSN 0027-8424.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16754877>

## 6 Literaturverzeichnis

- 103 MONCADA, D.; KELLER, K.; CHADEE, K. Entamoeba histolytica-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. **Infect Immun**, v. 73, n. 6, p. 3790-3, Jun 2005. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908414>
- 104 CORNICK, S.; MOREAU, F.; CHADEE, K. Entamoeba histolytica Cysteine Proteinase 5 Evokes Mucin Exocytosis from Colonic Goblet Cells via  $\alpha\beta 3$  Integrin. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 4, p. e1005579, Apr 2016. ISSN 1553-7374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27073869>
- 105 QUE, X.; REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 2, p. 196-206, Apr 2000. ISSN 0893-8512. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755997>
- 106 LEJEUNE, M.; RYBICKA, J. M.; CHADEE, K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward Entamoeba histolytica. **Future Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 105-18, Feb 2009. ISSN 1746-0921. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207103>
- 107 CUELLAR, P. et al. EhCP112 Dislocates and Degrades Claudin-1 and Claudin-2 at Tight Junctions of the Intestinal Epithelium. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 372, 2017. ISSN 2235-2988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28861400>
- 108 THIBEAUX, R. et al. The parasite Entamoeba histolytica exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. **Nat Commun**, v. 5, p. 5142, Oct 07 2014. ISSN 2041-1723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25291063>
- 109 ZHANG, Z. et al. Entamoeba histolytica cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. **Mol Microbiol**, v. 37, n. 3, p. 542-8, Aug 2000. ISSN 0950-382X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931347>
- 110 KELSALL, B. L.; RAVDIN, J. I. Degradation of human IgA by Entamoeba histolytica. **J Infect Dis**, v. 168, n. 5, p. 1319-22, Nov 1993. ISSN 0022-1899. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8228372>
- 111 GARCIA-NIETO, R. M. et al. Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by Entamoeba histolytica surface-associated proteolytic activity. **Parasitol Int**, v. 57, n. 4, p. 417-23, Dec 2008. ISSN 1383-5769. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18571975>
- 112 LAMM, M. E. Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. **Am J Physiol**, v. 274, n. 4, p. G614-7, Apr 1998. ISSN 0002-9513. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575841>
- 113 PETRI, W. A. et al. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of Entamoeba histolytica. **J Clin Invest**, v. 80, n. 5, p. 1238-44, Nov 1987. ISSN 0021-9738. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2890654>

## 6 Literaturverzeichnis

- 114 SAFFER, L. D.; PETRI, W. A. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect Immun**, v. 59, n. 12, p. 4681-3, Dec 1991. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937828>
- 115 HUSTON, C. D. et al. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 964-72, Feb 2003. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540579>
- 116 HUSTON, C. D. et al. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Cell Microbiol**, v. 2, n. 6, p. 617-25, Dec 2000. ISSN 1462-5814. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207613>
- 117 RALSTON, K. S. et al. Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. **Nature**, v. 508, n. 7497, p. 526-30, Apr 24 2014. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717428>
- 118 POON, I. K. et al. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 166-80, Mar 2014. ISSN 1474-1741. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481336>
- 119 YU, Y.; CHADEE, K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite-enterocyte contact. **Gastroenterology**, v. 112, n. 5, p. 1536-47, May 1997. ISSN 0016-5085. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9136832>
- 120 BANSAL, D. et al. An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 11, p. e551, Nov 17 2009. ISSN 1935-2735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19936071>
- 121 SEYDEL, K. B. et al. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. **Gastroenterology**, v. 115, n. 6, p. 1446-53, Dec 1998. ISSN 0016-5085. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834272>
- 122 SEYDEL, K. B. et al. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. **Infect Immun**, v. 65, n. 5, p. 1631-9, May 1997. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125540>
- 123 ECKMANN, L. et al. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. **J Clin Invest**, v. 96, n. 3, p. 1269-79, Sep 1995. ISSN 0021-9738. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657801>
- 124 DENIS, M.; CHADEE, K. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites in vitro. **J Leukoc Biol**, v. 46, n. 3, p. 270-4, Sep 1989. ISSN 0741-5400. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2547889>

## 6 Literaturverzeichnis

- 125 LIN, J. Y. et al. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1534-41, May 1994. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513301>
- 126 DEY, I.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells. **Infect Immun**, v. 76, n. 11, p. 5158-63, Nov 2008. ISSN 1098-5522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710858>
- 127 NGOBENI, R. et al. *Entamoeba histolytica*-Encoded Homolog of Macrophage Migration Inhibitory Factor Contributes to Mucosal Inflammation during Amebic Colitis. **J Infect Dis**, v. 215, n. 8, p. 1294-1302, Apr 15 2017. ISSN 1537-6613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28186296>
- 128 MOONAH, S. N. et al. The macrophage migration inhibitory factor homolog of *Entamoeba histolytica* binds to and immunomodulates host macrophages. **Infect Immun**, v. 82, n. 9, p. 3523-30, Sep 2014. ISSN 1098-5522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818664>
- 129 GUERRANT, R. L. et al. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. **J Infect Dis**, v. 143, n. 1, p. 83-93, Jan 1981. ISSN 0022-1899. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6260869>
- 130 DAVIS, P. H. et al. Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. **Mol Microbiol**, v. 61, n. 6, p. 1523-32, Sep 2006. ISSN 0950-382X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968225>
- 131 BRUCHHAUS, I.; RICHTER, S.; TANNICH, E. Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. **Biochem J**, v. 330 ( Pt 3), n. Pt 3, p. 1217-21, Mar 15 1998. ISSN 0264-6021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9494088>
- 132 RIAHI, Y.; SIMAN-TOV, R.; ANKRI, S. Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase inhibitor gene from *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 153-62, Feb 2004. ISSN 0166-6851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698428>
- 133 SIM, S. et al. Involvement of beta 2-integrin in ROS-mediated neutrophil apoptosis induced by *Entamoeba histolytica*. **Microbes Infect**, v. 9, n. 11, p. 1368-75, Sep 2007. ISSN 1286-4579. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900957>
- 134 ELNEKAVE, K.; SIMAN-TOV, R.; ANKRI, S. Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. **Parasite Immunol**, v. 25, n. 11-12, p. 597-608, 2003. ISSN 0141-9838. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15053781>

## 6 Literaturverzeichnis

- 135 WATANABE, K. et al. Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 8, p. e1006513, Aug 2017. ISSN 1553-7374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28817707>
- 136 GILCHRIST, C. A. et al. Role of the Gut Microbiota of Children in Diarrhea Due to the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. **J Infect Dis**, v. 213, n. 10, p. 1579-85, May 15 2016. ISSN 1537-6613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26712950>
- 137 NGOBENI, R. et al. *Entamoeba* Species in South Africa: Correlations With the Host Microbiome, Parasite Burdens, and First Description of *Entamoeba bangladeshi* Outside of Asia. **J Infect Dis**, v. 216, n. 12, p. 1592-1600, Dec 19 2017. ISSN 1537-6613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29236996>
- 138 GALVÁN-MOROYOQUI, J. M. et al. The interplay between *Entamoeba* and enteropathogenic bacteria modulates epithelial cell damage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 7, p. e266, Jul 23 2008. ISSN 1935-2735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648517>
- 139 MONDAL, D. et al. *Entamoeba histolytica*-associated diarrheal illness is negatively associated with the growth of preschool children: evidence from a prospective study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 11, p. 1032-8, Nov 2006. ISSN 0035-9203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730764>
- 140 MONDAL, D. et al. Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 5, p. 824-6, May 2009. ISSN 1476-1645. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407131>
- 141 DUGGAL, P. et al. A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children. **J Clin Invest**, v. 121, n. 3, p. 1191-8, Mar 2011. ISSN 1558-8238. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393862>
- 142 GUO, X. et al. Leptin signaling in intestinal epithelium mediates resistance to enteric infection by *Entamoeba histolytica*. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 294-303, May 2011. ISSN 1935-3456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124310>
- 143 ALI, I. K.; ZAKI, M.; CLARK, C. G. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 12, p. 5842-7, Dec 2005. ISSN 0095-1137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16333065>
- 144 ALI, I. K. et al. Evidence for a link between parasite genotype and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 285-9, Feb 2007. ISSN 0095-1137. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17122021>
- 145 ESCUETA-DE CADIZ, A. et al. Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. **Parasitol Int**, v. 59, n. 1, p. 75-81, Mar 2010. ISSN 1873-0329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895903>

## 6 Literaturverzeichnis

- 146 FAUST, D. M.; GUILLEN, N. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. **Microbes Infect**, v. 14, n. 15, p. 1428-41, Dec 2012. ISSN 1769-714X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22710276>
- 147 BILLER, L. et al. Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. **Proteomics**, v. 9, n. 17, p. 4107-20, Sep 2009. ISSN 1615-9861. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19688750>
- 148 LOFTUS, B. et al. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. **Nature**, v. 433, n. 7028, p. 865-8, Feb 24 2005. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729342>
- 149 BILLER, L. et al. Differences in the transcriptome signatures of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties. **BMC Genomics**, v. 11, p. 63, Jan 26 2010. ISSN 1471-2164. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20102605>
- 150 BILLER, L. et al. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 132-44, Jan 2014. ISSN 1535-9484. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24136294>
- 151 MATTHIESEN, J. Charakterisierung des pathogenen Phänotyps von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903). 2012. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Universität Hamburg
- 152 MEYER, M. et al. Overexpression of Differentially Expressed Genes Identified in Non-pathogenic and Pathogenic *Entamoeba histolytica* Clones Allow Identification of New Pathogenicity Factors Involved in Amoebic Liver Abscess Formation. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 8, p. e1005853, Aug 2016. ISSN 1553-7374. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27575775>
- 153 ZANDITENAS, E. et al. Digestive exophagy of biofilms by intestinal amoeba and its impact on stress tolerance and cytotoxicity. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 9, n. 1, p. 77, Oct 09 2023. ISSN 2055-5008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37813896>
- 154 ZHAO, Y. et al. Quantitative Proteomics Reveals Metabolic Reprogramming in Host Cells Induced by Trophozoites and Intermediate Subunit of Gal/GalNAc Lectins from *Entamoeba histolytica*. **mSystems**, v. 7, n. 2, p. e0135321, Apr 26 2022. ISSN 2379-5077. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35343800>
- 155 KIM, K. A. et al. *Entamoeba histolytica* induces cell death of HT29 colonic epithelial cells via NOX1-derived ROS. **Korean J Parasitol**, v. 51, n. 1, p. 61-8, Feb 2013. ISSN 1738-0006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23467460>
- 156 DIAMOND, L. S.; HARLOW, D. R.; CUNNICK, C. C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 72, n. 4, p. 431-2, 1978. ISSN 0035-9203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/212851>

## 6 Literaturverzeichnis

- 157 CHADEE, K.; MEEROVITCH, E. Entamoeba histolytica: early progressive pathology in the cecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, n. 2, p. 283-91, Mar 1985. ISSN 0002-9637. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2858986>
- 158 ASGHARPOUR, A. et al. Resistance to intestinal Entamoeba histolytica infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 4522-9, Aug 2005. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040963>
- 159 HAMANO, S. et al. Gender and genetic control of resistance to intestinal amebiasis in inbred mice. **Genes Immun**, v. 9, n. 5, p. 452-61, Jul 2008. ISSN 1476-5470. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480826>
- 160 STENSON, W. F. et al. Amebic infection in the human colon induces cyclooxygenase-2. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3382-8, May 2001. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11292761>
- 161 CLEVERS, H. Modeling Development and Disease with Organoids. **Cell**, v. 165, n. 7, p. 1586-1597, Jun 16 2016. ISSN 1097-4172. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27315476>
- 162 HU, H. et al. Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids. **Cell**, v. 175, n. 6, p. 1591-1606.e19, Nov 29 2018. ISSN 1097-4172. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30500538>
- 163 SACHS, N. et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. **EMBO J**, v. 38, n. 4, Feb 15 2019. ISSN 1460-2075. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30643021>
- 164 SATO, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 262-5, May 14 2009. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19329995>
- 165 AHAMMED, B.; KALANGI, S. K. A Decade of Organoid Research: Progress and Challenges in the Field of Organoid Technology. **ACS Omega**, v. 9, n. 28, p. 30087-30096, Jul 16 2024. ISSN 2470-1343. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39035960>
- 166 SATO, T. et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. **Gastroenterology**, v. 141, n. 5, p. 1762-72, Nov 2011. ISSN 1528-0012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889923>
- 167 MOON, C. et al. Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 4, p. 818-28, Jul 2014. ISSN 1935-3456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220295>

## 6 Literaturverzeichnis

- 168 VANDUSSEN, K. L. et al. Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. **Gut**, v. 64, n. 6, p. 911-20, Jun 2015. ISSN 1468-3288. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25007816>
- 169 SABAPATY, A.; LIN, P. Y.; DUNN, J. C. Y. Effect of air-liquid interface on cultured human intestinal epithelial cells. **FASEB Bioadv**, v. 6, n. 2, p. 41-52, Feb 2024. ISSN 2573-9832. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38344411>
- 170 DAVIS, P. H.; SCHULZE, J.; STANLEY, S. L. Transcriptomic comparison of two *Entamoeba histolytica* strains with defined virulence phenotypes identifies new virulence factor candidates and key differences in the expression patterns of cysteine proteases, lectin light chains, and calmodulin. **Mol Biochem Parasitol**, v. 151, n. 1, p. 118-28, Jan 2007. ISSN 0166-6851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141337>
- 171 MACFARLANE, R. C.; SINGH, U. Identification of differentially expressed genes in virulent and nonvirulent *Entamoeba* species: potential implications for amebic pathogenesis. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 340-51, Jan 2006. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368989>
- 172 DAVIS, P. H. et al. Proteomic comparison of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and the role of *E. histolytica* alcohol dehydrogenase 3 in virulence. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 4, p. e415, 2009. ISSN 1935-2735. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365541>
- 173 HOLTHAUS, D. *Giardia duodenalis* – deciphering barrier break down in human, organoid-derived duodenal monolayers. 2022. 176 Lebenswissenschaftliche Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- 174 GE, S. X.; JUNG, D.; YAO, R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, v. 36, n. 8, p. 2628-2629, Apr 15 2020. ISSN 1367-4811. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31882993>
- 175 MATTHEWS, J. C.; HORI, K.; CORMIER, M. J. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. **Biochemistry**, v. 16, n. 1, p. 85-91, Jan 11 1977. ISSN 0006-2960. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797>
- 176 WOOD, W. G. Luminescence immunoassays: problems and possibilities. **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 22, n. 12, p. 905-18, Dec 1984. ISSN 0340-076X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6084700>
- 177 MAHE, M. M. et al. Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy. **J Vis Exp**, n. 97, Mar 06 2015. ISSN 1940-087X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866936>
- 178 HOLTHAUS, D. et al. Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 610368, 2020. ISSN 2235-2988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33692963>

## 6 Literaturverzeichnis

- 179 WARSCHKAU, D. et al. From 3D to 2D: Harmonization of Protocols for Two-dimensional Cultures on Cell Culture Inserts of Intestinal Organoids from Various Species. **Bio Protoc**, v. 12, n. 2, p. e4295, Jan 20 2022. ISSN 2331-8325.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35127985>
- 180 KÖNIG, C. Analyse des intestinalen Invasionsprozesses von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) unter Verwendung eines humanen 2D-Organoidmodells. 2022. Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Universität Hamburg
- 181 SATO, T.; CLEVERS, H. Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. **Methods Mol Biol**, v. 945, p. 319-28, 2013. ISSN 1940-6029.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097115>
- 182 MIYOSHI, H.; STAPPENBECK, T. S. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. **Nat Protoc**, v. 8, n. 12, p. 2471-82, Dec 2013. ISSN 1750-2799. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24232249>
- 183 MIYOSHI, H. et al. Prostaglandin E2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. **EMBO J**, v. 36, n. 1, p. 5-24, Jan 04 2017. ISSN 1460-2075.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27797821>
- 184 DE LAU, W. et al. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. **Genes Dev**, v. 28, n. 4, p. 305-16, Feb 15 2014. ISSN 1549-5477.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532711>
- 185 HARAMIS, A. P. et al. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1684-6, Mar 12 2004. ISSN 1095-9203.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15017003>
- 186 SUZUKI, A. et al. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. **Lab Invest**, v. 90, n. 10, p. 1425-36, Oct 2010. ISSN 1530-0307.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714325>
- 187 NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985-999, Jun 01 2017. ISSN 1097-4172.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28575679>
- 188 GREGORIEFF, A. et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 626-38, Aug 2005. ISSN 0016-5085.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083717>
- 189 JUNG, P. et al. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. **Nat Med**, v. 17, n. 10, p. 1225-7, Sep 04 2011. ISSN 1546-170X.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892181>

## 6 Literaturverzeichnis

- <sup>190</sup> BUCHANAN, F. G.; DUBOIS, R. N. Connecting COX-2 and Wnt in cancer. **Cancer Cell**, v. 9, n. 1, p. 6-8, Jan 2006. ISSN 1535-6108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413466>
- <sup>191</sup> MIZUTANI, T.; CLEVERS, H. Primary Intestinal Epithelial Organoid Culture. **Methods Mol Biol**, v. 2171, p. 185-200, 2020. ISSN 1940-6029. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32705642>
- <sup>192</sup> VANDUSSEN, K. L.; SONNEK, N. M.; STAPPENBECK, T. S. L-WRN conditioned medium for gastrointestinal epithelial stem cell culture shows replicable batch-to-batch activity levels across multiple research teams. **Stem Cell Res**, v. 37, p. 101430, May 2019. ISSN 1876-7753. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30933720>
- <sup>193</sup> ROODSANT, T. et al. A Human 2D Primary Organoid-Derived Epithelial Monolayer Model to Study Host-Pathogen Interaction in the Small Intestine. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, p. 272, 2020. ISSN 2235-2988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32656095>
- <sup>194</sup> WU, Y. et al. ROCK inhibitor Y27632 promotes proliferation and diminishes apoptosis of marmoset induced pluripotent stem cells by suppressing expression and activity of caspase 3. **Theriogenology**, v. 85, n. 2, p. 302-14, Jan 15 2016. ISSN 1879-3231. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476594>
- <sup>195</sup> WATANABE, K. et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 6, p. 681-6, Jun 2007. ISSN 1087-0156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17529971>
- <sup>196</sup> SHAHEEN, S. et al. Spheroid-Formation (Colonosphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. **Stem Cell Rev Rep**, v. 12, n. 4, p. 492-9, Aug 2016. ISSN 2629-3277. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207017>
- <sup>197</sup> NADKARNI, R. R. et al. Functional Enterospheres Derived In Vitro from Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 9, n. 3, p. 897-912, Sep 12 2017. ISSN 2213-6711. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28867347>
- <sup>198</sup> ANDERSSON-ROLF, A. et al. A video protocol of retroviral infection in primary intestinal organoid culture. **J Vis Exp**, n. 90, p. e51765, Aug 11 2014. ISSN 1940-087X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25146755>
- <sup>199</sup> PLEGUEZUELOS-MANZANO, C. et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269-273, Apr 2020. ISSN 1476-4687. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32106218>
- <sup>200</sup> PUSCHHOF, J. et al. Intestinal organoid cocultures with microbes. **Nat Protoc**, v. 16, n. 10, p. 4633-4649, Oct 2021. ISSN 1750-2799. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34381208>

## 6 Literaturverzeichnis

- 201 JANG, K. K. et al. Variable susceptibility of intestinal organoid-derived monolayers to SARS-CoV-2 infection. **PLoS Biol**, v. 20, n. 3, p. e3001592, Mar 2022. ISSN 1545-7885. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35358182>
- 202 KAKNI, P. et al. Hypoxia-tolerant apical-out intestinal organoids to model host-microbiome interactions. **J Tissue Eng**, v. 14, p. 20417314221149208, 2023. ISSN 2041-7314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36699634>
- 203 FASCIANO, A. C. et al. Yersinia pseudotuberculosis YopE prevents uptake by M cells and instigates M cell extrusion in human ileal enteroid-derived monolayers. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1988390, 2021. ISSN 1949-0984. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34793276>
- 204 NICKERSON, K. P. et al. A Versatile Human Intestinal Organoid-Derived Epithelial Monolayer Model for the Study of Enteric Pathogens. **Microbiol Spectr**, v. 9, n. 1, p. e0000321, Sep 03 2021. ISSN 2165-0497. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34106568>
- 205 CO, J. Y. et al. Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. **Cell Rep**, v. 26, n. 9, p. 2509-2520.e4, Feb 26 2019. ISSN 2211-1247. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30811997>
- 206 DUTTA, D.; HEO, I.; O'CONNOR, R. Studying Cryptosporidium Infection in 3D Tissue-derived Human Organoid Culture Systems by Microinjection. **J Vis Exp**, n. 151, Sep 14 2019. ISSN 1940-087X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31566619>
- 207 HEO, I. et al. Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids. **Nat Microbiol**, v. 3, n. 7, p. 814-823, Jul 2018. ISSN 2058-5276. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29946163>
- 208 LUU, L. et al. An Open-Format Enteroid Culture System for Interrogation of Interactions Between. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 9, p. 300, 2019. ISSN 2235-2988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31555604>
- 209 PETRI, W. A.; SCHAENMAN, J. M. Waterborne Parasites | Entamoeba. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Elsevier, 1999. p.2291-2295. ISBN 9780122270703.
- 210 NASH, T. J. et al. Inside-out chicken enteroids with leukocyte component as a model to study host-pathogen interactions. **Commun Biol**, v. 4, n. 1, p. 377, Mar 19 2021. ISSN 2399-3642. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33742093>
- 211 DERRICOTT, H. et al. Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. **Cell Tissue Res**, v. 375, n. 2, p. 409-424, Feb 2019. ISSN 1432-0878. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30259138>

## 6 Literaturverzeichnis

- 212 HOLTBAUS, D. et al. Dissection of Barrier Dysfunction in Organoid-Derived Human Intestinal Epithelia Induced by *Giardia duodenalis*. **Gastroenterology**, v. 162, n. 3, p. 844-858, Mar 2022. ISSN 1528-0012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34822802>
- 213 MARTORELLI DI GENOVA, B. et al. Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction. **PLoS Biol**, v. 17, n. 8, p. e3000364, Aug 2019. ISSN 1545-7885. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31430281>
- 214 STAAB, J. F. et al. Co-Culture System of Human Enteroids/Colonoids with Innate Immune Cells. **Curr Protoc Immunol**, v. 131, n. 1, p. e113, Dec 2020. ISSN 1934-368X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33166041>
- 215 WILKE, G. et al. A Stem-Cell-Derived Platform Enables Complete *Cryptosporidium* Development In Vitro and Genetic Tractability. **Cell Host Microbe**, v. 26, n. 1, p. 123-134.e8, Jul 10 2019. ISSN 1934-6069. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31231046>
- 216 KRUG, S. M.; FROMM, M.; GÜNZEL, D. Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. **Biophys J**, v. 97, n. 8, p. 2202-11, Oct 21 2009. ISSN 1542-0086. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843452>
- 217 WEIß, F. et al. Human duodenal organoid-derived monolayers serve as a suitable barrier model for duodenal tissue. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1515, n. 1, p. 155-167, Sep 2022. ISSN 1749-6632. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35666953>
- 218 BOCCELLATO, F. et al. Polarised epithelial monolayers of the gastric mucosa reveal insights into mucosal homeostasis and defence against infection. **Gut**, v. 68, n. 3, p. 400-413, Mar 2019. ISSN 1468-3288. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29467166>
- 219 ARORA, K.; NAREN, A. P. 5.06 - Pharmacology of Secretory Diarrhea. In: KENAKIN, T. (Ed.). **Comprehensive Pharmacology**. Elsevier, 2022. cap. 5, p.110-121. ISBN 9780128208762.
- 220 CRAWLEY, S. W.; MOOSEKER, M. S.; TYSKA, M. J. Shaping the intestinal brush border. **J Cell Biol**, v. 207, n. 4, p. 441-51, Nov 24 2014. ISSN 1540-8140. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422372>
- 221 BELO, J. et al. The role of SOX9 transcription factor in pancreatic and duodenal development. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 22, p. 2935-43, Nov 15 2013. ISSN 1557-8534. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23806070>
- 222 FORMEISTER, E. J. et al. Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 296, n. 5, p. G1108-18, May 2009. ISSN 0193-1857. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228882>

## 6 Literaturverzeichnis

- 223 BLACHE, P. et al. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. **J Cell Biol**, v. 166, n. 1, p. 37-47, Jul 05 2004. ISSN 0021-9525. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240568>
- 224 DECKX, R. J.; VANTRAPPEN, G. R.; PAREIN, M. M. Localization of lysozyme activity in a Paneth cell granule fraction. **Biochim Biophys Acta**, v. 139, n. 1, p. 204-7, May 16 1967. ISSN 0006-3002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4166394>
- 225 YIN, X. et al. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5+ intestinal stem cells and their progeny. **Nat Methods**, v. 11, n. 1, p. 106-12, Jan 2014. ISSN 1548-7105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292484>
- 226 DRUMMOND, C. G. et al. Enteroviruses infect human enteroids and induce antiviral signaling in a cell lineage-specific manner. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 7, p. 1672-1677, Feb 14 2017. ISSN 1091-6490. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28137842>
- 227 LI, X.; OOTANI, A.; KUO, C. An Air-Liquid Interface Culture System for 3D Organoid Culture of Diverse Primary Gastrointestinal Tissues. **Methods Mol Biol**, v. 1422, p. 33-40, 2016. ISSN 1940-6029. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27246020>
- 228 ANGUS, H. C. et al. An autologous colonic organoid-derived monolayer model to study immune: bacterial interactions in Crohn's disease patients. **Clin Transl Immunology**, v. 11, n. 8, p. e1407, 2022. ISSN 2050-0068. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35924188>
- 229 LOPEZ-ESCALERA, S.; WELLEJUS, A. Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as. **Biochem Biophys Rep**, v. 31, p. 101314, Sep 2022. ISSN 2405-5808. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35873654>
- 230 SJÖBERG, Å. et al. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 1-2, p. 166-80, Jan 23 2013. ISSN 1879-0720. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103351>
- 231 LU, Z. et al. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 3, p. e24978, Jul 01 2013. ISSN 2168-8362. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478939>
- 232 GÜNZEL, D.; YU, A. S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiol Rev**, v. 93, n. 2, p. 525-69, Apr 2013. ISSN 1522-1210. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23589827>
- 233 KRAFT, M. R. et al. *Giardia's* Epithelial Cell Interaction In Vitro: Mimicking Asymptomatic Infection? **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 421, 2017. ISSN 2235-2988. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018775>

## 6 Literaturverzeichnis

- 234 BETANZOS, A. et al. The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65100, 2013. ISSN 1932-6203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762290>
- 235 MARTÍNEZ-PALOMO, A. et al. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. **J Protozool**, v. 32, n. 1, p. 166-75, Feb 1985. ISSN 0022-3921. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2859368>
- 236 LI, E. et al. *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5112-9, Nov 1994. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927794>
- 237 LEROY, A. et al. *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. **FASEB J**, v. 14, n. 9, p. 1139-46, Jun 2000. ISSN 0892-6638. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834936>
- 238 TYSNES, K. R.; ROBERTSON, L. J. Investigation of effects of *Giardia duodenalis* on transcellular and paracellular transport in enterocytes using in vitro Ussing chamber experiments. **Parasitology**, v. 142, n. 5, p. 691-7, Apr 2015. ISSN 1469-8161. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395017>
- 239 YUAN, L. et al. Two-Stage Interpretation of Changes in TEER of Intestinal Epithelial Layers Protected by Adhering Bifidobacteria During. **Front Microbiol**, v. 11, p. 599555, 2020. ISSN 1664-302X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33329490>
- 240 VAN DER POST, S.; HANSSON, G. C. Membrane protein profiling of human colon reveals distinct regional differences. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 9, p. 2277-87, Sep 2014. ISSN 1535-9484. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24889196>
- 241 BRAZIL, J. C.; PARKOS, C. A. Finding the sweet spot: glycosylation mediated regulation of intestinal inflammation. **Mucosal Immunol**, v. 15, n. 2, p. 211-222, Feb 2022. ISSN 1935-3456. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34782709>
- 242 ADLER, P. et al. High affinity binding of the *Entamoeba histolytica* lectin to polyvalent N-acetylgalactosaminides. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p. 5164-71, Mar 10 1995. ISSN 0021-9258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890626>
- 243 SINGH, B. et al. Ileal amoebiasis. **J R Coll Surg Edinb**, v. 42, n. 3, p. 200-2, Jun 1997. ISSN 0035-8835. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195819>
- 244 TILLACK, M. et al. Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 149, n. 1, p. 58-64, Sep 2006. ISSN 0166-6851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753229>

## 6 Literaturverzeichnis

- 245 ANDERS, J. et al. Genes differentially expressed between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* clones influence pathogenicity-associated phenotypes by multiple mechanisms. **PLoS Pathog**, v. 19, n. 12, p. e1011745, Dec 2023. ISSN 1553-7374.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38134215>
- 246 SHIMOGAWA, M. M. et al. Parasite motility is critical for virulence of African trypanosomes. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 9122, Jun 14 2018. ISSN 2045-2322.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29904094>
- 247 NAYERI, T.; SARVI, S.; DARYANI, A. Effective factors in the pathogenesis of. **Heliyon**, v. 10, n. 10, p. e31558, May 30 2024. ISSN 2405-8440.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38818168>
- 248 ZHAO, X. H. et al. Integrative analysis reveals marker genes for intestinal mucosa barrier repairing in clinical patients. **iScience**, v. 26, n. 6, p. 106831, Jun 16 2023. ISSN 2589-0042.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37250791>
- 249 ZHAO, R. Z. et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **Int J Mol Med**, v. 44, n. 1, p. 3-15, Jul 2019. ISSN 1791-244X.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31115493>
- 250 HU, J. et al. LA39 Activates the Oxidative Phosphorylation Pathway in Porcine Intestinal Epithelial Cells. **Front Microbiol**, v. 9, p. 3025, 2018. ISSN 1664-302X.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619122>
- 251 FREY, M. R.; BRENT POLK, D. ErbB receptors and their growth factor ligands in pediatric intestinal inflammation. **Pediatr Res**, v. 75, n. 1-2, p. 127-32, Jan 2014. ISSN 1530-0447.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402051>
- 252 SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 35, n. 6, p. 600-4, 2015. ISSN 1532-4281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26096166>
- 253 YEUNG, Y. T. et al. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. **Curr Pharm Des**, v. 24, n. 14, p. 1449-1484, 2018. ISSN 1873-4286.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29589535>
- 254 GAY, N. J.; GANGLOFF, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. **Annu Rev Biochem**, v. 76, p. 141-65, 2007. ISSN 0066-4154.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362201>
- 255 GALVÁN-MOROYOQUI, J. M.; DEL CARMEN DOMÍNGUEZ-ROBLES, M.; MEZA, I. Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin Carbohydrate Recognition Domain of *Entamoeba histolytica*. **Int J Parasitol**, v. 41, n. 10, p. 1101-12, Aug 15 2011. ISSN 1879-0135.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787776>

## 6 Literaturverzeichnis

- 256 AGUILAR-ROJAS, A. et al. Insights into amebiasis using a human 3D-intestinal model. **Cell Microbiol**, v. 22, n. 8, p. e13203, Aug 2020. ISSN 1462-5822.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32175652>
- 257 ZHANG, Z. et al. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse-human intestinal xenograft model of disease. **Infect Immun**, v. 71, n. 9, p. 5355-9, Sep 2003. ISSN 0019-9567.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933883>
- 258 MOONAH, S. N.; JIANG, N. M.; PETRI, W. A. Host immune response to intestinal amebiasis. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 8, p. e1003489, 2013. ISSN 1553-7374.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990778>
- 259 BURCHARD, G. D.; PRANGE, G.; MIRELMAN, D. Interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and the human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes. **Parasitol Res**, v. 79, n. 2, p. 140-5, 1993. ISSN 0932-0113.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8475032>
- 260 PRATHAP, K.; GILMAN, R. The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. **Am J Pathol**, v. 60, n. 2, p. 229-46, Aug 1970. ISSN 0002-9440.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5457212>
- 261 UDDIN, M. J. et al. The IL-33-ILC2 pathway protects from amebic colitis. **Mucosal Immunol**, v. 15, n. 1, p. 165-175, Jan 2022. ISSN 1935-3456.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34400793>
- 262 NAKADA-TSUKUI, K.; NOZAKI, T. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. **Front Immunol**, v. 7, p. 175, 2016. ISSN 1664-3224.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27242782>
- 263 URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Immune Response to the Enteric Parasite. **Physiology (Bethesda)**, v. 35, n. 4, p. 244-260, Jul 01 2020. ISSN 1548-9221.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32490746>
- 264 HUHTA, H. et al. The Expression of Toll-like Receptors in Normal Human and Murine Gastrointestinal Organs and the Effect of Microbiome and Cancer. **J Histochem Cytochem**, v. 64, n. 8, p. 470-82, Aug 2016. ISSN 1551-5044.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27370795>
- 265 COLLADO-ROMERO, M. et al. Quantitative analysis of the immune response upon *Salmonella typhimurium* infection along the porcine intestinal gut. **Vet Res**, v. 41, n. 2, p. 23, 2010. ISSN 0928-4249. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941811>

## 6 Literaturverzeichnis

- 266 GILCHRIST, C. A. et al. Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. **Mol Biochem Parasitol**, v. 147, n. 2, p. 163-76, Jun 2006. ISSN 0166-6851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569449>
- 267 PINEDA, E.; PERDOMO, D. *Entamoeba histolytica* under Oxidative Stress: What Countermeasure Mechanisms Are in Place? **Cells**, v. 6, n. 4, Nov 21 2017. ISSN 2073-4409. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160807>
- 268 JEELANI, G. et al. Glycerol biosynthetic pathway plays an essential role in proliferation and antioxidative defense in the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Sci Rep**, v. 13, n. 1, p. 14596, Sep 05 2023. ISSN 2045-2322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37669981>
- 269 MURRAY, H. W.; ALEY, S. B.; SCOTT, W. A. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxygen intermediates. **Mol Biochem Parasitol**, v. 3, n. 6, p. 381-91, Oct 1981. ISSN 0166-6851. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272108>
- 270 GHADIRIAN, E.; SOMERFIELD, S. D.; KONGSHAVN, P. A. Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants. **Infect Immun**, v. 51, n. 1, p. 263-7, Jan 1986. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2867045>
- 271 BRUCHHAUS, I.; RICHTER, S.; TANNICH, E. Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. **Biochem J**, v. 326 ( Pt 3), n. Pt 3, p. 785-9, Sep 15 1997. ISSN 0264-6021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9307028>
- 272 JANG, S.; IMLAY, J. A. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. **J Biol Chem**, v. 282, n. 2, p. 929-37, Jan 12 2007. ISSN 0021-9258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17102132>
- 273 REEVES, R. E. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903. **Adv Parasitol**, v. 23, p. 105-42, 1984. ISSN 0065-308X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6085216>
- 274 SANTOS, F. et al. Maintenance of intracellular hypoxia and adequate heat shock response are essential requirements for pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*. **Cell Microbiol**, v. 17, n. 7, p. 1037-51, Jul 2015. ISSN 1462-5822. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25611463>
- 275 SANTOS, F. et al. Functional characterization and subcellular distribution of two recombinant cytosolic HSP70 isoforms from *Entamoeba histolytica* under normal and stress conditions. **Parasitol Res**, v. 119, n. 4, p. 1337-1351, Apr 2020. ISSN 1432-1955. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32056023>
- 276 WEBER, C. et al. Extensive transcriptome analysis correlates the plasticity of *Entamoeba histolytica* pathogenesis to rapid phenotype changes depending on the environment. **Sci Rep**, v. 6, p. 35852, Oct 21 2016. ISSN 2045-2322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27767091>

## 6 Literaturverzeichnis

- 277 MANICH, M. et al. Morphodynamics of the Actin-Rich Cytoskeleton in. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, p. 179, 2018. ISSN 2235-2988.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896453>
- 278 POLLARD, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 8, Aug 01 2016. ISSN 1943-0264. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26988969>
- 279 BRAVO-CORDERO, J. J. et al. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 7, p. 405-15, Jul 2013. ISSN 1471-0080.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778968>
- 280 SIDANI, M. et al. Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. **J Cell Biol**, v. 179, n. 4, p. 777-91, Nov 19 2007. ISSN 1540-8140.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025308>
- 281 SATERIALE, A. et al. Feed-forward regulation of phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun**, v. 80, n. 12, p. 4456-62, Dec 2012. ISSN 1098-5522.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045476>
- 282 ARHETS, P. et al. Virulence and functions of myosin II are inhibited by overexpression of light meromyosin in *Entamoeba histolytica*. **Mol Biol Cell**, v. 9, n. 6, p. 1537-47, Jun 1998. ISSN 1059-1524. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614192>
- 283 STANLEY, S. L. et al. Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. **Infect Immun**, v. 63, n. 4, p. 1587-90, Apr 1995. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890426>
- 284 LI, E. et al. Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. **Infect Immun**, v. 63, n. 10, p. 4150-3, Oct 1995. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558332>
- 285 ANKRI, S. et al. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. **Infect Immun**, v. 67, n. 1, p. 421-2, Jan 1999. ISSN 0019-9567. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9864246>
- 286 BRUCHHAUS, I. et al. 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**, v. 2, n. 3, p. 501-9, Jun 2003. ISSN 1535-9778.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796295>
- 287 HE, C. et al. A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. **J Biol Chem**, v. 285, n. 24, p. 18516-27, Jun 11 2010. ISSN 1083-351X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378535>

## 6 Literaturverzeichnis

- <sup>288</sup> OKADA, M. et al. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 4, p. 827-31, Apr 2005. ISSN 1535-9778.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821141>

7 Publikationen

## 7 Publikationen

**Anders J\***, König C\*, Lender C, Hellhund A, Nehls S, Shalabi I, Honecker B, Lorenzen S, Meyer M, Matthiesen J, Cadar D, Roeder T, Galal Metwally N, Lotter H, Bruchhaus I. Genes differentially expressed between pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* clones influence pathogenicity-associated phenotypes by multiple mechanisms. PLoS Pathog. 2023 Dec 22;19(12):e1011745. doi: 10.1371/journal.ppat.1011745. PMID: 38134215; PMCID: PMC10773965.

\*geteilte Autorenschaft

## 8 Danksagung

### 8 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Iris Bruchhaus für die Betreuung und Bereitstellung dieses Promotionsprojektes in ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Insbesondere bedanke ich mich für die Unterstützung, Zeit und für die hilfreichen, anregenden Diskussionen, die mir bei der Bearbeitung dieses Projekts weitergeholfen haben, aber auch für den Raum eigene Ideen umzusetzen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Tim-Wolf Gilberger für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters dieser Arbeit.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die Hilfe und Unterstützung im Laboralltag sowie die entspannte Atmosphäre. Ein besonderer Dank geht an Barbara, nicht nur für ihren fachlichen Input, sondern auch für die emotionale Unterstützung, die besonders an stressigen Tagen wichtig war. Ihr und Constantin König danke ich außerdem für die Einführung in die Welt der Amöben. Ein großer Dank geht an meine beiden Masterstudenten Michel Glagowski und Rebecca Eler für ihre Unterstützung und die Durchführung der vielen Co-Inkubationsexperimente. Es hat Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten. Vielen Dank an Susann, Pilar, Hanifeh, Johannes, David und Nahla für eure Hilfsbereitschaft und jederzeit offenen Ohren bei Problemen.

Außerdem danke ich der AG Aebischer vom Robert-Koch-Institut in Berlin für die Möglichkeit, einen Teil der Experimente vor Ort durchzuführen. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. Christian Klotz für seine Zeit und Ratschläge, wenn Probleme auftraten. Antonia Müller danke ich ganz besonders für die Durchführung der IFAs und die Mikroskopie, sowie die Unterstützung und Zeit während der Co-Inkubationen.

Vielen Dank an Dr. Dániel Cadar und Heike Baum für das Sequenzieren meiner Proben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Antonella Fazio von der AG Huber am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg, die mir die Kultur intestinaler Organoiden gezeigt hat.

Ein großer Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Danke insbesondere an meine Mama, meine Oma, Arwed, Charly, Franka und Tommy für eure Unterstützung und aufbauenden Worte, wenn ich sie dringend gebraucht habe!

Danke Gordon für das Aushalten meines gestressten Ichs, deiner Ruhe, deiner Unterstützung, Ablenkung und vor allem für dein unerschöpfliches Verständnis!

Danke