

Analyse des intestinalen  
Invasionsprozesses von  
*Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903)  
unter Verwendung eines humanen  
2D-Organoidmodells

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Constantin Roland Willi Günter König

Hamburg, 2022

**Wissenschaftliche Betreuung:**

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

1. **Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Iris Bruchhaus  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Arbeitsgruppe Protozoologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg
2. **Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Esther Schnettler  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin  
Arbeitsgruppe Molekulare Entomologie  
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

**Disputation:** 08.07.2022

*Tue es oder tue es nicht.  
Es gibt kein Versuchen.*

Yoda  
Star Wars -  
Das Imperium schlägt zurück

## Zusammenfassung

Das intestinale Protozoon *Entamoeba histolytica* zählt als Auslöser der Amöbiasis vor allem in tropischen Regionen mit schlechten hygienischen Standards, zu einem wichtigen humanen Parasiten. Die Trophozoiten können Monate bis Jahre im Darm ihres Wirtes leben ohne dabei Symptome auszulösen. Jedoch kommt es in rund 10% der Infektionen zu einer invasiven Verlaufsform, wobei die Trophozoiten die Darmwand des Wirtes penetrieren und in den Blutstrom gelangen können. Häufig endet diese Verlaufsform in der Leber mit der Bildung von, für den Wirt tödlichen, Leberabszessen. Die genauen Umstände und Faktoren einer solchen Verlaufsform sind weitestgehend ungeklärt. Bisher konnten vor allem Cysteinproteasen, Gal/GalNAc Lektine und *amoebapores* als wichtige Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* beschrieben werden. Für die Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren wurden bisher oft vergleichende Studien von nicht-pathogenen und pathogenen Isolaten durchgeführt. In einer vergleichenden Transkriptomstudie der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden, jedoch beide von dem Isolat HM-1:IMSS abstammen, wurden eine Reihe von unterschiedlich exprimierten Genen identifiziert. Pathogenität beschreibt dabei die Fähigkeit Amöbenleberabszesse nach intrahepatischer Injektion im Tiermodell auszulösen. Dabei konnte für das Gen *ehi\_200230*, welches für die Metalloprotease EhMP8-2 codiert, eine ca. 150-fach höhere Expression in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> im Vergleich zu dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> nachgewiesen werden. Die Überexpression der *ehmp8-2* in dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> führte zu einer signifikanten Reduktion der Pathogenität, während das *silencing* in einem nicht-pathogenen Klon zu einer signifikanten Steigerung der Pathogenität führte. In dem Genom von *E. histolytica* befindet sich noch ein weiteres Gen, was für die Metalloprotease EhMP8-1 codiert. Diese ist in den beiden Klonen gleichermaßen exprimiert. In der vorliegenden Dissertation sollte zunächst der Prozess der Gewebeinvasion von *E. histolytica* anhand eines humanen, intestinalen 2D-Organoidmodells untersucht werden. Dabei wurden Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sowie Transfektanten der beiden Klone in denen die Expression der Metalloproteasen mittels RNAi-basiertem *silencing* gehemmt wurde mit den Organoidkulturen co-inkubiert. Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER), ebenso wie eine mikroskopische Analyse, konnte dabei keinen Unterschied in der Zerstörung des Zellrasens zwischen den beiden Klonen zeigen. Allerdings führte das *silencing* der Metalloproteasen zu einer Reduktion der Zellrasenzerstörung. Die Transkriptomprofile der Organoidzellen nach Kontakt mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, wiesen deutliche Unterschiede im Expressionsprofil auf. Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> scheinen die Immunantwort der Zellen stärker zu stimulieren als die des pathogenen Klons B2<sup>p</sup>. Dabei scheinen vor allem die Ausschüttung von Interleukin-10 und die Stimulation des Toll-like 4 Rezeptors eine tragende Rolle zu spielen. Weiter scheinen die Trophozoiten beider Klone die Homöostase der Organoidzellen zu beeinflussen, indem sie den Energiestoffwechsel, die Proteinbiosynthese und Prozesse der Zellentwicklung stören. In der Genexpression der Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> zeigen sich ebenfalls deutliche Unterschiede nach Co-Inkubation mit den Organoidzellen. Der pathogene Klon B2<sup>p</sup> scheint dabei besser auf den oxidativen Stress zu reagieren, was einen Vorteil in der Immunabwehr mit sich bringt. Für beide Klone konnte ein Anstieg von Stoffwechselwegen des Energiehaushaltes gezeigt werden.

Im Weiteren sollten im Rahmen dieser Dissertation, neben dem oben beschriebenen Einfluss auf die Zellrasenzerstörung, die Bedeutung der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 für die Pathogenität entschlüsselt werden. Dafür wurden Transfektanten, in denen die Genexpression entweder gesteigert oder gehemmt war, phänotypisch charakterisiert. Dabei

war der zytopathische Effekt der *silencer* auf HepG2 Zellen signifikant geringer im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen. Auch führte das *silencing* zu einer signifikant geringeren Cysteinproteaseaktivität in den Transfektanten im Vergleich zum Wildtyp. Eine genauere Analyse zeigte, dass bei den *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> die Cysteinproteasen EhCP-A1 und EhCP-A2 betroffen sind, während bei dem *silencer* des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> die beiden Cysteinproteasen EhCP-A5 und EhCP-A7 eine geringere Aktivität aufwiesen. Eine vergleichende Transkriptomanalyse der Transfektanten führte zur Identifizierung einer Vielzahl an differentiell exprimierten Genen. Dabei waren vor allem bei den *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> viele Gene aus der Familie der AIG1 Proteine ebenfalls signifikant runterreguliert. Die Funktion dieser Proteine ist in *E. histolytica* noch weitestgehend ungeklärt. Weiter konnten eine Reihe von Genen, die für die beiden Untereinheiten des Gal/GalNAc Lektin codieren, als ebenfalls signifikant runterreguliert identifiziert werden. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Co-Inkubationsexperimente von *E. histolytica* mit humanen, intestinalen Organoiden darauf hin, dass pathogene und nicht-pathogene Amöben zu einer unterschiedlichen Stimulation der intestinalen Zellen führen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 die Pathogenität von *E. histolytica* beeinflussen.

## Abstract

The intestinal protozoan *Entamoeba histolytica* is an important human parasite causing amoebiasis, especially in tropical regions with poor sanitary standards. Trophozoites can live in the intestine of their host for months to years without causing symptoms. However, in about 10% of infections, an invasive course occurs in which the trophozoites can penetrate the host's intestine and enter the bloodstream. This form of infection often ends in the liver with the formation of liver abscesses that are fatal to the host. The exact circumstances and factors of such a form of progression are largely unclear. So far, mainly cysteine proteases, Gal/GalNAc lectins, and amoebapores have been described as important pathogenicity factors of *E. histolytica*. Comparative studies of nonpathogenic and pathogenic isolates have often been performed to identify new pathogenicity factors. In a comparative transcriptome study of the clones A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup>, which differ in pathogenicity but are both derived from isolate HM-1:IMSS, a number of differentially expressed genes were identified. Pathogenicity describes the ability to cause amoebic liver abscesses after intrahepatic injection in mice. For the gene *ehmp8-2*, which encodes the metalloprotease EhMP8-2, expression was found to be approximately 150-fold higher in the nonpathogenic clone A1<sup>np</sup> than in the pathogenic clone B2<sup>p</sup>. Overexpression of *ehmp8-2* in the pathogenic clone B2<sup>p</sup> resulted in a significant decrease in pathogenicity, whereas silencing in a nonpathogenic clone resulted in a significant increase in pathogenicity. In the genome of *E. histolytica*, there is another gene encoding the metalloprotease EhMP8-1. This is expressed equally in both clones.

In the present thesis, the process of tissue invasion by *E. histolytica* was first studied in a human 2D intestinal organoid model. Trophozoites of both clones A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup>, as well as transfectants of both clones in which the expression of the metalloproteases was inhibited by RNAi-based silencing, were co-incubated with organoid cultures. Transepithelial electrical resistance (TEER) measurement and microscopic analysis revealed no difference in the destruction of the cell monolayer between the two clones. However, silencing of the metalloproteases resulted in a decrease in cell monolayer destruction. Analysis of the transcriptome of organoid cells after contact with trophozoites of clones A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup>

revealed significant differences in the expression profile. Trophozoites of the nonpathogenic clone A1<sup>np</sup> seem to stimulate the immune response of the cells more strongly than those of the pathogenic clone B2<sup>p</sup>. In particular, the release of interleukin-10 and the stimulation of the Toll-like-4 receptor seem to play an important role. In addition, trophozoites of both clones appear to disrupt organoid cell homeostasis by interfering with energy metabolism, protein biosynthesis, and cell developmental processes. Gene expression of trophozoites of clones A1<sup>np</sup> and B2<sup>p</sup> also shows marked differences after co-incubation with organoid cells. The pathogenic clone B2<sup>p</sup> appears to respond better to oxidative stress resulting in an advantage in immune defense. An increase in metabolic pathways in energy balance was demonstrated for both clones.

Furthermore, in addition to the influence on cell monolayer destruction described above, the importance of the metalloproteases EhMP8-1 and EhMP8-2 for pathogenicity has been deciphered in this work. The cytopathic effect of silencers on HepG2 cells was significantly lower compared to the corresponding controls. In addition, silencing resulted in significantly lower cysteine protease activity in transfectants compared with wild type. More detailed analysis showed that in the silencers of the nonpathogenic clone A1<sup>np</sup>, the cysteine proteases EhCP-A1 and EhCP-A2 were affected, whereas in the silencers of the pathogenic clone B2<sup>p</sup>, both cysteine proteases EhCP-A5 and EhCP-A7 had lower activity. Comparative transcriptome analysis of the transfectants led to the identification of a large number of differentially expressed genes. In particular, many genes encoding for members of the AIG1 protein family were significantly downregulated upon silencing of the non-pathogenic clone A1<sup>np</sup>. The function of these proteins in *E. histolytica* is still unclear. In addition, a number of genes encoding the two subunits of Gal/GalNAc lectin were also identified as significantly downregulated.

In summary, the results of co-incubation experiments of *E. histolytica* with human intestinal organoids indicate that pathogenic and nonpathogenic amoebae lead to different stimulation of intestinal cells. Furthermore, metalloproteases EhMP8-1 and EhMP8-2 were shown to influence the pathogenicity of *E. histolytica*.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>ENTAMOEBIA HISTOLYTICA</i> .....	1
1.1.1 ENTDECKUNG UND EINORDNUNG.....	1
1.1.2 BIOLOGIE UND VORKOMMEN .....	1
1.1.3 DER LEBENSZYKLUS VON <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	2
1.1.4 INTESTINALE UND EXTRA-INTESTINALE VERLAUFSFORM UND THERAPIE .....	4
1.1.5 KULTURISOLATE AM BERNHARD-NOCHT-INSTITUT FÜR TROPENMEDIZIN (BNITM).....	4
1.1.6 PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	6
1.1.7 IDENTIFIZIERUNG NEUER PUTATIVER PATHOGENITÄTSFAKTOREN .....	7
1.2 METALLOPROTEASEN.....	8
1.3 UNTERSUCHUNG DER GEWEBEINVASION VON <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	10
1.3 ORGANOIDE.....	11
<b>2 ZIELSETZUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIAL .....	14
3.1.1 CHEMIKALIEN .....	14
3.1.2 ENZYME UND REAKTIONSPUFFER .....	15
3.1.3 ANTIKÖRPER .....	16
3.1.4 REAKTIONSKITS.....	16
3.1.5 GERÄTE UND SOFTWARE .....	17
3.1.6 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	18
3.1.7 FLUORESCENZFARBSTOFFE .....	19
3.1.8 MARKER UND LADEPUFFER .....	19
3.1.9 PLASMIDE.....	19
3.1.10 OLIGONUKLEOTIDE .....	20
3.1.11 PUFFER UND LÖSUNGEN .....	20
3.1.12 MEDIEN UND ZUSÄTZE .....	22
3.1.13 VERWENDETE ORGANISMEN .....	23
3.1.13.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .....	23
3.1.13.2 <i>Escherichia coli</i> .....	24
3.1.13.3 HepG2 Zellen .....	24
3.1.13.4 Organoidzellen .....	24
3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	25
3.2.1 KULTIVIERUNG VON <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	25
3.2.2 ERNTE VON <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	25
3.2.3 LYSERUNG DER <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	25
3.2.4 TRANSFEKTION VON <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN.....	26
3.2.5 HITZESCHOCK-TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> ZELLEN .....	26
3.2.6 KULTIVIERUNG VON HEPG2 ZELLEN.....	27
3.2.7 ERNTEN DER HEPG2 ZELLEN.....	27
3.2.8 ZELLZAHLBESTIMMUNG .....	27
3.2.9 KULTIVIERUNG VON 3D- UND 2D-ORGANOIDEN.....	27

3.3 BIOCHEMISCHE METHODEN .....	28
3.3.1 PROTEIN KONZENTRATIONSBESTIMMUNG.....	28
3.3.2 SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE .....	28
3.3.3 COOMASSIE-BLAU FÄRBUNG.....	29
3.3.4 WESTERNBLOT .....	29
3.3.5 IMMUNFLUORESCENZANALYSE DER <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	29
3.4 METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG PHÄNOTYPISCHER UND ZELLULÄRER FUNKTIONEN VON <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	30
3.4.1 CYSTEINPROTEASEAKTIVITÄT .....	30
3.4.2 SUBSTRATGELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS VON CYSTEINPROTEASEN.....	31
3.4.3 BESTIMMUNG DER LYSE VON HEPG2 ZELLEN DURCH <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN.....	31
3.4.4 BESTIMMUNG DES ZYTOPATHISCHEN EFFEKTES DER <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN AUF HEPG2 ZELLEN.....	32
3.4.5 INFektion DER 2D-ORGANOID-MONOLAYER MIT <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	33
3.4.6 MESSUNG DES TRANSEPIHELIALER ELEKTRISCHEN WIDERSTANDES DER 2D-ORGANOID-MONOLAYER.....	34
3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	34
3.5.1 PLASMID-MINI-PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i> .....	34
3.5.2 PLASMID-MEDI-PRÄPARATION AUS <i>E. COLI</i> .....	34
3.5.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA UND RNA .....	35
3.5.4 POLYMERASE KETTENREAKTION .....	35
3.5.5 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....	36
3.5.6 RESTRIKTIONSVERDAU .....	36
3.5.7 TOPO KLONIERUNG.....	36
3.5.8 LIGATION.....	37
3.5.9 ÜBERPRÜFUNG VON VEKTOR-KONSTRUKTEN .....	37
3.5.10 GENERIERUNG DES MYC-KONSTRUKTES FÜR DIE LOKALISATION DER EHMP8-1 UND DER EHMP8-2 IN DEN TROPHOZOITEN .....	37
3.5.11 ISOLIERUNG VON RNA AUS <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN UND HUMANZELLEN .....	38
3.5.12 SYNTHESE VON CDNA.....	38
3.5.13 QUANTITATIVE <i>REAL-TIME</i> PCR .....	38
3.5.14 ÜBERPRÜFUNG DER RNA QUALITÄT FÜR DIE TRANSKRIPTOMANALYSE .....	39
3.5.15 TRANSKRIPTOMANALYSEN MITTELS <i>NEXT GENERATION SEQUENCING</i> (NGS) .....	40
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 INVASION DER 2D-ORGANOIDKULTUREN.....</b>	<b>40</b>
4.1.1 TEER MESSUNGEN .....	41
4.1.1.1 Co-Inkubation von 2D-Organoidkulturen und Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	41
4.1.1.2 Einfluss der Cysteinproteasen auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen.....	42
4.1.1.3 Einfluss der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen.....	44
4.1.2 MIKROSKOPISCHE ANALYSE DER INVASION DER 2D-ORGANOIDZELLEN.....	46
4.1.2.1 IFA der 2D-Organoidkulturen 8 Stunden nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	46
4.1.3 ANALYSE DER TRANSKRIPTOMDATEN DER CO-INKUBATIONS EXPERIMENTE .....	47
4.1.3.1 Analyse der Transkriptome der 2D-Organoidkulturen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der beiden Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	48
4.1.3.2 GO-Analysen der 2D-Organoidkultur.....	49
4.1.3.2.1 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant hochregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation .....	49
4.1.3.2.2 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant runterregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation .....	51

4.1.3.2.3 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant hochregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation .....	53
4.1.3.2.4 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant runterregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation .....	56
4.1.3.3 Analyse der Transkriptome der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit den 2D-Organoidkulturen.....	58
4.1.3.4 GO-Analysen der Trophozoiten von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	59
4.1.3.4.1 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant hochregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.....	59
4.1.3.4.2 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant runterregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen .....	60
4.1.3.4.3 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant hochregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.....	61
4.1.3.4.4 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant runterregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen .....	62
4.1.3.5 Analyse der differentiell exprimierten Gene in A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	63
4.1.3.5.1 Analyse der nach 4 Stunden Co-Inkubation differentiell exprimierten Gene in den Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	63
4.1.3.5.2 Analyse der nach 8 Stunden Co-Inkubation differentiell exprimierten Gene in A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	65
4.1.3.5 Vergleich zum Wildtyp.....	67
4.2 CHARAKTERISIERUNG DER METALLOPROTEASEN EHMP8-1 UND EHMP8-2.....	69
4.2.1 ÜBERPRÜFUNG VON ÜBEREXPRESSION UND SILENCING DER GENE <i>EHI_200230</i> UND <i>EHI_042870</i> IN DEN <i>E. HISTOLYTICA</i> TRANSFEKTANTEN .....	69
4.2.2 LYSE VON HEPG2 ZELLEN DURCH <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN.....	71
4.2.3 ZYTOPATHISCHER EFFEKT DER <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN AUF HEPG2 ZELLEN .....	72
4.2.4 CYSTEINPROTEASEAKTIVITÄT DER <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN .....	73
4.2.5 SUBSTRAGELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS EINZELNER CYSTEINPROTEASEN DER <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN.....	74
4.2.6 ANALYSE DER TRANSKRIPTOMDATEN DER METALLOPROTEASE <i>SILENCER</i> .....	75
4.2.7 LOKALISATION DER METALLOPROTEASEN EHMP8-1 UND EHMP8-2 IN DEN <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN	79
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>5.1 GEWEBEINVASION VON <i>E. HISTOLYTICA</i> TROPHOZOITEN ANHAND EINES HUMANEN 2D-ORGANOIDMODELLS....</b>	<b>84</b>
5.1.1 GEWEBEINVASION VON A1 <sup>np</sup> UND B2 <sup>p</sup> UND EINFLUSS DER PROTEASEN.....	85
5.1.2 ANALYSE DER TRANSKRIPTOME VON ORGANOIDZELLEN UND TROPHOZOITEN DER KLONE A1 <sup>np</sup> UND B2 <sup>p</sup> NACH CO-INKUBATION.....	86
5.1.2.1 Analyse der Transkriptome der Organoidzellen nach Co-Inkubation mit A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	87
5.1.2.1.1 Analyse der signifikant hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	87
5.1.2.1.2 Analyse der signifikant runterregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> .....	89
5.1.2.2 Analyse der Transkriptome von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit Organoidzellen .....	90
5.1.2.2.1 Analyse der signifikant hochregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit Organoidzellen .....	90
5.1.2.2.2 Analyse der signifikant runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit Organoidzellen.....	91
5.1.2.2.3 Expression von Pathogenitätsfaktoren nach Co-Inkubation .....	92
5.2 DIE METALLOPROTEASEN EHMP8-1 UND EHMP8-2 VON <i>E. HISTOLYTICA</i> .....	94
5.2.1 EINFLUSS DER EHMP8-1 UND EHMP8-2 AUF DIE PATHOGENITÄT .....	94
5.2.2 ANALYSE DER TRANSKRIPTOME VON <i>SILENCERN</i> DER METALLOPROTEASEN.....	96

5.2.3 LOKALISATION DER EHMP8-1 UND EHMP8-2 MITTELS MYC-TAG.....	97
<b>6 AUSBLICK.....</b>	<b>98</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>XIX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abk.:</b>	<b>Beschreibung</b>
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ALA	Amöbenleberabszess
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovines serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
Ct	<i>cycle of threshold</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Centimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CP	Cysteinprotease
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E64	L-trans-Epoxyuccinyl-1-leucylamido-4-(guanidino)-buta
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. nutalli</i>	<i>Entamoeba nutalli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EhCP	<i>Entamoeba histolytica</i> Cysteinprotease
EhMP	<i>Entamoeba histolytica</i> Metalloprotease
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
F	Farad
FCS	Fetal calf serum
g	Erdbeschleunigung
Gal/GalNAc	Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin
g	Gramm
gDNA	Genomische DNA
GOI	<i>gene of interest</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HEPES	4-2-Hydrogenethylpiperazin-1-ethansulfonsäure
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
Kal	Kalibrator

kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mol pro Liter
m	milli
mA	Milliampere
min	Minute
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Myc	Myelocytomatose
np	nicht-pathogen
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
p	pathogen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	quantitative PCR
Ref	Referenzgen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sog.	sogenannt
SP	Signalpeptid
sRNA	<i>small</i> RNA
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TY	<i>trypticase yeast</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
WB	Westernblot
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Z-Arg-Arg-pNA	Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid
z.B.	zum Beispiel
ÜN	über Nacht
$\Delta$	Delta, Differenz
$\epsilon$	Epsilon, Extinktionskoeffizient
$\mu$	mikro
°C	Grad Celsius

# 1 Einleitung

## 1.1 *Entamoeba histolytica*

### 1.1.1 Entdeckung und Einordnung

Das humanpathogene Protozoon *Entamoeba histolytica* wird taxonomisch in die polyphyletische Gruppe der Amoebozoa eingeordnet, zu der heute rund 2400 Arten gezählt werden (Pawlowski *et al.*, 2012). Die Arten dieser Gruppe weisen keine feste Gestalt auf und bilden für die Aufnahme von Nahrung, sowie die Fortbewegung sog. Pseudopodien aus (Singleton *et al.*, 2006). Sie kommen ubiquitär vor, wobei sie sowohl terrestrische, als auch aquatische Lebensräume besiedeln (Adl *et al.* 2005; Lucius & Loos-Frank, 2008).

Die erste wissenschaftliche Beschreibung von *E. histolytica* erfolgte 1875 durch den russischen Physiologen Fedor Lösch. Er isolierte den Erreger aus dem Stuhl eines Bauern, welcher an Dysenterie litt und nannte ihn *Amoeba coli* (Lösch, 1875). Ende des 19. Jahrhunderts identifizierten Quincke und Roos *E. histolytica* als Auslöser der Amöbenruhr und differenzierten ihn von der nicht-pathogenen Art *Entamoeba coli* (Quincke & Roos, 1893). Die erste vollständige Artbeschreibung folgte im Jahr 1903 durch Fritz Schaudinn, der den Organismus aufgrund seiner Fähigkeit Gewebe zu zerstören *Entamoeba histolytica* nannte (Schaudinn, 1903). Als Folge eines Selbstversuches starb Schaudinn im Alter von 35 Jahren an einer schweren Verlaufsform der Amöbiasis (Despommier & Gwadz, 1995).

### 1.1.2 Biologie und Vorkommen

Der Parasit *E. histolytica* besitzt zwei Stadien in seinem Lebenszyklus. Die ausschließlich im Wirtsdarm vorkommenden, aktiv beweglichen Trophozoiten und die Zysten, welche die Überdauerungsform darstellen. Während die Trophozoiten einen Durchmesser von 10 – 50  $\mu\text{M}$  haben, erreichen die Zysten eine durchschnittliche Größe von 15  $\mu\text{M}$  (Stanley, 2003). Die Trophozoiten besitzen keine feste Gestalt und sind mit ihrem obligat anaeroben Stoffwechsel optimal an das Leben im menschlichen Darm angepasst. Zur Nahrungsaufnahme und Fortbewegung bildet der Organismus in dieser Form Pseudopodien aus, indem er einen schnellen Plasmastrom im Zellinneren erzeugt (Hausmann *et al.*, 2003). Die Trophozoiten sind von einer einfachen Zellmembran, bestehend aus Phospholipiden und Cholesterin, umschlossen (Andrä *et al.*, 2004). Im Zellinneren finden sich Organellen, die in Aufbau und Funktion denen von höheren eukaryotischen Zellen ähneln. Rund 40% des Zellvolumens machen dabei Vakuolen und lysosomartige Vesikel aus, welche an Verdauungsprozessen beteiligt sind und im ständigen Austausch mit dem extrazellulären Raum stehen (Scholze & Tannich, 1994). Es fehlen sowohl klassische Mitochondrien, als auch ein definierter Golgi-Apparat. Jedoch konnten das mitochondriale Chaperonin 60 an kleinen doppelmembrangebundenen Strukturen, den Mitosomen, entdeckt werden (Clark *et al.*, 2007; Hjort *et al.*, 2010). Weiter wurden Golgi-ähnliche Vesikel, sowie ein Endoplasmatisches Retikulum und Peroxisomen in *E. histolytica* nachgewiesen (Tovar *et al.*, 1999; Bredeston *et al.*, 2005; Verner *et al.*, 2021).

## 1 Einleitung

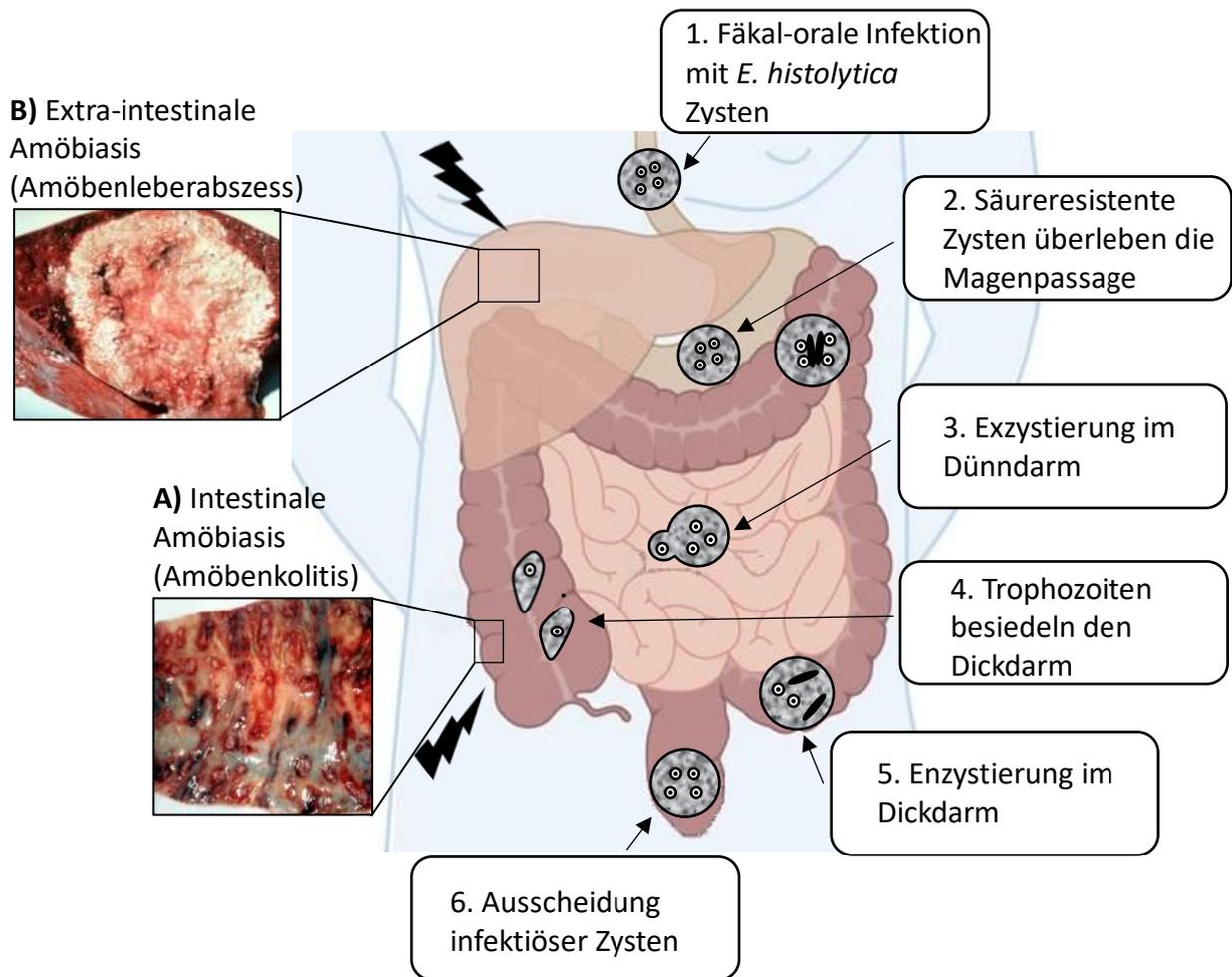
Im Jahr 2005 wurde das Genom von *E. histolytica* vollständig sequenziert (Loftus *et al.*, 2005). Dabei zeigte sich eine Genomgröße von 23,7 Mbp. Es konnten ca. 8500 Gene identifiziert werden, von denen nur 25% Introns aufwiesen. Die durchschnittliche Größe eines Gens liegt bei 1167 bp, während diese zu rund 76% aus Adenin und Thymin bestehen (Clark *et al.*, 2007; Weedall & Hall, 2011).

*E. histolytica* kommt weltweit verbreitet vor. Jedoch stellen tropische und subtropische Regionen der Erde das größte Verbreitungsgebiet dar, da die dort herrschenden schlechteren medizinischen und hygienischen Bedingungen die Ausbreitung des Erregers begünstigen (Wertheim, *et al.*, 2012). So tritt das Krankheitsbild der Amöbiasis vor allem in Entwicklungsländern in Zentral- und Südamerika sowie in Asien auf (Shirley *et al.*, 2019).

### 1.1.3 Der Lebenszyklus von *E. histolytica*

Der natürliche Wirt von *E. histolytica* stellt, neben einigen wenigen Primatenarten, der Mensch dar (van Lunzen *et al.*, 1996). Der Erreger durchläuft in seinem Lebenszyklus zwei wesentliche Stadien. So beginnt eine Infektion in der Regel mit der oralen Aufnahme der vierkernigen Zystenform durch verunreinigtes Trinkwasser oder Nahrungsmittel (Blessmann *et al.*, 2002). Aufgrund der chitinhaltigen und säureresistenten Hülle überleben die Zysten die Magenpassage und gelangen in den Dünndarm. Aufgrund der pH-Wert Änderung entwickeln sie sich durch Exzystierung zu achtkernigen Trophozoiten, woraus durch mehrmalige Plasmateilungen einkernige Trophozoiten entstehen (Despommier *et al.*, 1995). Diese wandern über den Dünndarm in Dickdarm, wo sie sich mithilfe von an der Zelloberfläche befindlichem Adhärenz-Lektin an die Mukosazellen des Wirtes heften (Petri *et al.*, 1989). Die Trophozoiten ernähren sich hauptsächlich von Bakterien und Detritus (Salles *et al.*, 2003). Außerhalb des Wirtes ist *E. histolytica* in dieser Form nicht überlebensfähig (Burchard & Tannich, 2004; Mehlhorn, 2012; Moss, 2016). Die Trophozoiten vermehren sich durch asexuelle Zweiteilung und enzystieren im unteren Dickdarm erneut zu Zysten, welche den Wirt über den Fäzes verlassen und von einem neuen Wirt aufgenommen werden können (Burchard & Tannich, 2004; Mehlhorn, 2012; Moss, 2016). Im Stuhl von infizierten Wirten können Mengen von bis zu 100 Millionen Zysten nachgewiesen werden, welche mehrere Wochen bis Monate infektiös sind (Salles *et al.*, 2003; Burchard & Tannich, 2004; Mi-Ichi *et al.*, 2016). Die Trophozoiten können mehrere Monate bis Jahre unbemerkt im Wirtsorganismus verweilen (Knobloch *et al.*, 1983). Ein solcher Lebenszyklus wird als die nicht-invasive Form der Amöbiasis bezeichnet (Blessmann *et al.*, 2003).

## 1 Einleitung



### Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *E. histolytica*.

Durch fäkal-orale Übertragung (1) gelangen die infektiösen, säureresistenten, vierkernigen Zysten über den Magen (2) in den Dünndarm, wo sie zu Trophozoiten exzystieren (3). Die Trophozoiten besiedeln den Dickdarm (4) und vermehren sich durch Zellteilung. Durch Enzystierung (5) kommt es zur Ausbildung reifer Zysten, die über den Stuhl ausgeschieden werden (6) und einen neuen Wirt infizieren können. Bei der intestinalen Verlaufsform der Amöbiasis (A) entstehen Schäden am Darmepithel und die Trophozoiten können über den Blutkreislauf weitere Organe, hauptsächlich die Leber, infizieren. Eine solche Migration in der Leber endet meist mit der Bildung von Amöbenleberabszess (B) (modifiziert nach Wuerz *et al.*, 2012).

## 1 Einleitung

### 1.1.4 Intestinale und extra-intestinale Verlaufsform und Therapie

Neben der nicht-invasiven Verlaufsform kann es in einigen Fällen auch zu einem pathologischen Verlauf kommen, wobei die Trophozoiten die Darmwand penetrieren und eine Amöbenkolitis auslösen (Burchard & Tannich, 2004). Zu dieser intestinalen Verlaufsform kommt es bei rund 10% der Infektionen mit *E. histolytica* (Lucius & Loos-Frank, 2008). Bei diesem Verlauf kommt es zu typischen Symptomen, wie Bauchschmerzen, starke, blutige Diarrhöen, Fieber, sowie Gewichtsabnahme und Anorexie (Burchard & Tannich, 2004; Mehlhorn, 2012). Durch das Lysieren der Darmwand können Trophozoiten in den Blutstrom gelangen und weitere Organe befallen, was zu einer extra-intestinalen Verlaufsform führt. In rund 95% der Fälle endet diese Verlaufsform in der Leber mit der Bildung von Amöbenleberabszessen (ALA) (Burchard & Tannich, 2004). Die Ursachen und Einflüsse dieser Gewebeinvasion sind noch nicht richtig verstanden und geklärt. Die invasiven Trophozoiten bilden keine Zysten mehr aus und bringen den Wirt, welcher für das Überleben des Erregers unerlässlich ist, durch die Bildung der ALAs in Gefahr (Lucius & Loos-Frank, 2008). Eine solche Verlaufsform kommt ca. 10-mal häufiger bei Männern vor (Djossou *et al.*, 2003).

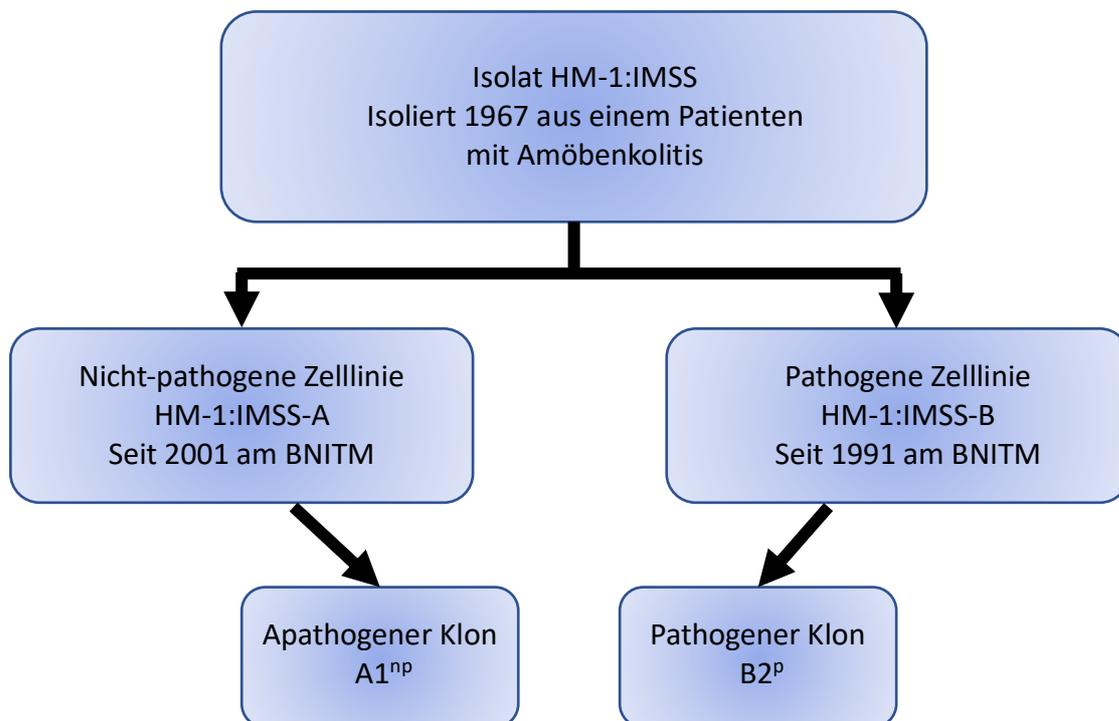
Eine Infektion mit *E. histolytica* ist grundsätzlich behandlungsbedürftig. Die nicht-invasive Verlaufsform wird mit den Aminoglykosid-Antibiotika Paromomycin (Humatin<sup>®</sup>) oder Diloxanidfuroat (Furamide<sup>®</sup>) behandelt, welche über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht werden (Blessmann *et al.*, 2002). Bei der intestinalen Verlaufsform werden zunächst die bereits ins Gewebe eingedrungen Amöben durch die Einnahme von Nitroimidazol-Derivaten, wie Metronidazol (Clont<sup>®</sup> oder Flagyl<sup>®</sup>) getötet (Powell *et al.*, 1966). Die im Darm verbleibenden Trophozoiten und Zysten werden anschließend mit Paromomycin oder Diloxanidfuroat abgetötet (Burchard *et al.*, 2004). Alternativ zeigte sich eine amöbizide Wirkung von Flavonoiden, welche ergänzend zu oder anstelle einer Behandlung mit Metronidazol eingesetzt werden können (Martinez-Castillo *et al.*, 2018). Als ein neues Ziel für eine amöbizide Chemotherapie wurde die Pantothenant-Kinase identifiziert, welche sich ausreichend von den Wirts Orthologen unterscheidet und ein Schlüsselenzym des Biosyntheseweges des Coenzym A bildet (Nurkanto *et al.*, 2018). Es steht bisher kein Impfstoff zur Verfügung. Eine medikamentöse Prophylaxe wird nicht empfohlen. Somit stellt eine ausreichende Expositionsprophylaxe, durch entsprechende Hygiene, die einzige Maßnahme zur Verhinderung einer Infektion mit *E. histolytica* dar (Burchard & Tannich, 2004). Weltweit starben im Jahre 2016 rund 26700 Menschen an den Folgen einer *E. histolytica* Infektion (Collaborators, 2018).

### 1.1.5 Kulturisolate am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM)

Zur Untersuchung neuer potentieller Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* werden zwei Zelllinien (A und B) am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) unter axenischen Bedingungen kultiviert. Beide Linien stammen von dem Isolat HM-1:IMSS ab, welches 1967 aus einer Kolon-Biopsie eines adulten, männlichen Patienten, welcher an einer Amöbenkolitis erkrankt war, isoliert wurden. Die beiden HM-1:IMSS Zelllinien wurden ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC; Katalognummer 30459) bezogen. Während die Zelllinie HM-1:IMSS-B direkt von der ATCC im Jahr 1991 bezogen wurde und seitdem am BNITM in Kultur gehalten wird, wurde die Zelllinie HM-1:IMSS-A im Jahr 2001 von Barbara Mann, Charlottesville, University of Virginia, als Charge einer Kultur, die für die Genomsequenzierung von *E. histolytica* genutzt wurde, an das BNITM gesendet (Loftus *et al.*,

## 1 Einleitung

2005). Interessanterweise unterscheiden sich beide Zelllinien bezüglich verschiedener morphologischer und biochemischer Merkmale, sowie in ihrer Pathogenität (Biller *et al.*, 2009). Pathogenität wird als die Fähigkeit der Trophozoiten definiert, nach intrahepatischer Injektion ALAs im Tiermodell (*Mus musculus*) auszulösen. Während HM-1:IMSS-A im Tiermodell keine bzw. nur kleine ALAs bilden kann und somit einen nicht-pathogenen Phänotyp aufweist, ist HM-1:IMSS-B in der Lage ALAs im Tiermodell auszubilden und besitzt somit einen pathogenen Phänotyp (Biller *et al.*, 2009). Dieselbe genetische Abstammung der Zelllinien wurde durch eine Genotypisierung unterschiedlicher hochpolymorpher tRNA-Arrays bestätigt (Ali *et al.*, 2005; Biller *et al.*, 2009). Jedoch zeigten Untersuchungen des Transkriptoms und Proteoms eine starke Heterogenie zwischen den beiden Linien (Biller *et al.*, 2010; Biller *et al.*, 2014). Zur Untersuchung der Pathogenität wurden von beiden Zelllinien jeweils 12 Klone (A1 – A12 und B1 – B12) generiert, um miteinander vergleichbare Zellpopulationen zu erhalten (Dissertation Matthiesen, 2012; Meyer *et al.*, 2016). Dabei zeigte sich, dass alle Klone der nicht-pathogenen Zelllinie A nur kleine ALAs im Tiermodell induzierten, welche schnell ausheilten und am siebten Tag der Infektion nicht mehr erkennbar waren (Meyer *et al.*, 2016). Für die Klone der pathogenen Zelllinie B konnte eine breite Streuung der Pathogenität gezeigt werden (Meyer *et al.*, 2016). Für weiteren Arbeiten wurde daher der Klon A1<sup>np</sup> als nicht-pathogener und der Klon B2<sup>p</sup> als pathogener Klon verwendet. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Klone und deren Ursprung.



**Abbildung 2: Übersicht der verwendeten *E. histolytica* Klone und deren Ursprung.**

Aus dem Isolat HM-1:IMSS entstanden die nicht-pathogene Zelllinie HM-1:IMSS-A und die pathogene Zelllinie HM-1:IMSS-B. Aus beiden Linien wurden 12 Klone generiert, wovon in dieser Arbeit der nicht-pathogene Klon A1<sup>np</sup> und der pathogene Klon B2<sup>p</sup> verwendet wurden.

## 1 Einleitung

### 1.1.6 Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica*

Bei der invasiven Verlaufsform der Amöbiasis kommt es zu einer Zerstörung des Wirtsgewebes durch die Trophozoiten von *E. histolytica*. Dabei spielen die Pathogenitätsfaktoren, sowie die eigene Immunantwort des Wirtes eine entscheidende Rolle. Der Prozess der Gewebeerstörung beginnt mit dem Anheften der Trophozoiten an Zuckern der Darmepithelzellen, gefolgt von einer Migration in tieferliegende Zellschichten, der Induktion von Apoptose und der Aufnahme der abgetöteten Zellen durch die Trophozoiten (Ralston & Petri, 2011). Bisher konnten drei Proteinfamilien ausgemacht werden, welche eine entscheidende Rolle bei diesen Prozessen spielen.

Die Gewebeinvasion der *E. histolytica* Trophozoiten beginnt zunächst mit der kontaktabhängigen Adhäsion an die Wirtszellen mittels, an der Trophozoitenoberfläche befindlichen, Galaktose/N-Acetyl-D-Galaktosamin (Gal/GalNAc)-Lektin (Tannich *et al.*, 1991; Petri & Schnaar, 1995). Das Gal/GalNAc-Lektin setzt sich aus einem 260 kDa großem Heterodimer zusammen, bestehend aus einer 170 kDa schweren und 35 kDa leichten Kette (Petri *et al.*, 2002). Durch den Einsatz von monoklonalen Anti-Lektin-Antikörpern konnte eine Adhäsion verhindert werden, was zu einem Ausbleiben der Gewebeerstörung führte (Nozaki & Bhattacharya, 2014). Weiter konnte gezeigt werden, dass das Gal/GalNAc-Lektin nicht nur die Zelladhäsion vermittelt, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Tötung der Wirtszellen spielt (Ralston, 2015). Nach Kontakt mit den Wirtszellen kommt es zu einer starken Freisetzung von Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), was zur Einleitung der Apoptose und Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ins Gewebe führt (Ravdin *et al.*, 1988; Ralston & Petri, 2011; Ralston *et al.*, 2014). Anschließend erfolgt die Aufnahme und weitere Zersetzung der Wirtszellen durch die Trophozoiten mittels Phagozytose und Trogozytose (Nakada-Tsukui *et al.*, 2017).

Einen weiteren wichtigen Pathogenitätsfaktor stellen die sogenannten *amoebapores* dar. Nachdem der Kontakt mit der Zielzelle hergestellt wurde kommt es zur Freisetzung dieser Poren-bildenden Proteine, welche sich in den Membranen der Zielzellen einlagern und so zur Lyse der Zellen führen (Leippe, 1997; Zhang *et al.*, 2004). Es sind bisher drei Isoformen der Amoebapores beschrieben, die *amoebapores* A, B und C, welche die gleiche molekulare Größe aufweisen, sich jedoch in ihrer Primärstruktur deutlich voneinander unterscheiden. Neben der Lyse der Wirtszellen helfen sie auch bei der Zersetzung von, mittels Phagozytose aufgenommen, Bakterien (Leippe *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Trophozoiten, bei denen die *amoebapores* Expression blockiert wurde, eine verringerte antimikrobielle Aktivität aufweisen und im Tiermodell nicht mehr in der Lage waren ALAs zu induzieren (Bracha *et al.*, 1999; Bracha *et al.*, 2003). Ein hoher Gehalt an Cholesterol in der Plasmamembran der Trophozoiten schützt diese vermutlich vor einer Selbstlyse durch die *amoebapores* (Andrä *et al.*, 2004).

Als dritten wichtigen Pathogenitätsfaktor werden die Cysteinproteasen von *E. histolytica* (EhCP) beschrieben. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Zersetzung der Mukusschicht, Invasion und Gewebeerstörung (Lidell *et al.*, 2006; Thibeaux *et al.*, 2013). Im Genom wurden 50 *ehcp* Gene identifiziert, von denen 35 für EhCPs aus der C1 Papain Superfamilie codieren (Tillack *et al.*, 2007). Auf Proteinebene konnten davon bisher nur vier (EhCP-A1, -A2, -A5 und -A7) nachgewiesen werden (Tillack *et al.*, 2007; Irmer *et al.*, 2009). Diese befinden sich sowohl auf der Zelloberfläche der Trophozoiten oder werden in das extrazelluläre Medium sezerniert (Jacobs *et al.*, 1998; Biller *et al.*, 2014). Die Überexpression der *ehcp-a5* in Trophozoiten führte zu einer erhöhten Pathogenität im Tiermodell (Tillack *et al.*, 2006). Die Hemmung der *ehcp* Gene dagegen, führte zu einer Reduktion der Pathogenität (Li *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 1995).

## 1 Einleitung

Weiter konnte ein Anstieg der *ehcp* Expression während der ALA Bildung gezeigt werden und nicht-pathogene Amöben in pathogene umgewandelt werden, indem spezifische *ehcp* Gene überexprimiert wurden (Matthiesen *et al.*, 2013).

### 1.1.7 Identifizierung neuer putativer Pathogenitätsfaktoren

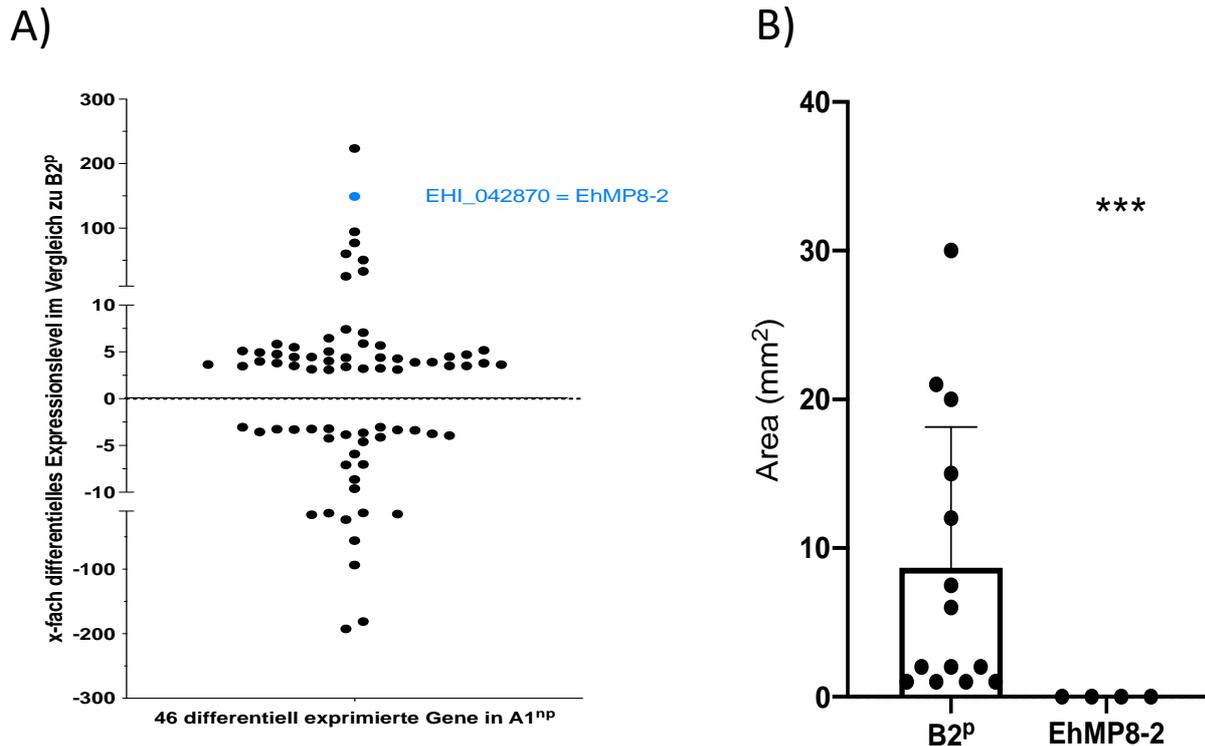
Für die Identifizierung neuer Pathogenitätsfaktoren wurde in ersten Arbeiten das pathogene Isolat HM-1:IMSS mit dem nicht-pathogenen Isolat Rahman verglichen (Davis *et al.*, 2007). Diese beiden Isolate weisen jedoch eine starke genetische Heterogenität auf, was einen sinnvollen Vergleich in Frage stellt. Weiter zeigte eine phänotypische Charakterisierung des Rahman Isolats eine Beeinträchtigung der Virulenz durch unterschiedliche genomische Defekte (Davis *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2018).

Im Jahr 2010 wurden daraufhin die beiden Zelllinien HM-1:IMSS-A und -B, in einer vergleichenden Transkriptomstudie untersucht (Biller *et al.*, 2010). Von den 6242 untersuchten Genen, wurden 87 differentiell in den beiden Linien transkribiert ( $P_{adj} > 2$ ).

In einer weiteren Arbeit wurden die Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> auf Transkriptomebene miteinander verglichen (Meyer *et al.*, 2016). Dabei konnten insgesamt 76 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden ( $P_{adj} > 3$ ). Davon sind 46 Gene stärker und 30 schwächer im Klon A1<sup>np</sup> exprimiert (siehe Abb. 3A). Die größten Unterschiede im Expressionslevel zeigten dabei Gene, welche für GTPasen der Rab-Familie, C2-Domänenproteine und der Metalloprotease gp36 (EhMP8-2; *ehi\_042870*) codieren. Die Metalloprotease EhMP8-2 ist Forschungsinhalt dieser Arbeit und wird im Weiteren genauer beschrieben (siehe 1.2)

Um den Einfluss der differentiell exprimierten Gene auf die Pathogenität zu untersuchen wurden diese in den Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> verstärkt exprimiert (Überexpression) oder die Expression gehemmt (*silencing*) und im Tiermodell die Pathogenität geprüft (Meyer *et al.*, 2016, Matthiesen *et al.*, 2018). Dabei zeigte sich, dass die Trophozoiten der pathogenen Linie B2<sup>p</sup>, welche das Gen *ehi\_042870* überexprimierten (B2<sup>p 042870 ÜE</sup>) keine ALAs mehr induzieren konnten, was zu einer signifikant geringeren Pathogenität im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>pNC</sup> führte (Meyer *et al.*, 2016) (siehe Abb. 3B). Eine gehemmte Expression in der nicht-pathogenen Linie A1<sup>np</sup> (A1<sup>np 042870 Si</sup>) führte zu einer erhöhten Pathogenität im Vergleich zur Kontrolle A1<sup>np</sup>, welche jedoch nicht signifikant war (Matthiesen *et al.*, 2018). Somit konnte für die Metalloprotease EhMP8-2 eine negativ korrelierende Pathogenität festgestellt werden.

In einem weiteren Ansatz zur Charakterisierung und Verständnis der Pathogenität von *E. histolytica* wurden unterschiedliche pathogene (*E. histolytica*, *E. nutalli*) und nicht-pathogene (*E. dispar*) Arten der Gattung *Entamoeba* auf genetischer Ebene miteinander verglichen (König *et al.*, 2021).



**Abbildung 3: Übersicht der differentiell exprimierten Gene zwischen dem Klon A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sowie Analyse der ALA-Formation des B2<sup>p</sup> EhMP8-2 Transfektanten.**

**A)** Dargestellt ist das x-fach differentielle Expressionslevel der 46 Gene von A1<sup>np</sup> im Vergleich zu B2<sup>p</sup>. Hervorgehoben ist das Gen *ehi\_042870*, welches für die in dieser Arbeit untersuchte Metalloprotease EhMP8-2 codiert. **B)** In Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> wurde das Gen *ehi\_042870* überexprimiert und diese im Tiermodell auf ihre Pathogenität untersucht. Dargestellt ist die ALA Größe (mm<sup>2</sup>) am siebten Tag nach der Infektion der Leber von *Meriones unguiculatus*. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, Mann-Whitney U-Test, \*\*\* $p < 0,001$ . Graphiken modifiziert nach Meyer *et al.*, 2016.

## 1.2 Metalloproteasen

Metalloproteasen sind Enzyme, die Peptidbindung unter Verbrauch eines Wassermoleküls, welches durch ein oder zwei Metallionen im aktiven Zentrum gebunden wird, spalten (Mansfeld, 2007). Die Mehrheit der Metalloproteasen hat dabei ein Zinkion gebunden, jedoch finden sich auch Enzyme mit Mangan, Kobalt, Nickel oder Kupfer in ihrem aktiven Zentrum (Mansfeld, 2007). Als Liganden sind bisher Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Lysin bekannt (Hooper, 1996). Aufgrund von Proteinstruktur und Homologien werden Metalloproteasen in der MEROPS Datenbank in 15 Clans, bestehend aus 54 Familien eingeteilt (Rawlings *et al.*, 2018; <https://www.ebi.ac.uk/merops>). Metalloproteasen spielen bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie der embryonalen Entwicklung, Zytokinausschüttung, Zellteilung, Zelladhäsion, Aufbau von bakteriellen Zellwänden oder Abbau von Antibiotika eine wichtige Rolle (Nagase, 2001). Im Gegensatz zu Cysteinproteasen bilden Metalloproteasen während der hydrolytischen Spaltung der Substrate keine kovalenten Zwischenstufen (Nagase, 2001).

Im Genom von *E. histolytica* finden sich neben den bereits genannten Cysteinproteasen 22 Gene, die für Metalloproteasen codieren (Tillack *et al.*, 2007). Neben dem Gen *ehi\_042870*, welches für die Metalloprotease EhMP8-2 codiert, findet sich das Gen *ehi\_200230*, welches für die Metalloprotease EhMP8-1 codiert. Die beiden Enzyme weisen eine 54%ige Ähnlichkeit

## 1 Einleitung

in ihrer Aminosäuresequenz auf und stellen Homologe zum Leishmanolysin (gp36) dar (Teixeira *et al.*, 2012). Leishmanolysin stellt das Gründungsmitglied der M8 Familie der Metalloproteasen dar und ist ein essentieller Pathogenitätsfaktor des Parasiten *Leishmania major* und ein vielversprechendes Ziel der Vakzin-Forschung (Yao *et al.*, 2003). Es befindet sich auf der Oberfläche von Promastigoten und ist mittels eines GPI-Ankers in der Zellmembran gebunden (Yao *et al.*, 2003). Proteasen dieser Familie zeichnen sich durch eine Zink-Bindungsstelle im aktiven Zentrum aus (Rawlings & Barrett, 1993). Während der Gewebeanvasion zersetzt Leishmanolysin extrazelluläre Proteine und trägt zur Immunabwehr bei (Brittingham, 1995; Mosser & Brittingham, 1997). Orthologe zum Leishmanolysin finden sich ebenfalls in weiteren parasitären Spezies wie *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi*, welche dort ebenfalls wichtige Pathogenitätsfaktoren darstellen (El-Sayed & Donelson, 1997; Grandgenett *et al.*, 2000; La Count *et al.*, 2003).

Das Gen *ehi\_200230* welches für die Metalloprotease EhMP8-1 codiert, besteht aus 1985 bp, wobei die transkribierte mRNA ohne Introns eine Länge von 1932 bp aufweist. Das Protein besteht aus 643 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 71,5 kDa und setzt sich aus einem Signalpeptid am N-Terminus, einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne am C-Terminus zusammen. (Aurrecochea *et al.*, 2011; [www.amoebadb.org](http://www.amoebadb.org)). Das Gen *ehi\_200230* ist in den beiden Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> ähnlich stark exprimiert (Meyer *et al.*, 2016). Für die EhMP8-2 konnte gezeigt werden, dass es sich um eine funktionelle Metalloprotease handelt, die an der Oberfläche der Trophozoiten lokalisiert ist (Teixeira *et al.*, 2012). Weiter konnte mittels Transfektanten, bei denen die Expression des Gens ausgeschaltet war, eine erhöhte Adhärenz an Gewebekulturflaschen, sowie an lebenden und apoptotischen Jurkat-Lymphozyten gezeigt werden (Teixeira *et al.*, 2012). Dazu wurde eine reduzierte zytopathische Aktivität und Mobilität der Transfektanten beobachtet, während die phagozytotische Aktivität, im Vergleich zum Wildtyp, erhöht war (Teixeira *et al.*, 2012). In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, dass in der Expression gehemmte Trophozoiten eine geringere hämolytische Aktivität aufweisen, jedoch eine gesteigerte Erythrophagozytoseaktivität besitzen (Dissertation Lender, 2019).

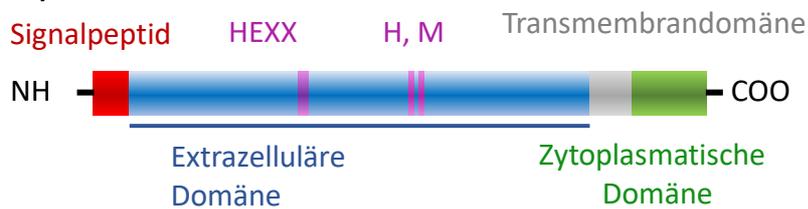
Das Gen *ehi\_042870* codiert für die putative Metalloprotease EhMP8-2 und besteht aus 2039 bp, wobei die transkribierte mRNA ohne Intron eine Länge von 1989 bp aufweist. Die Aminosäuresequenz besteht aus 662 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 75,5 kDa und beinhaltet ebenfalls vier Motive: ein Signalpeptid am N-Terminus, eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne am C-Terminus (Aurrecochea *et al.*, 2011; [www.amoebadb.org](http://www.amoebadb.org)). Das Gen *ehi\_042870* ist ca. 150-fach höher in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> im Vergleich zum pathogenen Klon B2<sup>p</sup> exprimiert (Meyer *et al.*, 2016). Mit Hilfe von Transfektanten, in denen das Gen entweder überexprimiert oder ausgeschaltet wurde, konnte ein negativer Effekt auf die Pathogenität gezeigt werden (Meyer *et al.*, 2016; Matthiesen *et al.*, 2018). Weiter konnte bei Transfektanten mit gesteigerter Expression eine signifikant erhöhte Cysteinproteaseaktivität beobachtet werden, während bei gehemmter Expression eine signifikante Reduktion auftrat (Dissertation Lender, 2019). Zudem konnte ein Einfluss auf die hämolytische Aktivität nachgewiesen werden. So zeigten Transfektanten mit gehemmter Expression eine signifikant reduzierte hämolytische Aktivität, während der Überexprimierer eine signifikant gesteigerte Aktivität zeigte (Dissertation Lender, 2019). Ein Einfluss auf Größe und Mobilität der Trophozoiten, sowie die Pathogenitätsindikatoren Erythrophagozytose, Lyse und Phagozytose von THP1-Zellen konnte nicht gezeigt werden (Dissertation Lender, 2019).

Die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem Leishmanolysin, sowie dem negativen Effekt der EhMP8-2 auf die Pathogenität der *E.*

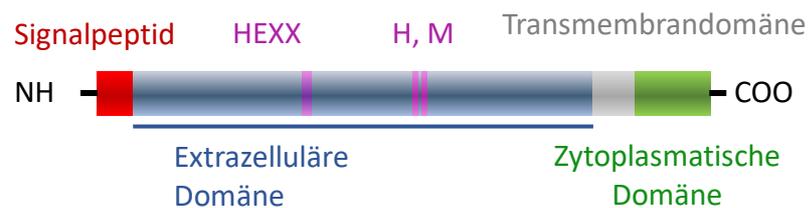
## 1 Einleitung

*histolytica* Trophozoiten, Untersuchungsinhalt dieser Arbeit. Abbildung 4 zeigt schematisch die Gene *ehi\_200230* und *ehi\_042870*.

A)



B)



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gene *ehi\_200230* und *ehi\_042870*, die jeweils für die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 codieren.**

**A)** Schematische Darstellung des Gens *ehi\_200230*, welches für die Metalloprotease EhMP8-1 codiert. Lila Bereiche zeigen die Aminosäuren des aktiven Zentrums. **B)** Schematische Darstellung des Gen *ehi\_042870*, welches für die Metalloprotease EhMP8-2 codiert. Lila Bereiche zeigen die Aminosäuren des aktiven Zentrums.

### 1.3 Untersuchung der Gewebeinvasion von *E. histolytica*

Für die Untersuchung der Gewebeinvasion der Trophozoiten von *E. histolytica* sind bisher unterschiedliche Modelle etabliert. Dabei stammen die Mehrzahl der gesammelten Daten aus Versuchen an einfachen Zellkulturen (Li *et al.*, 1994). Solche Modelle sind jedoch in ihrer Komplexität und Nähe zur *in vivo* Situation eingeschränkt, da hier meist nur mit einem Zelltyp gearbeitet wird. Weiter handelt es sich dabei um Krebszelllinien, die sich in ihrem Stoffwechsel und genetischer Regulation stark von natürlichen Zellen unterscheiden. Um diese Einschränkungen zu minimieren wurden im Laufe der Zeit komplexere Modelle entwickelt. So konnte mit Hilfe sog. Xenografts, bei denen humane Zellen in eine andere biologische Spezies transplantiert werden, oder anhand von humanen Transplantaten, die Invasion der Trophozoiten genauer untersucht werden (Seydel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003; Bansal *et al.*, 2009). Diese Modelle ähneln in ihrem Aufbau und Funktion der *in vivo* Situation, sind jedoch schwer in einem Labor zu implementieren, da die Erstellung und Unterhaltung solcher Modelle mit einem größeren Aufwand verbunden sind. Eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung von *in vitro* Modellen zur Untersuchung der Gewebeinvasion ist es, die wichtigsten Eigenschaften der *in vivo* Situation nachzustellen (Pageot *et al.*, 2000; Dutton *et al.*, 2019). So konnten in dreidimensionalen Zellmodellen die Struktur des Darmes nachgestellt werden, sowie zusätzlich Makrophagen und unterschiedliche extrazelluläre Matrix in das System implementiert werden (Huang *et al.*, 2014). Anhand des sog. „gut-on-a-chip“ Modell konnte die peristaltische Bewegung des Darmes in die Modelle mit einbezogen werden (Kim *et al.*, 2016; Shin & Kim, 2018; Jalili-Firoozinezhad *et al.*, 2019). Kürzlich wurde ein weiteres Modell für die Untersuchung der Gewebeinvasion vorgestellt, bei dem die komplexe Zusammenstellung des Darmes mit Hilfe unterschiedlicher Zelltypen, Immunzellen, extrazellulärer Matrix und Mukusschicht nachgebildet wurde (Aguilar-Rojas *et al.*, 2020). Auch wenn die Nähe zur *in vivo* Situation durch die steigende Komplexität dieser Modelle besser abgebildet wird, basieren die meisten Ansätze weiterhin auf Krebszelllinien. Ein weiteres

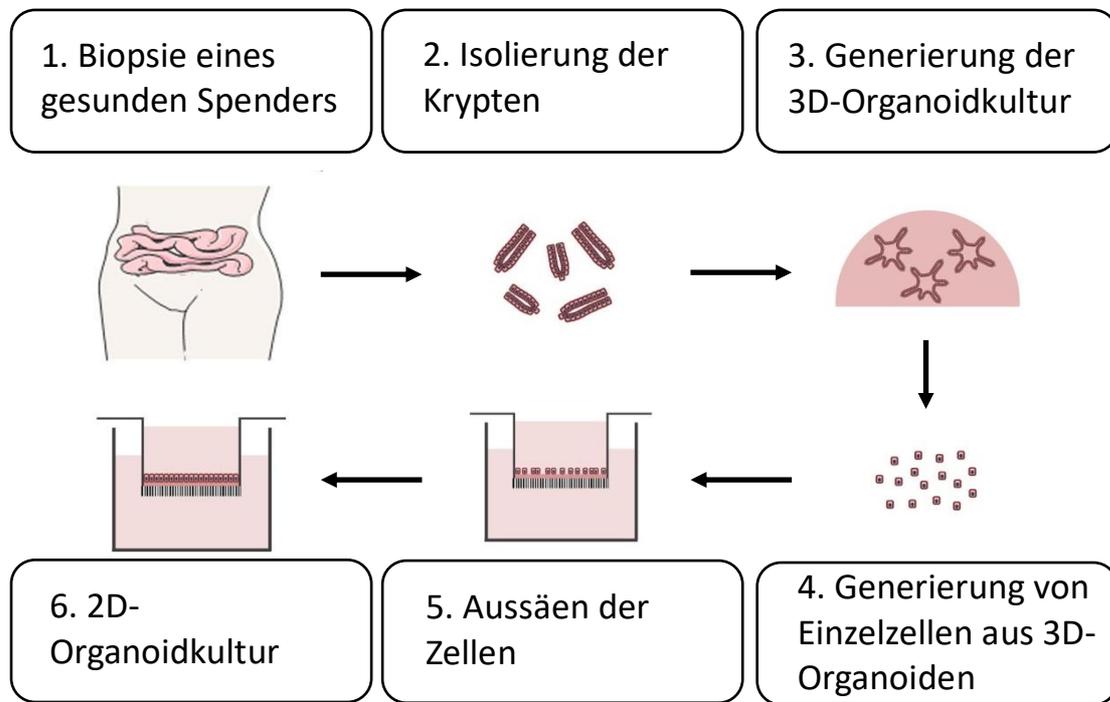
## 1 Einleitung

Problem bildet die schwere Reproduzierbarkeit der Modelle. So wurden erste Modelle mit Hilfe von humanen Darmbiopsien erstellt, aus denen die Krypten isoliert werden konnten (Wang *et al.*, 2018). Um die noch bestehenden Schwierigkeiten zu umgehen und eine engere Nähe zur Situation *in vivo* nachzustellen, könnten Organoide eine vielversprechende Möglichkeit darstellen. Sie sind von Stammzellen abgeleitet, lassen sich leicht Erstellen und sind durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung lange und einfach kultivierbar

### 1.3 Organoide

Bei Organoiden handelt es sich nach heutigem Gebrauch um dreidimensionale multizelluläre *in vitro* Modelle, die Struktur und Funktionalität der von ihnen repräsentierten *in vivo* Organe nachempfinden sollen (de Souza, 2018). Erste Arbeiten mit dreidimensionalen *in vitro* Modellen wurden bereits in den 70er Jahre des 20. Jahrhunderts durchgeführt (Simian & Bissel, 2017). Organoide werden aus pluripotenten oder adulten Stammzellen verschiedenster Organe und Gewebe, wie Gehirn, Retina, Dünn- und Dickdarm, Niere oder Leber generiert (de Souza, 2018). Aufgrund ihrer recht einfachen Handhabbarkeit und leichten genetischen Modifikationsfähigkeit stellen sie optimale Modelle für die *in vitro* Untersuchung von Organentwicklung und Pathophysiologie dar (McCauley & Wells, 2017). Weitere Anwendung finden Organoide in Untersuchungen von Geburtsdefekten und der Medikamentenforschung (Dekkers *et al.*, 2016). In den letzten Jahren zeigte sich ein vielversprechendes Potenzial von Organoiden in der Erforschung von Wirt-Pathogen Interaktionen (Dutta & Clevers, 2017; Hill & Spence, 2017; Heo *et al.*, 2018; Luu *et al.*, 2019; Martorelli Di Genova *et al.*, 2019; Wilke *et al.*, 2019; Kraft *et al.*, 2020; Holthaus *et al.*, 2021). Dabei werden die dreidimensionalen Organoide mittels unterschiedlicher Techniken direkt mit Pathogenen infiziert und im Hinblick auf verschiedene Faktoren, wie Integrität oder Genexpression untersucht (Hill *et al.*, 2017; Williamson *et al.*, 2018; Co *et al.*, 2021; Luu *et al.*, 2019). Die häufigste Art der Kultivierung von Organoiden findet dabei in einer extrazellulären Matrix unter Zugabe verschiedener Wachstums- und Proliferationsmarkern statt (Sato *et al.*, 2011; Van Dussen *et al.*, 2015; Derricott *et al.*, 2019). Jedoch zeigen sich für die Infektion mit Pathogenen dabei Schwierigkeiten, wie eine Begrenzung der Infektionsrate oder Erreichbarkeit des inneren Lumens der dreidimensionalen Strukturen. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurden Methoden entwickelt die Organoide auf zweidimensionale Strukturen zu bringen (Moon *et al.*, 2014; VanDussen *et al.*, 2015). Dabei werden Organoidfragmente oder einzelne Zellen aus den Organoiden auf Transwell-Filter gegeben und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert, bis ein Zellrasen entsteht, der die meisten Eigenschaften und Vorteile der dreidimensionalen Organoide aufweist und zudem eine einfachere Erreichbarkeit für Infektionsstudien zeigt.

In dieser Arbeit wurde mit einer 2D-Organoidkultur gearbeitet, welcher von einem intestinalen humanen Organoid abgeleitet wurde. In Abbildung 5 ist die Erstellung einer solchen 2D-Organoidkultur schematisch dargestellt.



**Abbildung 5: Generierung eines intestinalen 2D-Organoidmodells.**

Für die Erstellung einer intestinalen, humanen 2D-Organoidkultur muss zunächst Gewebe einem Spender entnommen werden (1). Danach erfolgt die Isolation der stammzellhaltigen Krypten (2). Aus den Krypten werden die Stammzellen isoliert und in einer Substanz zur Nachahmung der extrazellulären Matrix ausgesät. Die Kultivierung erfolgt unter Zugabe von Wachstums- und Differenzierungsmarkern bis sich 3D-Organoiden bilden (3). Anschließend werden die 3D-Strukturen mechanisch und chemisch verdaut, um einzelne Zellen zu erhalten (4). Diese werden dann in einem Transwellsystem ausgesät (5) und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert, bis ein intakter 2D-Zellrasen entsteht (6).

## 2 Zielsetzung

Eine Infektion mit dem humanen Parasiten *E. histolytica* verläuft in rund 90% der Fälle symptomlos. Doch bei ca. 10% der Patienten entwickelt sich eine intestinale Amöbiasis, welche in rund 1% der Fälle in einer extra-intestinalen Verlaufsform, mit der Bildung von Amöbenleberabszessen, endet. Trotz umfangreicher Forschung sind Faktoren und Umstände eines extra-intestinalen Verlaufs einer *E. histolytica* Infektion noch weitestgehend ungeklärt. Mit Hilfe verschiedener Methoden konnten einige neue potentielle Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden. Die Charakterisierung von Molekülen, die mit der Pathogenität von *E. histolytica* in Verbindung stehen, ist daher ein wichtiger Schlüssel zum Verständnis eines extra-intestinalen Verlaufs. Ein Problem bei der Erforschung der Gewebeinvasion liegt häufig in der Etablierung von geeigneten Zellmodellen. Oftmals sind diese schwer zu implementieren oder ähneln der Situation *in vivo* nur bedingt.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe eines humanen, intestinalen 2D-Organoidmodells der Prozess der Gewebeinvasion von Trophozoiten des Parasiten *E. histolytica* genauer untersucht werden. Dabei sollten die zwei Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, die beide von dem Isolat HM-1:IMSS abstammen, sich jedoch in ihrer Pathogenität voneinander unterscheiden zusammen mit den intestinalen Organoidzellen inkubiert werden. Anhand von Messungen des TEER Wertes und der Auswertung von mikroskopischer Aufnahmen nach bestimmten Zeitpunkten der Co-Inkubation sollte der Prozess der Invasion untersucht werden und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Klonen identifiziert werden. Die Analyse und Vergleiche von Transkriptomen der Trophozoiten sowie der Organoidzellen nach Co-Inkubation sollte mögliche Unterschiede in der Reaktion der pathogenen und nicht-pathogenen Klone auf die Organoidzellen, sowie Unterschiede in der Reaktion der Organoidzellen auf die zwei Klone zeigen.

Im Weiteren sollten die zwei Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 von *E. histolytica* genauer charakterisiert werden. Für die EhMP8-2 konnte bereits ein negativer Effekt auf die Pathogenität gezeigt werden (Meyer *et al.*, 2016). Beide ähneln dem Leishmanolysin, einem wichtigen Pathogenitätsfaktor von *Leishmania major*. Für die Charakterisierung sollte mit Transfektanten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gearbeitet werden, die entweder eine gesteigerte und reduzierte Expression der beide Metalloproteasengene aufwiesen. Die Transfektanten wurden auf verschiedene phänotypische Merkmale hin untersucht, die mit der Pathogenität assoziiert werden. Dazu zählen der zytopathische Effekt auf HepG2 und intestinale Organoidzellen, die Cysteinproteaseaktivität und die Lyse von HepG2 Zellen. Im Weiteren sollten die beiden Proteine mittels Myc-tag in den Trophozoiten lokalisiert werden, um so Rückschlüsse auf die Funktion schließen zu können. Mit Hilfe von Transkriptomvergleichen der Transfektanten sollte mögliche Einflüsse auf die Regulation anderer Gene gefunden werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

In nachfolgender Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit Herstellern angegeben.

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Herstellern

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Thermo Scientific
Accutase <sup>TM</sup>	STEMCELL <sup>TM</sup> Technologies
Acrylamid (30 %)	PanReac AppliChem
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Adultes Rinderserum	Capricorn Scientific
Advanced DMEM	Gibco
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	PanReac AppliChem
Ampicillin	Roth
Ampuwa (Wasser für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi
Ascorbinsäure	VWR
Bovines Serum Albumin	SERVA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Coomassie® Brilliant Blue R250	SERVA
Diamond Vitamin Tween 80 Lösung	biozol
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Roth
E64-Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromidlösung (0,025%)	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Fe-Ammoniumcitrat	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Glukose	Roth
Glutathion	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Becton und Dickinson
HEPES	biomol

### 3 Material und Methoden

Kalilauge (KOH)	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
L-Cystein	US Biological Life Sciences
Luminol	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natronlauge (NaOH)	Fluka Chemicals
Paneticin G418	PAN BIO TECH
Paraformaldehyd	Electron Microscopy Sciences
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	Capricorn Scientific
Salzsäure (HCl)	Roth
Saponin	Sigma-Aldrich
Tris-Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Roth
TRIzol <sup>®</sup>	Ambion
Trypticase	Becton und Dickinson
Tween <sup>®</sup> 20	Merck
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Z-Arg-Arg-pNA	BACHEM

#### 3.1.2 Enzyme und Reaktionspuffer

In nachfolgender Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Reaktionspuffer mit Herstellern und Verwendung angegeben.

**Tabelle 2:** Auflistung der verwendeten Enzyme und Reaktionspuffer mit Herstellern

<b>Enzyme/Puffer</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
5x Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi	PCR Reaktionspuffer	Promega
FastDigest <sup>®</sup> BamHI	Restriktionsenzym	ThermoFisher Scientific
FastDigest <sup>®</sup> KpnI	Restriktionsenzym	ThermoFisher Scientific
FD Green Buffer (10x)	Restriktionspuffer	ThermoFisher Scientific
GoTaq <sup>®</sup> G2 Flexi DNA Polymerase	Polymerase	Promega
SuperScript <sup>™</sup> III reverse Transcriptase	Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Ligase	Invitrogen
T4 Ligase Buffer (10x)	Ligationspuffer	Invitrogen

## 3 Material und Methoden

### 3.1.3 Antikörper

In nachfolgender Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit Herstellern und Verwendung angegeben.

**Tabelle 3:** Auflistung der verwendeten Antikörper mit Herstellern und Verwendung

<b>Antikörper</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Anti-mouse</i> ALEXA Fluor <sup>®</sup> 488	IFA (2. AK)	ThermoFisher Scientific
<i>Anti-mouse</i> Cy5	IFA (2. AK)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
<i>Anti-mouse</i> IgG HRP	Wb (2. AK)	Dako
<i>Anti-rabbit</i> Cy5	IFA (2. AK)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
<i>Mouse</i> anti-CLDN4	IFA (1. AK)	Invitrogen
<i>Mouse</i> anti-ZO1	IFA (1. AK)	BD Transduction Laboratories
<i>Mouse</i> Monoclonal anti-c-Myc	IFA/WB (1. AK)	Sigma
<i>Rabbit</i> anti-CLDN1	IFA (1. AK)	Invitrogen
<i>Rabbit</i> anti-CLDN2	IFA (1. AK)	Invitrogen
<i>Rabbit</i> anti-CLDN7	IFA (1. AK)	Invitrogen
<i>Rabbit</i> anti OCLN	IFA (1. AK)	Invitrogen

### 3.1.4 Reaktionskits

In nachfolgender Tabelle 4 sind alle in dieser verwendeten Reaktionskits mit Herstellern angegeben.

**Tabelle 4:** Auflistung der verwendeten Reaktionskits mit Herstellern

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies
Direct-zol <sup>™</sup> RNA MNIPrep Kit	Zymo Research
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen
FastSelect RNA Removal Kit	QIAGEN
Luna <sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix	New England BioLabs
<i>NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5</i> (150)	QIAGEN
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Medi Plus Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean UP Kit	Macherey-Nagel
Oligo(dt) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen
Pierce <sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific
Plasmid DNA purification Kit	Macherey-Nagel
Stranded mRNA Select Kit	QIAGEN
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit	ThermoFisher Scientific
T4-Ligase Kit	ThermoFisher Scientific

### 3 Material und Methoden

#### 3.1.5 Geräte und Software

In nachfolgender Tabelle 5 und Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellern, sowie die verwendeten Softwares angegeben.

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Geräte mit Herstellern

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose Gelkammer	Horizon 58	Life Technologies
Ausschwingrotor	GPKR Centrifuge	Beckmann Coulter
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Blottingkammer	PerfectBlue Web S <sup>TM</sup>	Peqlab Biotechnologie
Einkanalpipetten	Gilson <sup>TM</sup> PIPETMAN Classic <sup>TM</sup>	Gilson
Elektrode Voltohmmessgerät	MERSSTX01	Merck
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell <sup>TM</sup>	Bio-Rad
ELISA-Reader	MRX <sup>®</sup>	DYNEX Magellan
Fluoreszenz-Plattenreader	GENios <sup>TM</sup>	TECAN
GelDoc	ChemiDoc <sup>TM</sup> XRS+	Bio-Rad
Heizblock	ThermoMixer C	Eppendorf
Inkubator	B 6060	Heraeus
Inkubator	Heratherm IGS750	ThermoFisher Scientific
Konfokalmikroskop	FluoView1000	Olympus
Lichtmikroskop	Eclipse TS100	Nikon
Magnetrührer	RET-GS	IKAMAG
Nanophotometer	NanoDrop <sup>TM</sup> 2000	ThermoFisher Scientific
Pipettierhilfe	S1 Pipet Filler	ThermoFisher Scientific
pH-Meter	Lab 850	Si Analytics
Photometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf
Power Supply	EPS 301	Amersham Phamacia
qPCR-Cycler	Rotor-Gene 3000	Corbett Research
Rollinkubator	RS-TR05	Phoenix Instrument
Rotor	JA-10	Beckmann Coulter
Rotor	JA-12	Beckmann Coulter
SDS-Gelkammer	45-1010-i	Peqlab Biotechnologie
Schüttelinkubator	Certomat HK	B. Braun
Thermo Cycler	Primus	MWG Biotech
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge	5427 R	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
Voltohmmessgerät	Millicell <sup>®</sup> ERS-2	Merck
Zentrifuge	J2-21	Beckmann Coulter

### 3 Material und Methoden

**Tabelle 6:** Auflistung der verwendeten Software mit Herstellern

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent 2100 Expert Software B.02.08.SI648	Agilent Technologies
Image Lab <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Imaris	Oxford Instruments
Mac Vector <sup>®</sup> 18.2.5	International Biotechnologies
NanoDrop <sup>TM</sup> 2000 Operating Software	ThermoFisher Scientific
NEB Tm Calculator 1.13.0	New England Biolabs
Prism 9.1.0	Graphpad
Revelation <sup>TM</sup> Version G 3.2	DYNEX Magellan Biosciences
Rotor-Gene real time Analysis 6.0	Corbett Research
XFluor4 4.51	TECAN

#### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

In nachfolgender Tabelle 7 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern angegeben.

**Tabelle 7:** Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
0,2 mL Reaktionsgefäß 8er-SoftStrips	Biozym Scientific
0,5 mL Reaktionsgefäß	Sarstedt
1,5 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf
2,0 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf
15 mL Schraubröhre	Sarstedt
20 mL Einmalspritze	B. Braun
24 Well Zellkulturplatten	Sarstedt
50 mL Schraubröhre	Sarstedt
96 Well Assayplatten 340 nm lumox <sup>®</sup>	Sarstedt
Deckgläser (0,13 – 0,17 mm)	R. Langenbrinck
Filtropur Spritzenfilter (0,2 µM)	Sarstedt
Gene Pulser Küvetten (0,4 cm)	Bio-Rad
Nitrozellulosemembran (0,2 µm)	GE Healthcare Life Sciences
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Marienfeld
Novex Gelkassetten (1 mm)	ThermoFisher Scientific
Objektträger	Engelbrecht Medizin & Labortechnik
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1250 µL)	Nerbe plus
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt
Sterilfiltrationsaufsatz 0,2 µm Steritop <sup>TM</sup>	Merck
STRIP Tubes 0,1 ml	Corbett Life Science
T25 Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Falcon
T75 Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
T175 Zellkulturflaschen (175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Transwellfilter (0,4 µm PCF, 12 mm)	Merck
Whatmanpaper	GE Healthcare Life Sciences

## 3 Material und Methoden

### 3.1.7 Fluoreszenzfarbstoffe

In nachfolgender Tabelle 8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit Hersteller angegeben.

**Tabelle 8:** Auflistung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit Herstellern

<b>Farbstoff</b>	<b>Hersteller</b>
CellTracker <sup>TM</sup> Green CMFDA	Invitrogen
Hoechst-Farbstoff	ThermoFisher Scientific
Invitrogen <sup>TM</sup> BCECF, AM	Invitrogen

### 3.1.8 Marker und Ladepuffer

In nachfolgender Tabelle 9 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Marker und Ladepuffer mit Hersteller angegeben.

**Tabelle 9:** Auflistung der verwendeten Marker und Ladepuffer mit Herstellern

<b>Marker/Ladepuffer</b>	<b>Hersteller</b>
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific
PageRuler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific

### 3.1.9 Plasmide

In nachfolgender Tabelle 10 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit Referenz angegeben.

**Tabelle 10:** Auflistung der verwendeten Plasmide mit Referenzen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Größe</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Referenz</b>
pCR2.1 TOPO	3.9 kb	Klonierungsvektor	Invitrogen
pNC-Myc	6 kb	Überexpression von Myc-Fusionsprotein in <i>E. histolytica</i>	Matthiesen <i>et al.</i> , 2009

### 3 Material und Methoden

#### 3.1.10 Oligonukleotide

In nachfolgender Tabelle 11 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide angegeben.

**Tabelle 11:** Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

<b>Name</b>	<b>5' -&gt; 3' Sequenz</b>
EhMP8-1 + 500 bp F (PCR)	GAGA GGTACC CAAAACCTGTATTTATTG
EhMP8-1 + 500 bp R (PCR)	GAGA GGATCC AACAAAGATTTCTTGC
EhMP8-2 + 500 bp F (PCR)	GAGA GGTACC GAGTATTAATGCACTTT
EhMP8-2 + 500 bp R (PCR)	GAGA GGATCC AACATAACACAAAAGC
EhMP8-2 F (qPCR)	ATTGCTGTCATTCTGTGTG
EhMP8-2 R (qPCR)	TCACGAACTTCTTCTGCTTG
EhAct F (qPCR)	AAGCTGCATCAAGCAGTGAA
EhAct R (qPCR)	GGAATGATGGTTGGAAGAGG
M13 F (TOPO)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 R (TOPO)	ACACAGGAAACAGCTATGACCATG

#### 3.1.11 Puffer und Lösungen

Im nachfolgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen angegeben. Diese wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und mittels Dampfdrucksterilisation (20 min, 121°C, 1,2 bar Überdruck) sterilisiert. Puffer mit hitzeempfindlichen Substanzen wurden steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit NaOH, KOH, HCl oder Essigsäure unter Verwendung einer pH-Elektrode.

##### **NaPBS (1x):**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,3 mM
NaCl	140 mM
pH	7,2

##### **Elektrophoresepuffer SDS-Page (1x):**

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS (w/v)	0,1%
pH	8,8

##### **Sammelgelpuffer für SDS-Page:**

Tris-Base	500 mM
SDS (w/v)	0,4%
pH	6,8
steril filtrieren	

##### **Trenngelpuffer für SDS-Page:**

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

### 3 Material und Methoden

#### **TAE (Agarose-Gelelektrophorese, 50x):**

Natriumacetat	250 mM
Tris-Base	2 M
EDTA	50 mM
pH	7,9

#### **TBS (1x):**

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

#### **Coomassie®-Färbelösung:**

Methanol (v/v)	50%
Eisessig (v/v)	10%
ddH <sub>2</sub> O (v/v)	40%
Coomassie® Brilliant Blue (w/v)	0,05%

#### **ECL-Lösung A (WB):**

Tris-HCl	0,1 M
Luminol	0,025%
pH	6,8
Lagerung bei 4°C	

#### **ECL-Entwicklerlösung WB:**

ECL-Lösung A	5 mL
ECL-Lösung B	500 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,5 µL

#### **Blockpuffer IFA (Aldehydgruppen):**

NaPBS	x mL
Ammoniumchlorid	50 mM

#### **Transferpuffer für Western Blot (1x)**

Glycin	192 mM
Tris-Base	25 mM
SDS	1,3 mM
Methanol (v/v)	20%

#### **TBS-T (1x):**

TBS Puffer	x mL
Tween® 20 (v/v)	0,05%

#### **Coomassie®-Entfärbelösung**

Methanol (v/v)	45%
Eisessig (v/v)	10%
ddH <sub>2</sub> O (v/v)	45%

#### **ECL-Lösung B (WB):**

DMSO	x mL
Para- Hydroxycoumarinsäure(w/v)	0,1%
Lagerung RT, dunkel	

#### **Blockierlösung WB:**

TBS	x mL
Milchpulver (w/v)	5%

#### **Blockpuffer IFA (unspezifische Proteine):**

NaPBS	x mL
FCS	2%

### 3 Material und Methoden

#### Proteinpuffer (Laemmli *et al.*, 1970):

Tris-HCL	150 mM
Glycerin (v/v)	20%
SDS (w/v)	2%
Bromphenolblau	0,25%
DTT (vor Gebrauch)	10 mM
pH	6,8

#### CP-Assay Puffer:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
EDTA	2 mM
DTT (vor Gebrauch)	1 mM
pH	7,0

#### Cytomix (Transfektion):

KCl	120 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,15 mM
HEPES	25 mM
EGTA	2 mM
MgCl	25 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM
ATP (vor Gebrauch)	4 mM
Glutathion (vor Gebrauch)	10 mM
pH	7,6

#### Inkubationspuffer (Substratgel):

Natriumacetat	100 mM
Triton X-100	1%
DTT	20 mM

#### 3.1.12 Medien und Zusätze

Alle Kulturen von *E. coli* wurden entweder in LB-Medium oder auf LB-Agar angesetzt. Das Antibiotikum Ampicillin wurde vorab in Wasser gelöst (100 mg/mL), steril filtriert und erst nach der Dampfsterilisation des Mediums in einer Endkonzentration von 100 µg/mL dazugegeben. Gegossene Agarplatten und sterilisiertes Medium wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

#### LB-Medium:

20 g/L Lennox L Broth Base  
ad 1 L ddH<sub>2</sub>O

#### LB-Agar:

35 g/L Lennox L Broth Agar  
ad 1 L ddH<sub>2</sub>O

Alle Kulturen von *E. histolytica* wurden mit TY-I-SS Medium (Diamond *et al.*, 1978) angesetzt. Die Bestandteile des Mediums wurden zunächst in 4,350 L ddH<sub>2</sub>O gelöst. Danach wurde der pH-Wert mit Hilfe von 5 M NaOH und einer pH-Elektrode auf 6,8 eingestellt. Anschließend wurden 435 mL des Mediums in zehn 500 mL Laborglasflaschen gefüllt und diese in einem Dampfkochtopf bei 1,4 bar und 120°C für 25 Minuten sterilisiert. Für die Komplettierung des Mediums wurden nach dem Abkühlen 50 mL Adultes Rinderserum, welches vorab zweimal bei 56°C inaktiviert wurde, 15 mL Diamond Vitamin Tween 80 Lösung und 5 mL Penicillin/Streptomycin Lösung (100x) zugegeben. Das komplettierte Medium wurde bei 4°C gelagert und nicht länger als 14 Tage verwendet.

### 3 Material und Methoden

#### **TY-I-SS Medium:**

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

Die HepG2 Zellen wurden in DMEM+ Medium kultiviert.

#### **DMEM+:**

Advanced DMEM (Gibco)	500 mL
FCS	50 mL
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	5 mL

### 3.1.13 Verwendete Organismen

#### 3.1.13.1 *Entamoeba histolytica*

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. histolytica* Zelllinien entstammen dem Isolat HM-1:IMSS (ATCC Katalognummer 30459). Dieser wurde 1964 aus einem männlichen Patienten mit Amöbenkolitis isoliert.

HM-1:IMSS Zelllinie A:

Die Zelllinie A des Kulturisolates HM-1-IMSS ist nicht in der Lage im Tiermodell Leberabszesse auszulösen und wird daher als nicht-pathogen bezeichnet (Biller *et al.*, 2009). Diese befindet sich seit 2001 am BNITM in Kultur. In dieser Arbeit wurde mit dem Klon A1<sup>np</sup> gearbeitet welcher von der Zelllinie HM-1:IMSS-A abstammt (Meyer *et al.*, 2016).

HM-1-IMSS Zelllinie B:

Die Zelllinie B des Kulturisolates HM-1:IMSS ist in der Lage im Tiermodell Leberabszesse auszulösen und wird daher als pathogen bezeichnet (Biller *et al.*, 2009). Diese befindet sich seit 1991 am BNITM in Kultur. In dieser Arbeit wurde mit dem Klon B2<sup>p</sup> gearbeitet, welcher von der Zelllinie HM-1:IMSS-B abstammt (Meyer *et al.*, 2016).

### 3 Material und Methoden

Transfektanten:

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Transfektanten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gearbeitet, in denen die Expression der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 entweder gesteigert oder gehemmt war (Dissertation Lender, 2019). Diese werden im Folgenden als Überexprimierer oder *silencer* bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zwei Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> generiert in denen die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 als Fusionsprotein mit einem *Myc-tag* überexprimiert wurden. In nachfolgender Tabelle 12 sind die Transfektanten angegeben.

**Tabelle 12:** Auflistung der verwendeten Transfektanten

<b>Transfektant</b>	<b>Art</b>	<b>Zelllinie</b>
A1 <sup>EhMP8-1 Si</sup>	<i>silencer</i> der EhMP8-1	HM-1:IMSS-A
A1 <sup>EhMP8-2 Si</sup>	<i>silencer</i> der EhMP8-2	HM-1:IMSS-A
A1 <sup>Doppel Si</sup>	<i>silencer</i> der EhMP8-1 und EhMP8-2	HM-1:IMSS-A
B2 <sup>EhMP8-1 Si</sup>	<i>silencer</i> der EhMP8-1	HM-1:IMSS-B
B2 <sup>EhMP8-2 ÜE</sup>	Überexprimierer der EhMP8-2	HM-1:IMSS-B
A1 <sup>EhMP8-1 Myc ÜE</sup>	Überexprimierer der EhMP8-1 + <i>Myc-tag</i>	HM-1:IMSS-A
A1 <sup>EhMP8-2 Myc ÜE</sup>	Überexprimierer der EhMP8-2 + <i>Myc-tag</i>	HM-1:IMSS-A

#### 3.1.13.2 *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurde mit One Shot™ TOP10 *Chemically Competent E. coli* Zellen von Invitrogen gearbeitet.

#### 3.1.13.3 HepG2 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten HepG2 Zellen (ATCC Katalognummer HB-8065) stammen aus einem hepatozellulärem Karzinom eines männlichen Patienten mit Leberkrebs. Diese wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Jacobs vom BNITM bereitgestellt.

#### 3.1.13.4 Organoidzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen, intestinalen Organoidzellen stammen von dem Isolat CBF1 ab, welches am Robert Koch Institut in Berlin von der Arbeitsgruppe Anton Aebischer generiert wurde. Das Isolat stammt von einer Biopsie eines gesunden männlichen Spenders, welche am Benjamin Franklin Campus der Charité in Berlin entnommen und durch das ethische Komitee des Universität Klinikums Charité geprüft wurde (#EA4-015-13).

### 3.2 Zellbiologische Methoden

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

Die für diese Arbeit benötigten *E. histolytica* Trophozoiten der unterschiedlichen Klone und Transfektanten wurden in komplettiertem TY-I-SS Medium (Diamond et al, 1978) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte dabei unter mikroaerophilen und axenischen Bedingungen in 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37 °C. Die transgenen Klone wurden zusätzlich mit dem Selektionsmarker *Genetecin*<sup>®</sup> (G418) in einer Konzentration von 20 µg/mL kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte alle zwei, spätestens drei, Tage. Dafür wurde zunächst die Konfluenz des adhären wachsenden Zellrasens lichtmikroskopisch beurteilt und so die Teilungsrate abgeschätzt. Anschließend wurde das Medium verworfen und die Trophozoiten, durch Schütteln der Kulturflasche, in einer definierten Menge frischem TY-I-SS Medium aufgenommen. Entsprechend der abgeschätzten Teilungsrate wurde dann ein definiertes Volumen in eine neue Kulturflasche überführt und diese mit frischem komplettiertem Medium aufgefüllt. Um die mikroaerophilen Bedingungen zu schaffen, wurden die Kulturflaschen möglichst komplett mit Medium gefüllt.

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

Für die Nutzung der Trophozoiten in weiteren Experimenten dieser Arbeit mussten diese zunächst geerntet werden. Dafür wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn die jeweiligen benötigten Trophozoiten in 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen so eingesät, dass sich am folgenden Tag ein konfluenter Zellrasen gebildet hat. Das Medium wurde verworfen und der Zellrasen durch Schütteln der Kulturflasche in 10 mL kaltem NaPBS gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 50 mL Schraubröhre überführt und bei 400 x g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10 mL kaltem NaPBS resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 400 x g, 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Trophozoiten konnten in den weiteren Versuchen eingesetzt werden.

#### 3.2.3 Lyse der *E. histolytica* Trophozoiten

In einigen Versuchsansätzen mussten die jeweiligen Trophozoiten zunächst lysiert werden. Dafür wurden die Zellsedimente nach der Ernte (siehe 3.2.2) in 1 mL NaPBS resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 400 x g, 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment durch kräftiges Vortexen im Rückfluss resuspendiert. Abhängig von der Fragestellung der Versuche wurde der Proteaseinhibitor E64 in einer Konzentration von 30 µM zugegeben, oder ohne diesen gearbeitet. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels der *freeze and thaw* Methode. Dafür wurden die Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff überführt und die Zellsedimente so schockgefroren. Danach erfolgte ein Auftauen der Zellsedimente durch eine kurze Inkubation bei 37°C im Heizblock mit anschließendem kräftigem Vortexen. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Nach dem letzten Auftauen wurde, wenn benötigt, erneut E64 in einer Konzentration von 30 µM zugegeben. Für eine anschließende Trennung von löslicher und

### 3 Material und Methoden

unlöslicher Fraktion wurde das Lysat bei  $15000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die beiden Fraktionen konnten bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### 3.2.4 Transfektion von *E. histolytica* Trophozoiten

Mit Hilfe der Transfektion kann Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht werden, welche danach als Transfektanten bezeichnet werden. Die Transfektion wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Dafür wurde am Vortag eine  $75 \text{ cm}^2$  Gewebekulturflasche mit den zu transfizierenden Trophozoiten so angesetzt, dass am Folgetag ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Für die Transfektion wurden zunächst  $100 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA in  $100 \mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O in eine Elektroporationsküvette, mit einer Spaltbreite von  $0,4 \text{ cm}$ , vorgelegt und auf Eis inkubiert. Die Trophozoiten wurden geerntet (siehe 3.2.2) und das Amöbensediment in  $10 \text{ mL}$  kaltem, inkompletten Cytomix gewaschen. Danach wurde der Überstand verworfen und die Trophozoiten in  $2 \text{ mL}$  kompletten Cytomix resuspendiert. Davon wurden nun  $800 \mu\text{L}$  zu der vorgelegten Plasmid-DNA in die Küvette pipettiert und gut durchmischt. Die Elektroporation erfolgte am Gene-Pulser XCell bei einer Spannung von  $1200 \text{ Volt}$ , einer elektrischen Kapazität von  $25 \mu\text{F}$  und einem unendlichen Widerstand durch zwei aufeinanderfolgende Impulse von  $0,3$  bis  $0,6$  Sekunden. Der Ansatz wurde in eine  $12,5 \text{ cm}^2$  Kulturflasche mit vorgewärmten TY-Medium überführt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und nach zwei Tagen erfolgte die Zugabe des Selektionsmarkers G418 (Neomycin) in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Dieser erzwingt das Ablesen des transfizierten Plasmides, da dieses ebenfalls ein Resistenzgen gegen Neomycin enthält. Außerdem sorgt es für eine Ausselektion der nicht-transfizierten Trophozoiten. Nachdem die Trophozoiten unter Kultivierung mit  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  G418 einen Monolayer erreicht haben, wurde die Konzentration auf  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  erhöht.

#### 3.2.5 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Der Prozess der Transformation beschreibt die Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen. Für einige Untersuchungen musste zunächst Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht werden. Dies wurde mittels der Hitzeschock-Methode erreicht (Cohen et al., 1967). Dafür wurden die zu transformierenden Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und  $100 \text{ ng}$  DNA zu den Zellen in einem  $1,5 \text{ mL}$  Reaktionsgefäß pipettiert. Bei einer Transformation einer TOPO Klonierung wurden  $2 \mu\text{L}$  und bei Transformation eines Ligationsansatzes  $10 \mu\text{L}$  zu den Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Heizblock behandelt. Danach erfolgte eine kurze Inkubation auf Eis von 5 Minuten. Nach Zugabe von  $500 \mu\text{L}$  SOC-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei  $800 \text{ rpm}$  und  $37^{\circ}\text{C}$  im Heizblock inkubiert. Nach Inkubation wurden  $300 \mu\text{L}$  der Zellsuspension auf LB-Platten mit  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert und diese bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert.

## 3 Material und Methoden

### 3.2.6 Kultivierung von HepG2 Zellen

Die für die verschiedenen Versuche benötigten HepG2 Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen in kompletten DMEM+ Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle zwei, spätestens drei Tage, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen vorsichtig mit 5 mL warmen NaPBS gewaschen. Anschließend wurde 500 µL Accutase<sup>TM</sup> auf den Zellrasen gegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch kräftiges Klopfen auf den Rand der Gewebekulturflaschen wurden die Zellen gelöst und dann in 3 mL DMEM+ Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurde 1 mL in eine neue Kulturflasche überführt und diese mit 5 mL frischem DMEM+ Medium aufgefüllt.

### 3.2.7 Ernten der HepG2 Zellen

Für die Ernte der HepG2 Zellen wurden zunächst das Medium einer konfluent bewachsenen Gewebekulturflasche verworfen und der Zellrasen vorsichtig mit 5 mL warmen NaPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µL Accutase<sup>TM</sup> und eine Inkubation bei 37°C für 5 Minuten. Durch kräftiges Klopfen am Rand der Gewebekulturflasche wurden die Zellen gelöst und in 5 mL warmen NaPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 15 mL Schraubröhre überführt und bei 400 x g, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment je nach Fragestellung in NaPBS oder DMEM Medium resuspendiert.

### 3.2.8 Zellzahlbestimmung

Um die richtigen Zellzahlen von Trophozoiten und HepG2 Zellen in den jeweiligen Versuchen einzusetzen wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Für die Zellzahlbestimmung wurden dafür 10 µL der zu ermittelnden Zellsuspension in Zählkammer pipettiert und anschließend vier Großquadrate unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Mit Hilfe der folgenden Formel konnte dann die Zellzahl pro mL ermittelt werden:

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

### 3.2.9 Kultivierung von 3D- und 2D-Organoiden

Die Kultivierung der humanen intestinalen 3D-Organoiden sowie die Erstellung und Kultivierung der davon abgeleiteten 2D-Zellmodelle wurde von der Arbeitsgruppe von Anton Aebischer am Robert Koch-Institut (RKI, Berlin) durchgeführt und für die Untersuchungen dieser Arbeit bereitgestellt (Sato *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2011; Mahe *et al.*, 2015; Warschkau *et al.*, 2020).

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Protein Konzentrationsbestimmung

Für einige Versuche war es notwendig den Proteingehalt von Lysaten der *E. histolytica* Trophozoiten oder von Proteinlösungen zu bestimmen. Dabei wurden mit E64 behandelte Lysate von *E. histolytica* verwendet, damit die zelleigenen Proteine nicht durch die Cysteinproteasen der Amöben verdaut wurden (siehe 3.2.3). Die Proteinbestimmung erfolgte mittels dem BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce nach Herstellerangaben. Die Messung erfolgte dabei in 96-Well\_platten am ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm. Mit Hilfe einer vorher angelegten Standardreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) konnten die Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

#### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für den Nachweis bestimmter Proteine wurde eine SDS Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt (Laemmli, 1970). Dabei werden Proteine nach ihren molekularen Massen aufgetrennt indem sie mit Hilfe eines elektrischen Flusses durch ein Gel mit unterschiedlicher Porengröße wandern. Je nach Größe der Proteine wandern diese weiter oder kürzer in das Gel ein. Anhand eines Standardmarkers kann dann die Größe der Proteine bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde mit 10%igen Polyacrylamidgelen gearbeitet. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden auf die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt und mit zweifach Proteinpuffer im Verhältnis 1:2 verdünnt, sowie mit 1 mM DTT versetzt. Durch ein Aufkochen der Proben bei 95°C für 10 Minuten im Heizblock wurden die Proteine denaturiert und linearisiert. Anschließend wurden 25 µL der Proben und 10µL des Standardmarkers in die Taschen der Polyacrylamidgele pipettiert. Für die Auftrennung der Proteine wurde zunächst eine Stromstärke von 20 mA pro Gel angelegt. Nach Passieren des Sammelgels wurde dann auf eine Stärke von 40 mA pro Gel erhöht. Das Gel wurde je nach Fragestellung zu einem bestimmten Zeitpunkt gestoppt und anschließend entweder für die Analyse aller Proteine in Coomassie-Blau gefärbt oder im Westernblot eingesetzt, um bestimmte Proteine mittels Immunonachweis zu detektieren. In nachfolgender Tabelle 13 ist die Zusammensetzung der verwendeten 10 % igen Polyacrylamidgele gezeigt.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ein 10%iges Polyacrylamidgel

<b>Chemikalie</b>	<b>Trenngel (10%)</b>	<b>Sammelgel (4%)</b>
Acrylamid (30%)	2,5 mL	0,65 mL
Trenn/Sammelgelpuffer	1,9 mL	1,25 mL
ddH <sub>2</sub> O	3.1 mL	3,05 mL
APS	25 µL	25 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Für die Herstellung eines Gels wurde eine Gelkassette zu dreiviertel mit der 10%igen Trenngellösung gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem auspolymerisieren wurde das Isopropanol abgenommen und das 4%ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm gesteckt, um Taschen für die Proben auszusparen.

## 3 Material und Methoden

### 3.3.3 Coomassie-Blau Färbung

Um die in der SDS Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (siehe 3.3.2) im Gel sichtbar zu machen wurden die Gele in einer frischen Coomassie-Blau Färbelösung eingelegt und für 1 Stunde schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgekippt und das Gel über Nacht in Entfärberlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Entfärberlösung verworfen und die Gele zweimal für 20 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Die Gele wurden für die weitere Auswertung und Dokumentation fotografiert.

### 3.3.4 Westernblot

Für die Identifizierung von Proteinen wurde Westernblot Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Proteine zunächst mit Hilfe eines Polyacrylamidgels (siehe 3.3.2) entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt und im Anschluss durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mittels spezifischer Antikörper detektiert. In dieser Arbeit wurde dabei das Tank-Blot-Verfahren angewandt. Die Nitrozellulosemembran wird dabei anodenseitig auf das Gel gelegt und diese beidseitig mit Filterpapieren und Schwämmen in einer Blotkassette eingespannt. Anschließend wird die Kassette in eine mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer überführt. Der Elektrotransfer fand unter leichtem Rühren bei einer Stromstärke von 400 mA für 1 Stunde statt. Die Membran wurde nach dem Transfer in eine 50 mL Schraubröhre überführt und für 30 Minuten rollend in 50 mL Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem proteinspezifischen Primäantikörper verdünnt nach Herstellerangaben in 5 mL Blockierlösung rollend bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Lösung verworfen und die Membran 10 Minuten in TBS-T gewaschen, gefolgt von zweimaligen 10-minütigen Waschen in TBS. Anschließend wurde der mit Merrettichperoxidase (HRP, *horseredish peroxidase*) gekoppelte Sekundäantikörper in 5 mL Blockierlösung verdünnt nach Herstellerangaben auf die Membran gegeben und diese für 2 Stunden rollend bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser bindet spezifisch an den Primäantikörper und ermöglicht durch einen Substratumsatz durch die HRP eine spätere Detektion. Nach der Inkubation folgten drei Waschschrte wie oben beschrieben. Für die Detektion wurde die Membran 3 Minuten in eine ECL-Entwicklerlösung gelegt, die eine Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert. Durch den chemischen Umsatz kommt es zu einer Emission von Licht an den Stellen, an denen der Sekundäantikörper gebunden hat, welche mittels der ChemiDoc detektiert wurde.

### 3.3.5 Immunfluoreszenzanalyse der *E. histolytica* Trophozoiten

Mit Hilfe eines IFA können Proteine mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und so nachgewiesen werden. Dafür wurden die geernteten Trophozoiten (siehe 3.2.2) in 1 mL NaPBS resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 400 x g, 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 1 mL 4 % Paraformaldehyd (PFA) in NaPBS resuspendiert. Durch das PFA werden die Zellen fixiert, da es eine reversible Vernetzung von Proteinen bewirkt. Die Trophozoiten wurden dann 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rollinkubator in der NaPBS/4% PFA Lösung inkubiert. Danach erfolgte eine Aufteilung des Gemisches auf zwei

### 3 Material und Methoden

neue 1,5 mL Reaktionsgefäße. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400 x *g* für 3 Minuten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde eine Fraktion in 500 µL NaPBS/0,05 % Saponin, die andere in 500 µL NaPBS vorsichtig resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert. Das Saponin sorgt für eine Permeabilisierung der Zellmembran, was die Färbung von zytosolischen Proteinen ermöglicht, während die Fraktion ohne Saponin eine Färbung der Oberflächenproteine ermöglicht. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 x *g* für 3 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellsedimente vorsichtig in 500 µL Blockierungspuffer resuspendiert und für 15 Minuten rollend bei Raumtemperatur inkubiert. So wurden freie Aldehydgruppen blockiert. Anschließend wurden die Trophozoiten bei 400 x *g* für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschrift in 500 µL NaPBS/0,05 % Saponin bzw. 500 µL NaPBS, bei dem das Sediment vorsichtig darin resuspendiert und anschließend bei 400 x *g* für 3 Minuten zentrifugiert wurde. Um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren, wurde der Überstand verworfen und die Zellen vorsichtig in 500 µL NaPBS/2 % FCS resuspendiert und für 10 Minuten rollend bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Trophozoiten für 1 Stunde in 500 µL NaPBS in dem der Primärantikörper verdünnt wurde (1:100 – 1:200) rollend bei Raumtemperatur inkubiert. Weiter folgten drei Waschschriffe wie oben beschrieben. Dann wurden die Zellsedimente in 500 µL NaPBS in dem der sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper verdünnt war (1:400) für eine weitere Stunde rollend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Zellen wie bereits beschrieben erfolgte die Färbung der Zellkerne durch eine Inkubation in 500 µL NaPBS verdünntem Hoechst Farbstoff (1:400) für 10 Minuten rollend bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschen der Zellen wurden die Sedimente in 50 µL NaPBS gelöst und konnten bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

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

### 3.4.1 Cysteinproteaseaktivität

Für die Bestimmung der Cysteinproteaseaktivität der *E. histolytica* Lysate wurde der Umsatz des Substrates Z-Arg-Arg-pNA (Benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginin-p-nitroanilid) durch die in dem Lysat enthaltenen Cysteinproteasen photometrisch gemessen. Durch die Abspaltung des p-Nitroanilid entsteht eine gelbliche Färbung des Ansatzes, welche bei 405 nm am ELISA-Reader gemessen werden konnte. Für einen Ansatz wurde zunächst 148 µL Cysteinproteasepuffer mit 1 mM DTT versetzt in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µL Amöbenlysat (unverdünnt und 1:10 verdünnt), sowie 50 µL Z-Arg-Arg-pNA (100 µM Endkonzentration). Nun folgte die Messung der Änderung der Extinktion in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 20 Minuten. Anhand folgender Formel wurde dann die Volumenaktivität bestimmt:

### 3 Material und Methoden

$\Delta E$  = Änderung der Extinktion

$d$  = Schichtdicke der Messlösung (1 cm)

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

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

$t$  = Zeit (min)

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

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

Mit Hilfe des vorher bestimmten Proteingehaltes der Lysate (siehe 3.3.1) konnte dann die spezifische Cysteinproteaseaktivität mittels folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Volumenaktivität}}{\text{Proteingehalt}}$$

#### 3.4.2 Substratgelelektrophorese zum Nachweis von Cysteinproteasen

Für den Nachweis der Aktivität von bestimmten Cysteinproteasen der *E. histolytica* Lysate wurde eine Substratgelelektrophorese durchgeführt. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten die Ergebnisse der Messung der Cysteinproteaseaktivität (siehe 3.4.1) genauer charakterisiert werden. Für die Untersuchung wurden zunächst 12%ige SDS-Polyacrylamidgele mit 0,1 % Gelatine kopolymerisiert. Anschließend wurden je zwei Ansätze von 10  $\mu\text{L}$  des zu untersuchenden Lysates, welche einmal 4  $\mu\text{g}$  und einmal 8  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein enthielten, mit 10  $\mu\text{L}$  zweifach Probenpuffer gemischt, mit 10 mM DTT versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Gele wurden bei 25 mA in vorgekühlten Elektrophoresepuffer bei 4°C laufen gelassen, um eine mögliche Aktivität der Cysteinproteasen zu hemmen. Anschließend wurden die Gele eine Stunde bei Raumtemperatur in 2% Triton X-100 gewaschen. Die Entwicklung erfolgte über zwei Stunden bei 37°C in dem Inkubationspuffer, gefolgt von einer über Nacht Färbung mit Coomassie bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Gele solange bei Raumtemperatur in Entfärberlösung inkubiert, bis die hellen ungefärbten Aktivitätsbanden der Cysteinproteasen sichtbar wurden. Die Cysteinproteasen der Lysate sind in diesen Bereichen stagniert und haben, durch die Entwicklung, die Gelatine in den Gelen verdaut, wodurch an diesen Stellen keine Färbung mit Coomassie erfolgen konnte.

#### 3.4.3 Bestimmung der Lyse von HepG2 Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten

Für die Bestimmung der Fähigkeit der *E. histolytica* Trophozoiten Zellen zu lysieren wurden diese mit fluoreszenzmarkierten HepG2 Zellen zusammen inkubiert und anschließend eine Freisetzung des Farbstoffes in den Überstand photometrisch gemessen. Am Vortag wurden zwei 25  $\text{cm}^2$  Kulturschalen mit einmal HepG2 Zellen und einmal den zu untersuchenden Trophozoiten, so angesetzt, dass am nächsten Tag ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Das Medium wurde verworfen und die Zellen einmal mit 5 mL warmen PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte in 1 mL inkompletten DMEM Medium in dem 10  $\mu\text{M}$  des Fluoreszenzfarbstoffes CMFDA (5-Chlormethylfluoresceindiacetat) enthalten war über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C. Der Farbstoff CMFDA diffundiert in die Zellen und wird dann durch zelleigene Caspasen in ein nicht-membrangängiges Fluoreszenzprodukt

### 3 Material und Methoden

umgewandelt. Nach der Inkubation wurde das Medium verworfen und die Zellen einmal mit warmen PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurde 300  $\mu\text{L}$  Accutase<sup>TM</sup> auf den bewachsenen Boden der Kulturflasche gegeben und diese für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in 5 mL NaPBS aufgenommen, in eine 15 mL Schraubröhre überführt und bei 400 x *g*, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgten zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 5 mL NaPBS. Danach wurde das Zellsediment in 3 mL NaPBS gelöst und die Zellzahl der Lösung bestimmt (siehe 3.2.8). Nach der Ernte der Trophozoiten der jeweiligen *E. histolytica* Zelllinie (siehe 3.2.2) wurden diese in 2 mL NaPBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.8). Für den Ansatz wurden dann  $1 \times 10^6$  HepG2 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte eingesät und  $1 \times 10^5$  Trophozoiten in einem Gesamtvolumen von 1 mL dazu gegeben. Dabei wurden pro zu untersuchender Zelllinie jeweils 3 fach Ansätze durchgeführt. Die Negativkontrolle wurde nur mit NaPBS versetzt. Für die Positivkontrolle wurden die gefärbten HepG2 Zellen mit 1% Triton X-100 NaPBS inkubiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte über eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die Positivkontrolle 30 Sekunden am Sonifizierer mit Flachkopfspitze (konstanter Tastgrad) behandelt, um eine komplette Lyse der HepG2 zu erhalten. Die 24-Well-Platte wurde dann bei 1400 x *g* für 4 min zentrifugiert und 150  $\mu\text{L}$  der Überstände in eine spezielle 96-Well-Platte überführt, welche nochmals für 30 Sekunden bei 1400 x *g* zentrifugiert wurde. Die Messung erfolgte am Fluoreszenz-Platten-Reader bei 485 nm Extinktion und 535 nm Emission. Die Werte der Positivkontrolle wurden dann als 100% bewertet und die prozentuale lytische Aktivität der Proben in Bezug dazu berechnet.

#### 3.4.4 Bestimmung des zytopathischen Effektes der *E. histolytica* Trophozoiten auf HepG2 Zellen

Der zytopathische Effekt beschreibt die degenerative Veränderung eines Zellrasen durch pathogene Erreger. Zur Bestimmung des zytopathischen Effektes von *E. histolytica* Trophozoiten wurden 48 Stunden vor dem Versuch  $1 \times 10^5$  HepG2 Zellen in die Wells einer 24-Well-Platte ausgesät und diese bei 37°C in 2 mL DMEM+ Medium inkubiert, wobei das Medium nach 24 Stunden einmal gewechselt wurde. Nach den 48 Stunden war ein konfluenter Zellrasen in den Wells gewachsen. Die zu untersuchenden *E. histolytica* Zelllinien wurden 24 Stunden vor dem Versuch in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche so eingesät, dass ebenfalls ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Zum Beginn des Versuches wurde das DMEM+ Medium vorsichtig abgezogen und die Wells vorsichtig mit warmen NaPBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  NaPBS in dem der Fluoreszenzfarbstoff BCECF, AM (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester) in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gelöst war. Das BCECF ist dabei membrangängig und wird im Zellinneren durch Caspasen zu einem nicht-membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff umgewandelt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das NaPBS vorsichtig abgenommen und die Zellen zweimal mit warmen NaPBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurden die Trophozoiten der zu untersuchenden Zelllinien geerntet (siehe 3.2.2) und in 2 mL DMEM Medium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl der Suspension bestimmt wurde (siehe 3.2.8), wurden 500  $\mu\text{L}$  mit  $1 \times 10^5$  Trophozoiten auf die gefärbten HepG2 Zellen im dreifachen Ansatz gegeben. Die Negativkontrollen wurden nur mit 500  $\mu\text{L}$  DMEM Medium aufgefüllt, während die Positivkontrollen mit 500  $\mu\text{L}$  DMEM mit 1% Triton X-100 behandelt wurden. Die 24-Well-Platte wurde dann bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte für 20 Minuten auf Eis gestellt, um die

### 3 Material und Methoden

Trophozoiten zu lösen. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem NaPBS wurde in jedes Well 1 mL 1% Triton X-100 PBS pipettiert und die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies diente zur Lyse aller verbleibenden Zellen. Die Messung erfolgte indem 150 µL der Überstände in eine spezielle 96-Well-Platte pipettiert wurde, diese bei 1400 x g für 30 Sekunden zentrifugiert wurde und mit Hilfe des Fluoreszenz-Platten-Reader bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen wurde. Die Werte der Negativkontrolle wurden dann gleich 100% gesetzt, da hier vor der Lyse durch das Triton X-100 der Zellrasen fast komplett erhalten war und somit der größte Anteil an Farbstoff im Überstand gemessen wurde. Die Werte der Proben wurden dann in Bezug zur Negativkontrolle gesetzt. Zum Schluss wurde das Ergebnis von 100% abgezogen, um den prozentualen Teil der von den Trophozoiten aus dem Zellrasen gelösten Zellen zu erhalten.

#### 3.4.5 Infektion der 2D-Organoid-Monolayer mit *E. histolytica* Trophozoiten

Um den Invasionsprozess der *E. histolytica* Trophozoiten nachzuvollziehen, sowie den Einfluss der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf diesen zu untersuchen, wurden Zellmonolayer, welche aus humanen intestinalen Organoiden generiert wurden, mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>P</sup> und des nicht-pathogenen Klons A1<sup>NP</sup>, sowie der unterschiedlichen Metalloproteasen Transfektanten, infiziert. Dieses Modell stellt dabei eine gute Näherung an die *in vivo* Situation dar, da die Organoidzellen direkt von humanen Stammzellen abstammen und den menschlichen Darm durch eine Ausdifferenzierung in die verschiedenen Zelltypen gut nachbilden. Die Organoidzellen wurden ca. zwei Wochen vor Versuchsbeginn auf 0,6 cm<sup>2</sup> Filtereinsätze in einer 24-Well-Platte eingesät und so kultiviert, dass ein Monolayer von ausdifferenzierten humanen Dünndarmzellen am Versuchstag gewachsen war. Die Filtereinsätze ermöglichten eine Infektion mit Trophozoiten in TY-Medium im apikalen Kompartiment, während die Organoidzellen weiterhin mit eigenem Medium von basaler Seite aus versorgt werden konnten. Die Herstellung der Monolayer, sowie die Kultivierung wurde dabei von der Arbeitsgruppe von Anton Aebischer am Robert Koch Institut in Berlin durchgeführt (siehe 3.2.9). Die durchschnittliche Zellzahl auf einem Filter betrug 2 x 10<sup>5</sup> Dünndarmzellen. Die eingesetzten Trophozoiten wurden am Vortag so in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche eingesät, dass nach 24 Stunden ein konfluenter Zellrasen gewachsen war. Nach der Ernte der Trophozoiten (siehe 3.2.2) wurden diese in 2 mL TY-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.8). Anschließend wurden die Trophozoiten der zu untersuchenden Zelllinien, je nach Fragestellung, in unterschiedlicher Zellzahl in insgesamt 400 µL TY-Medium apikal auf die bewachsenen Filter gegeben. Für eine Probe wurde dabei ein dreifacher Ansatz angesetzt. Danach wurden die Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und nach bestimmten Zeitpunkten eine TEER-Messung (siehe 3.4.6) durchgeführt oder die Zellen für nachfolgende Transkriptomanalysen (siehe 3.5.15) in TRIzol<sup>TM</sup> aufgenommen. Für die Untersuchung des Einflusses von Metallo- und Cysteinproteasen auf den Invasionsprozess wurden zusätzlich Ansätze mit dem pathogenen Klon B2<sup>P</sup> und dem nicht pathogenen Klon A1<sup>NP</sup> angesetzt, bei denen der Cysteinproteaseinhibitor E-64 (30 µM) und der Metalloproteaseinhibitor Phenanthrolin (10 µM) zugegeben wurden.

### 3.4.6 Messung des transepithelialer elektrischen Widerstandes der 2D-Organoid-Monolayer

Über die Messung des transepithelialer elektrischen Widerstandes (*transepithelial electrical resistance*, TEER) konnten Rückschlüsse auf die Integrität der, aus 3D-Organoiden generierten, Monolayer gezogen werden. Dabei wird mit Hilfe von zwei Elektroden, welche in dem apikalen und basalen Reservoir des Transwell Aufbaus gehalten werden, ein Wechselstrom geleitet und Spannung, Strom sowie Phasenverschiebung bestimmt. Daraus wird der Wechselstromwiderstand berechnet, welcher durch den TEER-Wert abgebildet wird. Die beiden Reservoirs sind elektrisch nur durch die bewachsenen Filter verbunden und ansonsten gegeneinander isoliert. Befinden sich also, zum Beispiel durch die Trophozoiten gebildete, Lücken in dem Zellrasen, fällt der Wechselstromwiderstand. Somit können über die Messung des TEER Rückschlüsse auf den Zustand des Monolayers geschlossen werden. Die Messung des TEER fand dabei zum Start sowie je nach Fragestellung stündlich oder zweistündlich statt, bis zu einer maximalen Inkubationszeit von 8 Stunden. Die Messung fand dabei auf einem vorgewärmten Heizblock bei 37°C statt und wurde mit Hilfe des *Millicell ERS-2* Voltohmmeters und der Elektrode *STX01* durchgeführt. Für die Normalisierung der Messwerte wurde der TEER-Wert eines nicht bewachsenen Filters von diesen subtrahiert und anschließend auf 1 cm<sup>2</sup> angepasst.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli*

Nach dem Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen (siehe 3.2.5), wurden einzelne Kolonien der bewachsenen LB-Platten in 4 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den *E. coli* Zellen der Flüssigkulturen erfolgte mit dem *Plasmid DNA purification Kit* von Machery-Nagel nach Herstellerangaben. Die Konzentrationsmessung der Proben wurde anschließend am NanoDrop 2000 durchgeführt (siehe 3.5.3).

### 3.5.2 Plasmid-Medi-Präparation aus *E. coli*

Mussten größere Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen isoliert werden, wurde eine Medi-Präparation durchgeführt. Dafür wurde am Vortag eine 3 mL Flüssigkultur mit LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin angesetzt und mit einer Kolonie, die das gewünschte Plasmid durch eine Transformation (siehe 3.5.2) enthielt, angeimpft und bei 37°C und 180 rpm über 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 300 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin mit der gesamten Kultur angeimpft (1%) und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mittels des *NucleoBond Xtra Medi Plus Kit* von Machery-Nagel nach Herstellerangaben. Dabei wurde die DNA nach Reinigung mittels der *finalizer*-Methode aufkonzentriert. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte am NanoDrop 2000 (siehe 3.5.3).

### 3.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Um die Konzentration von DNA oder RNA zu bestimmen, wurden die jeweiligen Proben am NanoDrop 2000 photometrisch gemessen. Die Messung fand bei einer Wellenlänge von 260 nm statt. Dabei diente das Verhältnis der OD<sub>260 nm</sub> zu OD<sub>280 nm</sub> und OD<sub>230 nm</sub> zu OD<sub>260 nm</sub> als Maß für Verunreinigungen, wie Proteine oder Pufferrückstände.

### 3.5.4 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigt werden. Ein Ansatz wurde dabei wie folgt pipettiert:

PCR Reagens	Menge
5x Green Go Taq Flexi Buffer	5 µL
Magnesiumchlorid (25 mM)	1,5 µL
dNTPs (2,5 mM)	2,5 µL
Forward Primer	2,5 µL
Reverse Primer	2,5 µL
Taq Polymerase	0,5 µL
DNA Template (1 ng–1 µg/µL)	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	9,5 µL

Der Ansatz wurde in einem 0,2 mL Reaktionsgefäß gemischt und in dem Thermal Cycler platziert. Das Programm enthielt die folgenden Einstellungen:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	4 min	
Denaturierung	95°C	30 sek	30 Zyklen
<i>Annealing</i>	X°C	40 sek	
Elongation	72°C	Y sek	
Finale Elongation	72°C	10 min	

Die *annealing* Temperatur und die Elongationszeit mussten für die Reaktion individuell berechnet werden. Die Temperatur wurde dabei mit Hilfe von *NEB Tm calculator* 1.13.10. anhand der Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer berechnet. Die Elongationszeit berechnet sich aus der Länge der Amplifikate und der Umsatzgeschwindigkeit der Taq-Polymerase (1 kb/min). Durch die Finale Elongation wurden den Amplifikaten die, für die TOPO-Klonierung notwendigen, A-Überhänge angefügt (siehe 3.5.7).

### 3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese konnten die Plasmide und Inserts nach dem Restriktionsverdau voneinander getrennt und anschließend gereinigt werden. Dabei werden die negativ geladenen DNA Moleküle durch das Anlegen eines elektrischen Flusses in einem Agarosegel nach ihrer Größe getrennt. Durch die unterschiedlichen Porengröße des Gels wandern die Moleküle ihrer Größe entsprechend bis zu einem bestimmten Punkt. Anhand eines eingesetzten Größenmarkers können dann die Inserts und Plasmide abgeglichen werden. In dieser Arbeit wurde mit 1 prozentigen Agarosegelen gearbeitet. In die Taschen der Gele wurden dann die kompletten Ansätze des Restriktionsverdau pipettiert. Zusätzlich wurde in eine Tasche 10 µL des Größenstandards pipettiert. Die Gele wurden für eine Stunde bei 90 Volt laufen gelassen. Die Auswertung der Gele erfolgte mittels eines UV-Tisches. Das in dem Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und kann mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Reinigung der Inserts und Plasmide für die weitere Verwendung wurde mittels dem *NucleoSpin Gel and PCR clean up* Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt

### 3.5.6 Restriktionsverdau

Um den korrekten Einbau der Sequenzen in die jeweiligen Vektoren zu überprüfen, oder um die Vektoren und Sequenzen für die Ligation zu isolieren wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Dabei werden Plasmide mit Hilfe von Endonukleasen, welche an spezifische DNA Sequenzen binden, geschnitten, wobei spezielle Sequenzüberhänge entstehen. Plasmide und Inserts mit passenden Überhängen können im Folgenden ligiert werden (siehe 3.5.8). Für den Verdau wurden Enzyme und Puffer der *FastDigest*<sup>®</sup> (FD) Reihe von ThermoFisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation erfolgte dabei für 15 Minuten bei 37°C im Heizblock. Danach konnten die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (siehe 3.5.5).

### 3.5.7 TOPO Klonierung

Die Klonierung in den TOPO-Vektor diente der Überprüfung von Länge und korrekter Orientierung der amplifizierten Inserts der PCR. Dabei bindet das Enzym Topoisomerase I kovalent an beide Enden des Vektors und produziert spezifische Vektorüberhänge. Die für die Ligation benötigten A-Überhänge am zu klonierenden Insert wurden nach der PCR angefügt (siehe 3.5.4). Diese erlauben eine schnelle Ligation bei Raumtemperatur ohne den Einsatz weiterer Ligasen. Weiter befindet sich ein Gen, welches für die  $\beta$ -Lactamase codiert in dem TOPO Vektor, was eine spätere Selektion über das Blau-Weiß Screening ermöglicht. Spezifische Bindungsstellen für M13 Primer auf beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle erlauben die Überprüfung durch Sequenzierung (siehe 3.5.9). Die TOPO Klonierung wurde mittels des TOPO TA *Cloning* Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Transformation von 2 µL des Ansatzes in *E. coli* Zellen (siehe 3.2.5).

### 3.5.8 Ligation

Die Ligation diente dem einbringen der DNA-Inserts aus dem TOPO-Vektor in den Zielvektor. Dabei fügt das Enzym Ligase die Inserte und Vektoren durch die, bei der Restriktion entstandenen spezifischen Überhänge zusammen (siehe 3.5.6). Die Ligation wurde mit Hilfe des T4 Ligase Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden Insert und Vektor in einem Massenverhältnis von 1:2 oder 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 14°C über Nacht im Thermal Cycler. 10 µL der Ligation wurden für die Transformation in *E. coli* Zellen eingesetzt (siehe 3.2.5).

### 3.5.9 Überprüfung von Vektor-Konstrukten

Um sicherzustellen, dass die Sequenzen der Metalloproteasen korrekt in die jeweiligen Zielvektoren eingebaut wurden, wurde ein Test-Restriktionsverdau (siehe 3.5.6) angesetzt und mittels Agarosegelen (siehe 3.5.5) überprüft. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung durch eine Sequenzierung mittels *sanger sequencing* (Sanger *et al.*, 1997). Mit dieser Methode konnten zusätzlich noch mögliche Fehler in den Sequenzen überprüft werden. Die Sequenzierung wurde von der Firma Microsynth Synthlab GmbH durchgeführt.

### 3.5.10 Generierung des Myc-Konstruktes für die Lokalisation der EhMP8-1 und der EhMP8-2 in den Trophozoiten

Die Lokalisation der beiden Metalloproteasen sollte mittels Myc-tag erreicht werden. Dazu wurden zunächst die beiden Gensequenzen mittels PCR amplifiziert (siehe 3.5.4). Um die spätere Expression der Gene so natürlich wie möglich zu gestalten wurden zusätzlich 500 bp in 5'-Richtung der beiden Gene mit amplifiziert. So sollte eine Expression unter den eigenen Promotoren sichergestellt sein, da die Promotorsequenzen sich innerhalb dieser zusätzlichen 500 bp befinden. Als DNA Grundlage diente genomische DNA des Klons A1<sup>np</sup>. Die Amplifikate wurden zunächst in den TOPO Vektor eingebracht (siehe 3.5.7) und in *E. coli* TOP 10 Zellen transformiert (siehe 3.2.5). Nach Überprüfung des korrekten Einbaus (siehe 3.5.9) wurde die Sequenzen aus dem TOPO Vektor isoliert (siehe 3.5.6) und in den Zielvektor pNC-Myc mittels Ligation eingebracht (siehe 3.5.8). Der Vektor wurde anschließend in *E. coli* TOP 10 Zellen eingebracht (siehe 3.2.5) und durch eine Medi-Präparation in ausreichenden Mengen isoliert (siehe 3.5.2). Anschließend erfolgte die Transfektion in die *E. histolytica* Trophozoiten (siehe 3.2.4). Die Lokalisation erfolgte mittels IFA (siehe 3.3.5). Zusätzlich wurden Lysate der Transfektanten im Westernblot untersucht (siehe 3.3.4).

### 3.5.11 Isolierung von RNA aus *E. histolytica* Trophozoiten und Humanzellen

Für den Nachweis der Expression bestimmter Gene mittel *real-time* qPCR (siehe 3.5.13) oder um Transkriptomanalysen (siehe 3.5.15) durchzuführen, musste zunächst RNA aus den jeweiligen Zellen isoliert werden. Dafür wurden die entsprechenden Zellen zunächst in 700 – 800  $\mu$ L TRIzol™ lysiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 16000 x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden vorsichtig 700  $\mu$ L des Überstandes abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen. Durch die Zentrifugation und Abnahme des Überstandes, wird möglicher störender Zelldebris vermieden. Nun wurde die RNA mit Hilfe des *Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit* von Zymo Research nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde am NanoDrop 2000 gemessen.

### 3.5.12 Synthese von cDNA

Um die Expression bestimmter Gene, in den jeweiligen Transfektanten nachzuweisen musste die isolierte RNA (siehe 3.5.11) zunächst in cDNA umgeschrieben werden, damit sie in der qPCR (siehe 3.5.13) eingesetzt werden konnte. Die Synthese wurde mit Hilfe des *SuperScriptIII First-Strand-Synthesis System-Kit* von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Reverse-Transkriptase schreibt hierbei die mRNA mit Hilfe von spezifischen Oligo(dT)-Primern in cDNA um. Es wurde 1  $\mu$ g RNA in einem Reaktionsansatz von insgesamt 20  $\mu$ L eingesetzt. Die Synthese erfolgte für eine Stunde bei 42°C und die cDNA konnte bis zu einer Woche bei -20°C gelagert werden.

### 3.5.13 Quantitative *real-time* PCR

Mittels der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) konnte das Expressionslevel von bestimmten Genen überprüft werden. Dabei wird die Expression des Zielgenes (GOI, *gene of interest*) ins Verhältnis zu der Expression eines Referenzgenes (Ref) gesetzt. Das Referenzgen zeichnet sich durch eine konstante Expression in den zu untersuchenden Zellen aus, was Unterschiede in der Menge der eingesetzten cDNA ausgleicht. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -actin verwendet. Für die Quantifizierung der qPCR Produkte wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser interkaliert mit der, bei der qPCR gebildeten doppelsträngigen DNA und emittiert, beim Aufschluss dieser, Licht einer Wellenlänge von 521 nm. Nach jedem Zyklus erfolgt eine Detektion des Signals, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der DNA zunimmt. Dabei wird der Zyklus bestimmt, bei dem das gemessene Signal einen bestimmten Schwellenwert (*threshold of cycle*, CT) überschreitet. Der CT gibt an, wann das gemessene Signal erstmals die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Befindet sich eine große Menge cDNA des GOI in der Probe, was eine auf erhöhte Menge von RNA zurückzuführen ist, überschreitet das Fluoreszenzsignal eher den CT, als bei einer Probe mit geringerer cDNA Menge. Die Berechnung des Expressionslevel erfolgte mittels der *delta-delta-CT* Methode ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Dafür wurde zunächst noch eine Probe als Kalibrator (Kal) bestimmt, dessen relative Konzentration auf 1 gesetzt wurde. Der Kalibrator gilt dabei als Probe, in dem das Expressionslevel des GOI den zu erwartenden Wert annimmt. Für die Berechnung der relativen Expression der GOI wurde zunächst die Differenz des CT-Wertes des GOI zum Referenzgen, sowie die Differenz des CT-Wertes des Kalibrators zum Referenzgen wie folgt ermittelt:

### 3 Material und Methoden

$$\Delta CT_{GOI} = CT_{GOI} - CT_{Ref}$$

$$\Delta CT_{Kal} = CT_{Kal} - CT_{Ref}$$

Anschließend konnte der *delta-delta-CT* Wert mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

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

Nun folgte die Berechnung der relativen Expression des GOI im Verhältnis zu dem Kalibrator:

$$GOI_{rel. conc} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Dieser Wert beschreibt die relative Konzentration des GOI in einer Probe im Vergleich zu dem vorher bestimmten Kalibrator. Für den Ansatz wurde der *Luna® Universal qPCR Master Mix* der Firma NEB verwendet. Pro Ansatz wurden dabei 9 µL des Mastermix, je 2 µL Primer in einer Konzentration von 5 pmol/µL, 1 µL cDNA und 6 µL ddH<sub>2</sub>O eingesetzt. Pro zu untersuchender Probe wurde dabei ein Doppelansatz angesetzt. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der ddH<sub>2</sub>O anstatt cDNA eingesetzt wurde. Die Durchführung erfolgte am *Corbett Research Rotor-Gene 3000* in 0,1 mL Reaktionsgefäßen unter folgenden Einstellungen:

qPCR Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	60 Sekunden	1
Denaturierung	95°C	15 Sekunden	
<i>Annealing</i>	58°C	20 Sekunden	40
Elongation und Detektion	68°C	20 Sekunden	

Im Anschluss erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die Temperatur kontinuierlich von 68°C auf 95°C erhöht wurde. Dies diente der Erkennung von Primer-Dimeren oder unspezifischen Amplifikaten, da die Temperatur, bei der die amplifizierten DNA Produkte denaturieren und den Farbstoff freigegeben, spezifisch für die diese ist.

#### 3.5.14 Überprüfung der RNA Qualität für die Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse (siehe 3.5.15) musste zunächst die Qualität der isolierten RNA (siehe 3.5.11) überprüft werden, um Degradation oder Fragmentierung dieser auszuschließen. Die Überprüfung erfolgte dabei am Bioanalyser *Agilent 2100®* wobei der RIN-Wert (*RNA integrity number*) bestimmt wurde. Dabei wurden die unterschiedlichen Fraktionen der rRNA (5S, 18S und 28S) in der zu untersuchenden Probe mittels einer Kapillar-Elektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und durch einen Detektor, nach Passieren eines bestimmten Punktes, detektiert. Anhand des Vergleiches mit einem Standard konnte dann Laufgeschwindigkeit und Größe der Fragmente bestimmt werden, wodurch Rückschlüsse auf die Qualität der RNA gezogen werden konnte. Der Ansatz der Proben erfolgte dabei mit Hilfe des *Agilent RNA 6000 Pico Kit* von Agilent Technologies nach Herstellerangaben.

### 3.5.15 Transkriptomanalysen mittels *next generation sequencing* (NGS)

Für die Analyse der Transkriptome wurde zunächst die rRNA mit dem *FastSelect RNA Removal Kit* von QIAseq nach Herstellerangaben aus den zu untersuchenden RNA Proben entfernt. Es folgte eine Anreicherung der mRNA mit dem *Stranded mRNA Select Kit* von QIAseq nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der mRNA mit Hilfe des *NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5* (150 Zyklen) von QIAseq nach Herstellerangaben. Für die Auswertung der Daten wurden die *reads* zunächst mit *Trimmomatic* getrimmt und gefiltert. Danach erfolgte die Angleichung der Genomdaten mit Hilfe von *RSEM* und *Bowtie2software*. Die Genomdaten von AmoebaDB und von HG-36 dienten dabei als Grundlage. *Deseq* diente zur Normalisierung der Zeilen-*reads*. Die Anpassung der P-Werte erfolgte nach der Holm-Methode. Die Aufarbeitung der Proben sowie die Sequenzierung wurde von der BNITM-NGS-Corefacility durchgeführt. Die Datenanalyse wurde von Dr. Stephan Lorenzen am BNITM übernommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Invasion der 2D-Organoidkulturen

Der Invasionsprozess von *E. histolytica* Trophozoiten sollte mittels einer humanen, intestinalen 2D-Organoidkultur, untersucht werden. Diese ist von einem 3D-Organoid abgeleitet und bildet die Situation *in vivo* gut nach, da sie aus allen Zelltypen des menschlichen Darms besteht, die sich direkt aus entnommenen Stammzellen entwickelt haben (siehe 3.2.9) Für die Untersuchung der Gewebeinvasion wurden Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden, mit den 2D-Organoidkulturen co-inkubiert. Anhand von TEER-Messungen und mikroskopischen Aufnahmen nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Co-Inkubation sollten die Zerstörung des 2D-Organoidzellrasens untersucht werden und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Klonen gezeigt werden. Mit Hilfe von Transkriptomanalysen sollte die veränderte Genexpression der humanen Organoidzellen sowie der Trophozoiten der beiden Klone nach Co-Inkubation untersucht werden. Um den Einfluss der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen zu untersuchen, wurden die Metalloprotease-Transfektanten ebenfalls mit Organoidzellen co-inkubiert und nach definierten Zeitpunkten die Integrität der 2D-Organoidkulturen mittels Messung des TEER-Wertes bestimmt.

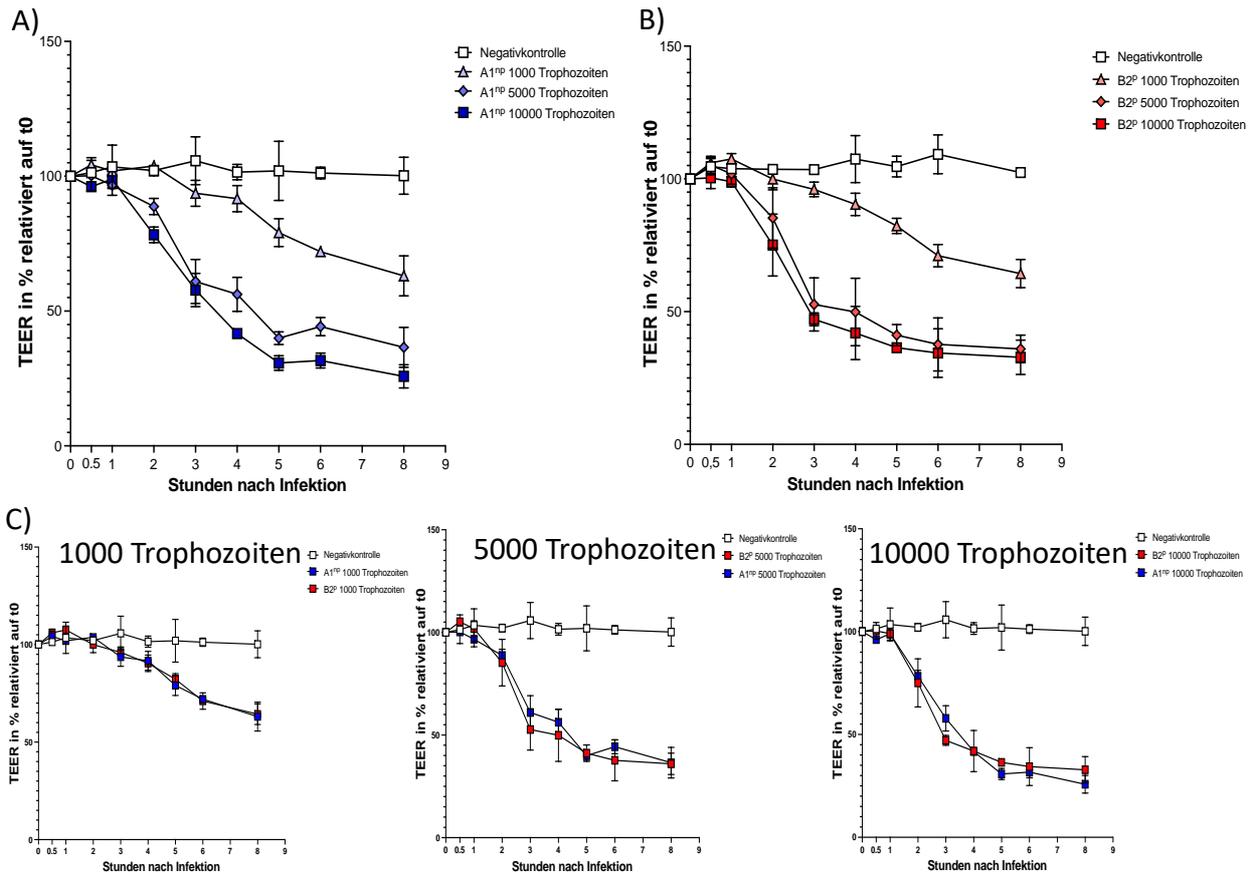
### 4.1.1 TEER Messungen

Durch die Messung des TEER-Wertes sollten Rückschlüsse auf die Integrität der 2D-Organoid Zellmonolayer während der Invasionversuche mit *E. histolytica* Trophozoiten gezogen werden. Dabei wurde, je nach Fragestellung, nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Co-Inkubation von Organoidzellen und Trophozoiten mit Hilfe einer Elektrode ein elektrischer Strom angelegt und der Widerstand gemessen. Ist der Zellrasen intakt, stehen die Zellen in enger Verbindung zueinander, was einen hohen elektrischen Widerstand bewirkt. Fällt der Wert ab lässt das auf eine Zerstörung des Zellrasen schließen.

#### 4.1.1.1 Co-Inkubation von 2D-Organoidkulturen und Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

Zunächst sollte mit Hilfe der TEER-Messung ein möglicher Unterschied zwischen der nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> und dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> in der Invasion und der damit verbundenen Zerstörung des Zellrasen untersucht werden. Dafür wurden Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> und des Klons B2<sup>p</sup> in drei unterschiedlichen Zellzahlen (1000, 5000 und 10000) auf die mit Organoidzellen bewachsenen Filter gegeben. Die Ansätze wurden dann bei 37°C inkubiert, wobei nach 30 Minuten, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 8 Stunden der TEER-Wert gemessen wurde. In Abb. 6 sind die Ergebnisse der Messungen graphisch dargestellt. Die gemessenen Werte wurden dafür auf 1 cm<sup>2</sup> bezogen und sind in Prozent relativiert auf den Startwert (t<sub>0</sub>) angegeben. Als Negativkontrolle dienten 2D-Organoidkulturen, die nicht mit Trophozoiten inkubiert wurden. In Abb. 6A sind Messungen während der Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> gezeigt. Für alle Zellzahlen zeigt sich eine stetige Reduktion des TEER-Wertes über den Zeitraum der Co-Inkubation. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kulturen, die mit einer Zellzahl von 1000 infiziert wurden und den beiden, die mit 5000 und 10000 Trophozoiten infiziert wurden. Zwischen 5000 und 10000 zeigt sich kein signifikanter Unterschied. In Abb. 6B sind die TEER-Werte der Inkubation mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> gezeigt. Auch hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit 1000 Trophozoiten und den Inkubationen mit 5000 und 10000 Trophozoiten zu erkennen. Zwischen der Inkubation mit 5000 und 10000 Trophozoiten zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied. In Abb. 6C sind die TEER-Messungen der Inkubationen mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> in unterschiedlichen Zellzahlen im direkten Vergleich dargestellt. Dabei zeigt sich für keinen Verlauf ein signifikanter Unterschied in den TEER-Werten zwischen der Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit den Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 6: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.**

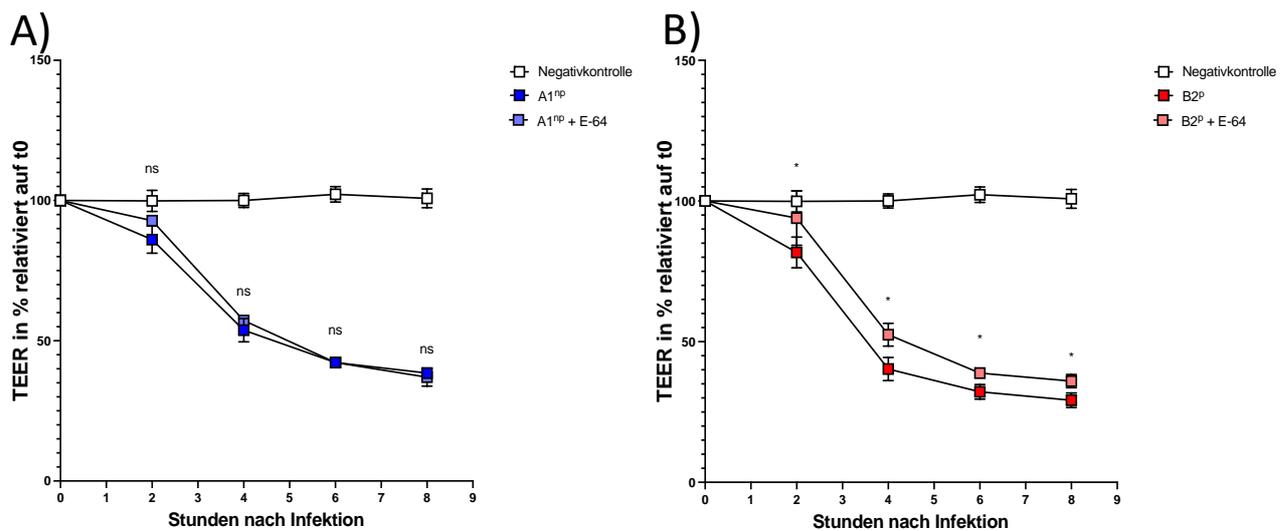
Humane Dünndarm-Zellmonolayer, generiert aus 3D-Organoiden, wurden auf 0,6cm<sup>2</sup> Filtern kultiviert und mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> in unterschiedlicher Zellzahl (1000, 5000 und 10000) co-inkubiert. Messung des TEER-Wertes erfolgte 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden, 5 Stunden, 6 Stunden und 8 Stunden nach Inkubation mittels Millicell ERS-2 Voltohmmeters und der Elektrode STX01 bei 37°C. Werte sind berechnet auf 1 cm<sup>2</sup> und relativiert zum Startwert t<sub>0</sub>. Als Negativkontrolle wurden 2D-Organoidkulturen ohne Zugabe von Trophozoiten gemessen. **A)** Verläufe der TEER-Messungen der Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup>. **B)** Verläufe der TEER-Messungen der Infektion mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup>. **C)** Vergleich der Verläufe der TEER-Messungen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.

### 4.1.1.2 Einfluss der Cysteinproteasen auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen

Cysteinproteasen stellen einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *E. histolytica* dar. In verschiedenen Arbeiten konnte ein Einfluss der Cysteinproteasen auf die Gewebeinvasion und die Bildung von ALAs gezeigt werden (Lidell *et al.*, 2006; Tillack *et al.*, 2006; Thibeaux *et al.*, 2013). Um einen möglichen Einfluss von Cysteinproteasen auf die Invasion der Organoidzellen durch die *E. histolytica* Trophozoiten zu untersuchen, wurden Filter, welche mit Organoidzellen bewachsen waren, zusammen mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> inkubiert und zusätzlich mit dem Cysteinproteaseinhibitor E-64 versetzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 37°C inkubiert und nach 2, 4, 6 und 8

## 4 Ergebnisse

Stunden der TEER-Wert gemessen. Ein Vergleich mit Ansätzen ohne den Inhibitor sollte einen möglichen Einfluss der Cysteinproteasen von *E. histolytica* auf die Zerstörung des Zellrasen zeigen. Die Trophozoiten wurden in einer Zellzahl von 10000 auf die Filter gegeben. Der Cysteinproteaseinhibitor E-64 wurde in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  dazugegeben. In Abb. 7 sind die Ergebnisse der Messungen graphisch dargestellt. Die gemessenen Werte wurden dafür pro 1  $\text{cm}^2$  berechnet und sind in Prozent relativiert auf den Startwert ( $t_0$ ) angegeben. Als Negativkontrolle dienten 2D-Organoidkulturen, die nicht mit Trophozoiten inkubiert, jedoch ebenfalls mit E-64 versetzt, wurden. Abb. 7A zeigt den Vergleich der TEER-Messungen bei einer Inkubation mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> mit und ohne Zugabe von E-64. Es ist dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansätzen zu erkennen. In Abb. 7B ist der Vergleich der TEER-Messungen bei einer Inkubation mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> mit und ohne Zugabe von E-64 abgebildet. Dabei zeigt sich für alle Messpunkte ein signifikant höherer TEER-Wert bei einer Inkubation mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> und E-64 als bei einer Inkubation mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> ohne E-64. Somit scheint die Hemmung von Cysteinproteasen für Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> einen stärkeren Einfluss auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen zu haben, als für Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup>.



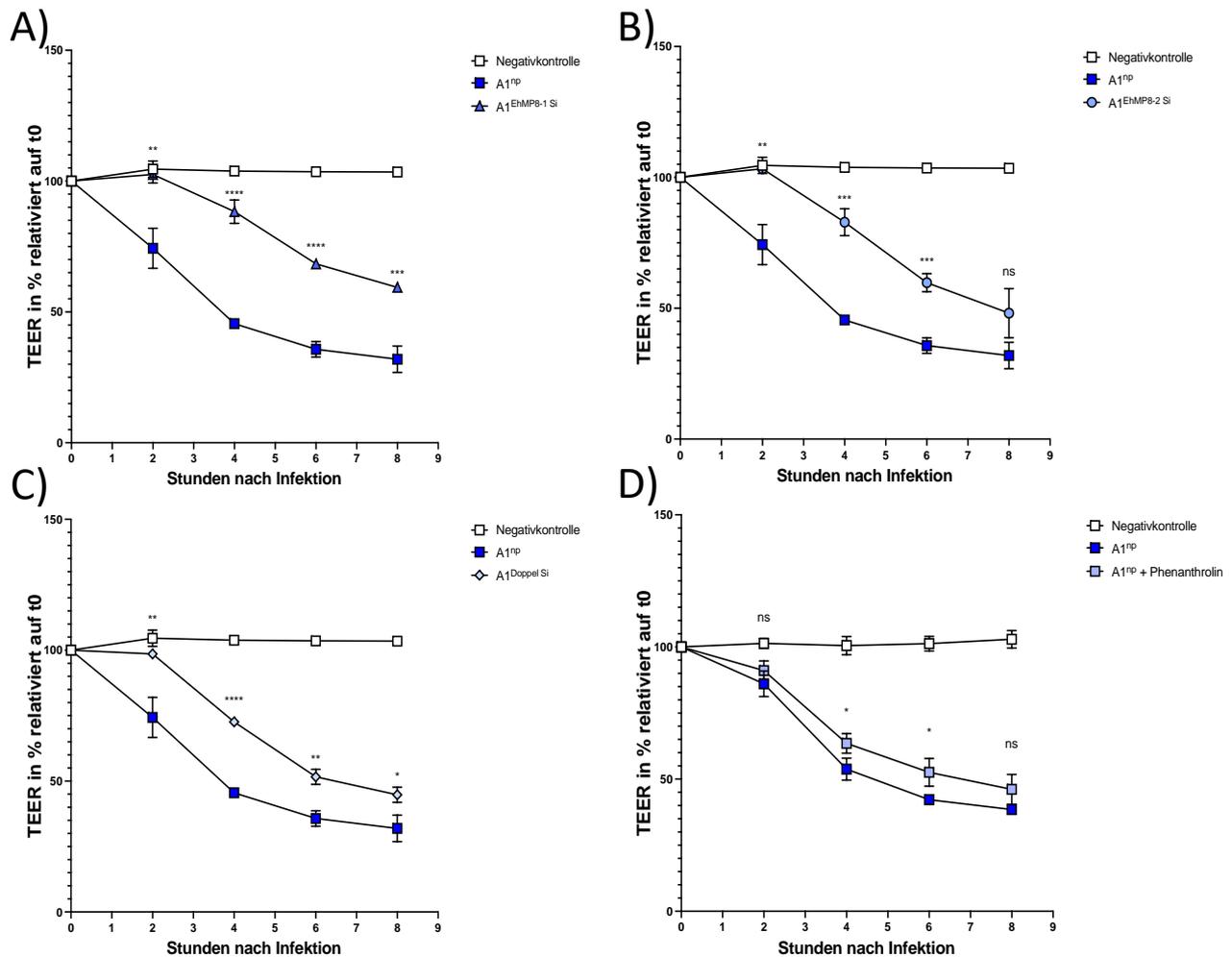
**Abbildung 7: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> mit und ohne E-64.**

Humane Dünndarm Monolayer, generiert aus 3D-Organoiden, wurden auf 0,6  $\text{cm}^2$  Filtern kultiviert und mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> in An- und Abwesenheit des Cysteinproteaseinhibitors E-64 co-inkubiert. Messung des TEER-Wertes erfolgte 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Infektion mittels Millicell ERS-2 Voltohmmeters und der Elektrode STX01 bei 37°C. Werte sind berechnet auf 1  $\text{cm}^2$  und relativiert zum Startwert  $t_0$ . Als Negativkontrolle wurden 2D-Organoidkulturen ohne Zugabe von Trophozoiten, jedoch mit Zugabe von E-64 gemessen. **A)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> mit und ohne E-64. **B)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> mit und ohne E-64. (Mittelwert $\pm$ Standardfehler,  $n=3$ , unpaired Student's  $t$  test,  $ns= p>0,05$ ,  $*p\leq 0,05$ )

### 4.1.1.3 Einfluss der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen

Um einen möglichen Einfluss der beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 von *E. histolytica* auf die Invasion der Organoid Monolayer durch die Trophozoiten zu untersuchen, wurden die bewachsenen Filter zusammen mit Trophozoiten der Metalloprotease-Transfektanten co-inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten eine Messung des TEER-Wertes durchgeführt. Die Trophozoiten wurden dabei in einer Zellzahl von 10000 auf die Organoidkulturen gegeben. Zusätzlich wurden Organoidkulturen mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> unter Zugabe des Metalloproteaseninhibitors Phenanthrolin inkubiert. Die Messung des TEER-Wertes erfolgte 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Zugabe der Trophozoiten. Phenanthrolin wurde in einer Konzentration von 10 µM zugegeben. In Abb.8 sind die Ergebnisse der Messungen für den nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> und die *silencer* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> graphisch dargestellt. Abb. 9 zeigt die TEER-Messungen für den pathogenen Klon B2<sup>p</sup> und den *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Der Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> wurde in diesen Versuchen nicht miteinbezogen. Die gemessenen Werte wurden dafür pro 1 cm<sup>2</sup> berechnet und sind in Prozent relativiert auf den Startwert (t0) angegeben. Als Negativkontrolle dienten 2D-Organoidkulturen, die nicht mit Trophozoiten inkubiert wurden. Für die Ansätze mit Inhibitor wurde dieser ebenfalls zur Negativkontrolle gegeben. Abb. 8A zeigt den Vergleich der TEER-Messungen der Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> und dem *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Die zu den Zeitpunkten gemessenen TEER-Werte des *silencers* sind dabei alle signifikant höher, im Vergleich zu den TEER-Werten des Klons A1<sup>np</sup>. Abb. 8B zeigt den Vergleich des *silencers* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und dem Klon A1<sup>np</sup>. Dabei zeigt sich für die ersten drei Zeitpunkte eine signifikant höherer TEER-Wert für den *silencer* im Vergleich zum Klon A1<sup>np</sup>. Die letzte Messung zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied. In Abb. 8C ist der Vergleich zwischen dem Klon A1<sup>np</sup> und dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> dargestellt. Auch hier zeigen die Messungen signifikant höhere Werte für den *silencer* im Vergleich zu A1<sup>np</sup>. Abb. 8D zeigt den Einfluss des Metalloproteaseinhibitors Phenanthrolin. Dabei ist der Vergleich der TEER-Messungen des Klons A1<sup>np</sup> und der des Klons A1<sup>np</sup> mit Zusatz von Phenanthrolin gezeigt. Hier zeigen sich für die Messungen nach 4 und 6 Stunden signifikant höhere Werte bei dem Klon A1<sup>np</sup> mit Zusatz von Phenanthrolin als bei A1<sup>np</sup> ohne Inhibitor. Für die erste und letzte Messung ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Abb. 9A zeigt den Vergleich der TEER-Messung des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> und dem *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Dabei zeigt sich für den *silencer* zu allen Zeitpunkten signifikant höhere Werte im Vergleich zu dem Klon B2<sup>p</sup>. In Abb. 9B ist der Vergleich zwischen B2<sup>p</sup> mit und ohne dem Inhibitor Phenanthrolin gezeigt. Hier ist für die ersten drei Messpunkte kein Unterschied zu erkennen. Jedoch zeigt die letzte Messung nach 8 Stunden einen signifikant höheren TEER-Wert für den Klon B2<sup>p</sup> mit Phenanthrolin als für den Klon B2<sup>p</sup> ohne Inhibitor.

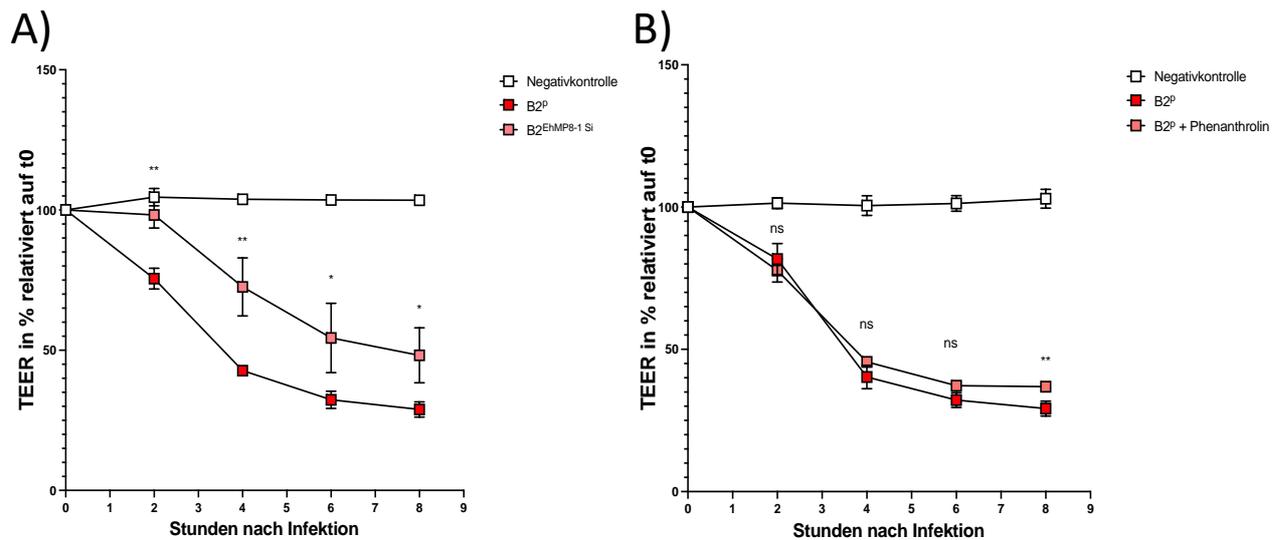
## 4 Ergebnisse



**Abbildung 8: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der Metalloprotease-Transfektanten des Klons A1<sup>np</sup> und Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> mit Phenanthrolin.**

Humane Dünndarm Monolayer, generiert aus 3D-Organoiden, wurden auf 0,6cm<sup>2</sup> Filtern kultiviert und mit Trophozoiten der Metalloprotease *silencer* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> sowie mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> in An- und Abwesenheit von 10 µM des Metalloproteaseinhibitors 1,10-Phenanthrolin co-inkubiert. Messung des TEER-Wertes erfolgte 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Co-Inkubation mittels Millicell ERS-2 Voltmeters und der Elektrode STX01 bei 37°C. Werte sind berechnet auf 1 cm<sup>2</sup> und relativiert zum Startwert t<sub>0</sub>. Als Negativkontrolle wurden 2D-Organoidkulturen ohne Zugabe von Trophozoiten gemessen. Die Negativkontrolle für die Inhibitor Vergleiche wurden ebenfalls mit diesem versetzt. **A)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und dem *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>. **B)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und dem *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>. **C)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup>. **D)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Infektion mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> mit und ohne Phenanthrolin. (Mittelwert±Standardfehler, n=3, unpaired Student's t test, ns= p>0,05, \*p≤0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001, \*\*\*\*p≤0,0001).

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 9: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten des Klons B2<sup>P</sup> mit Phenanthrolin und Trophozoiten des silencer B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>.**

Humane Dünndarm Monolayer, generiert aus 3D-Organoiden, wurden auf 0,6cm<sup>2</sup> Filtern kultiviert und mit Trophozoiten des Metalloprotease *silencers* des pathogenen Klons B2<sup>P</sup> sowie mit Trophozoiten des Klons B2<sup>P</sup> in An- und Abwesenheit von 10 µM des Metalloproteaseinhibitors 1,10-Phenanthrolin co-inkubiert. Messung des TEER-Wertes erfolgte 2, 4, 6 und 8 Stunden nach der Zugabe der Trophozoiten mittels Millicell ERS-2 Voltohmmeters und der Elektrode STX01 bei 37°C. Werte sind berechnet auf 1 cm<sup>2</sup> und relativiert zum Startwert t<sub>0</sub>. Als Negativkontrolle wurden 2D-Organoidkulturen ohne Zugabe von Trophozoiten gemessen. Die Negativkontrolle für die Inhibitor Vergleiche wurden ebenfalls mit diesem versetzt. **A)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>P</sup> und dem *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>. **B)** Vergleiche der Verläufe der TEER-Messungen bei Co-Inkubation mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>P</sup> mit und ohne Phenanthrolin. (Mittelwert±Standardfehler, n=3, unpaired Student's t test, ns=p>0,05, \*p≤0,05, \*\*p≤0,01).

### 4.1.2 Mikroskopische Analyse der Invasion der 2D-Organoidzellen

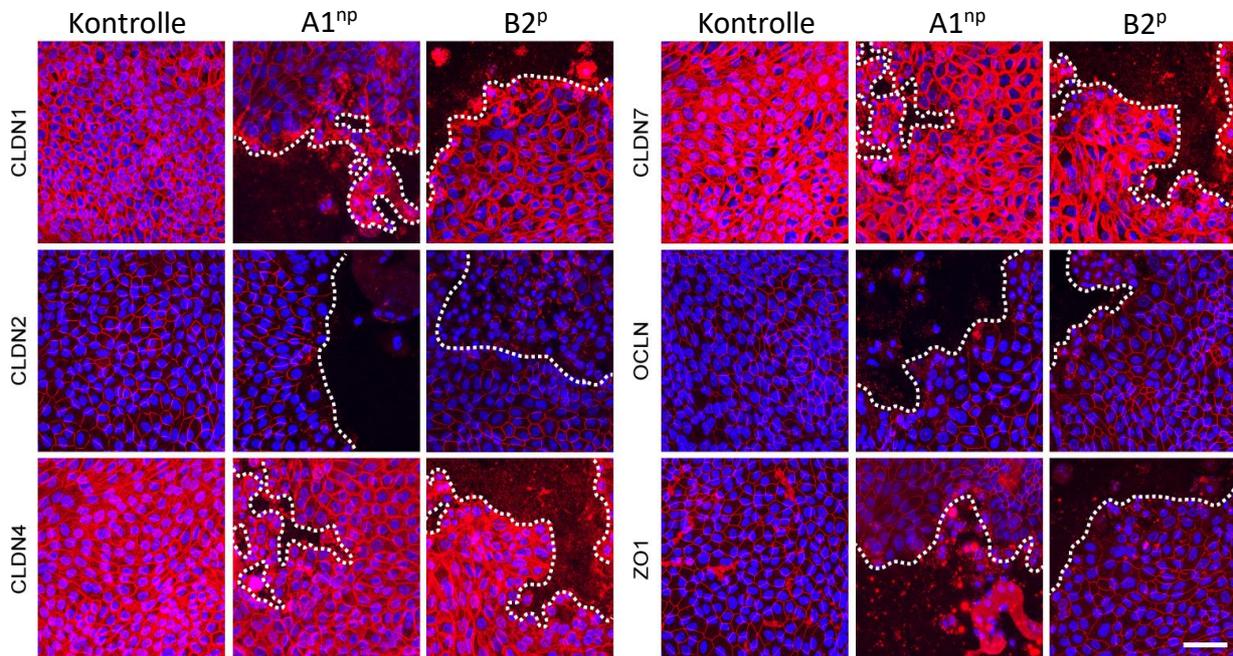
Um einen Einblick in die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen durch die Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> zu bekommen, wurden die bewachsenen Filter nach 8 Stunden Co-Inkubation mit 5000 Trophozoiten der beiden Klone fixiert und IFAs angesetzt. Die Fixierung, der Ansatz der IFAs und die mikroskopische Auswertung wurde dabei von Dr. David Holthaus (Arbeitsgruppe Aebischer, Robert Koch-Institut, Berlin) durchgeführt

#### 4.1.2.1 IFA der 2D-Organoidkulturen 8 Stunden nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup>.

In Abb. 10 sind die mikroskopischen Aufnahmen der IFAs der Organoidzellen nach 8 Stunden Co-Inkubation mit den Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> gezeigt. Als Kontrolle wurden intakte 2D-Organoidkulturen verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst Farbstoff (blaue Färbung) gefärbt. Die rote Färbung zeigt unterschiedliche Proteine, die an der Bildung der *tight junctions* beteiligt sind und dienen der besseren Darstellung und Orientierung der Aufnahmen. Gefärbt sind dabei verschiedene Claudin Proteine (CLDN1, CLDN2, CLDN4 und CLDN7) sowie Occludin (OCLN) und Zonula Occludens (ZO1). Eine Färbung der Trophozoiten war nicht möglich, da diese durch den Fixierungsprozess verloren gingen. Es zeigt sich, dass

## 4 Ergebnisse

die Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden der Co-Inkubation große Bereiche der in die 2D-Organoidkulturen zerstört haben. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> und dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup>. Dies passt mit den Ergebnissen der TEER-Messungen zusammen (siehe 4.1.1.1)



**Abbildung 10: IFA Aufnahmen der 2D-Organoidkulturen nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.**

2D-Organoidkulturen wurden mit 5000 Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> für 8 Stunden Co-Inkubiert und anschließend mit Methanol fixiert. Färbung der Zellkerne in blau mit Hoechst (1µg/mL). Färbung von *tight junction* Proteinen in rot (*rabbit* anti-CLDN1 1:300, *rabbit* anti-CLDN2 1:300, *mouse* anti CLDN4 1:300, *rabbit* anti-CLDN7 1:300, *rabbit* anti-OCLN 1:300 und *mouse* anti-ZO1 1:300). Die Bilder wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Weiße gepunktete Linie zeigt Grenzen von lebenden und zerstörten Zellen. Maßstabsleiste = 50 µm.

### 4.1.3 Analyse der Transkriptomdaten der Co-Inkubations Experimente

Um ein besseres Verständnis der Gewebeeinvasion von *E. histolytica* zu erhalten, wurden Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> auf, die aus humanen, intestinalen Organoiden generierten, Monolayer gegeben und für 4 und 8 Stunden zusammen inkubiert. Danach wurden die Zellen in TRIzol<sup>TM</sup> lysiert und die RNA für Transkriptomanalysen isoliert. Durch den Vergleich der Daten sollten mögliche Unterschiede in der Genexpression zwischen den Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gezogen werden, wenn diese in Kontakt mit den Organoidzellen kommen. Weiter sollte die Untersuchung der Genexpression der Organoidzellen mögliche Unterschiede in der Reaktion auf die beiden Klone zeigen. Für die Analyse wurden nur Gene betrachtet, die einen *p*-Wert von <0,05 aufwiesen und mindestens 1,8-fach höher bzw. niedriger exprimiert wurden im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle.

#### 4.1.3.1 Analyse der Transkriptome der 2D-Organoidkulturen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

Um mögliche Unterschiede in der Reaktion der humanen, intestinalen Dünndarmzellen auf die Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> zu charakterisieren, sollte die Genexpression nach 4 und 8 Stunden der Co-Inkubation analysiert werden. Dazu wurden die Organoidzellen zusammen mit Trophozoiten der beiden Klone inkubiert und nach den beiden Zeitpunkten geerntet. Anschließend erfolgte die Isolation der RNA und die Analyse der Transkriptome mittels *next generation sequencing* (NGS). Als Kontrolle dienten Organoidzellen die ohne Trophozoiten inkubiert wurden. Die Transkriptome der Proben wurden dann mit denen der Kontrollen verglichen. In Tabelle 14: Anzahl an differentiell exprimierten Genen der 2D-Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> ( $p_{adj} < 0,05$ ,  $foldchange > 1,8$ ). ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene der Organoidzellen, wenn diese über 4 und 8 Stunden in Kontakt mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> standen, im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt. Dabei zeigt sich, dass nach 8 Stunden der Co-Inkubation wesentlich mehr Gene differentiell exprimiert sind, als nach 4 Stunden. Generell zeigen sich mehr unterschiedlich exprimierte Gene bei Kontakt mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> als bei Kontakt mit B2<sup>p</sup>. Dieser Unterschied zeigt sich vor allem bei einer Inkubation über 4 Stunden. Während bei der Inkubation mit B2<sup>p</sup> für 4 Stunden nur 48 Gene differentiell exprimiert sind, sind es bei einer Inkubation mit A1<sup>np</sup> mit 262 mehr als fünfmal so viele. Nach 8 Stunden ist dieser Unterschied mit 817 Genen bei Kontakt mit A1<sup>np</sup> zu 744 Genen bei Kontakt mit B2<sup>p</sup> zwar kleiner, aber dennoch vorhanden. Weiter zeigt sich, dass in allen Versuchsansätzen eine wesentlich größere Anzahl der differentiell exprimierten Gene hochreguliert sind.

**Tabelle 14:** Anzahl an differentiell exprimierten Genen der 2D-Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> ( $p_{adj} < 0,05$ ,  $foldchange > 1,8$ ).

	Co-Inkubation 4 h			Co-Inkubation 8 h		
	Insgesamt	Hoch	Runter	Insgesamt	Hoch	Runter
Organoid + A1 <sup>np</sup>	262	174	88	817	470	347
Organoid + B2 <sup>p</sup>	48	36	12	744	467	277

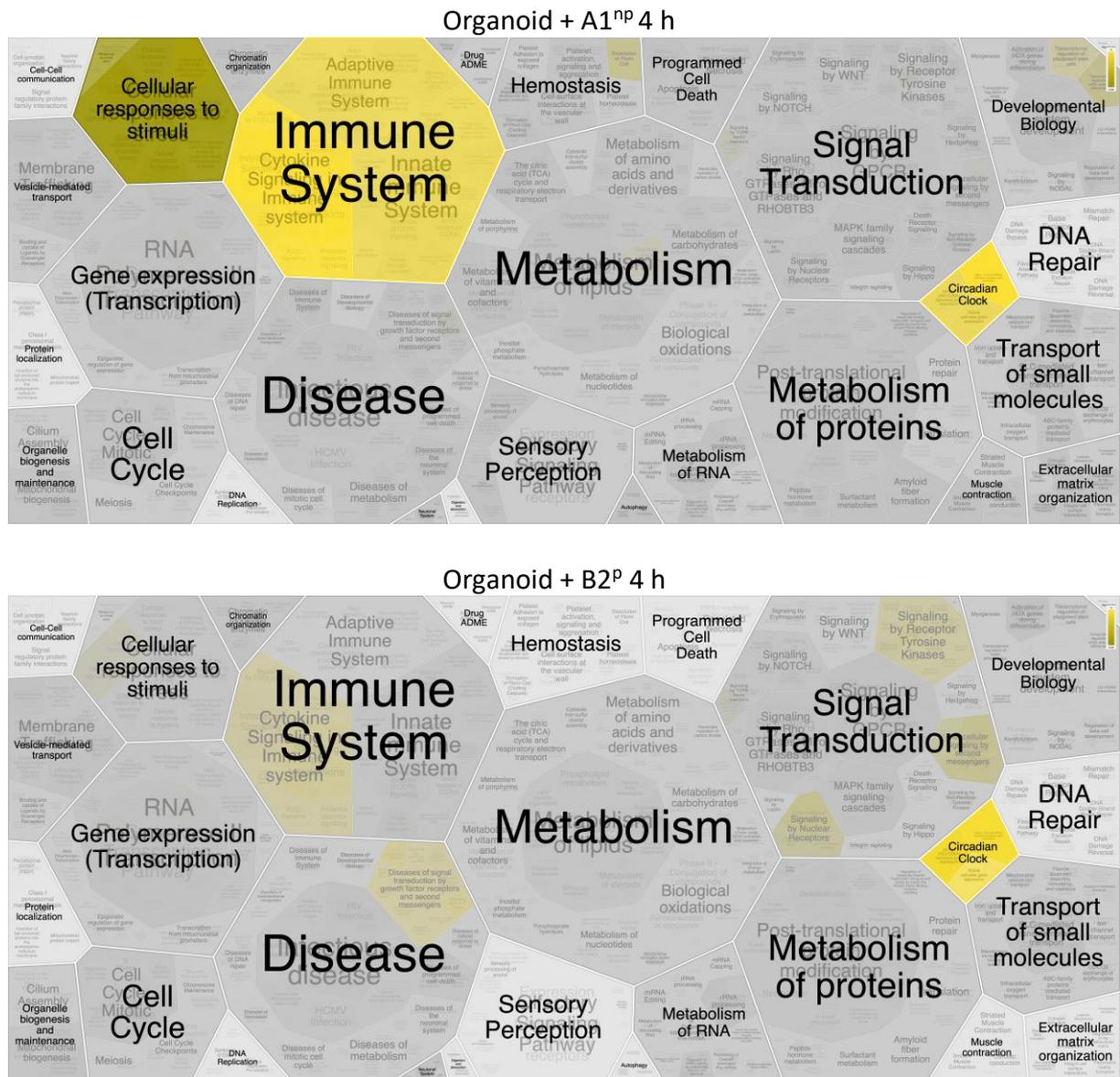
### 4.1.3.2 GO-Analysen der 2D-Organoidkultur

Für die weitere Analyse sollten nun die Unterschiede in der Reaktion der Organoidzellen auf die beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> genauer charakterisiert werden. Dazu wurden alle Gene, die, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant hoch- oder runterreguliert waren mit Hilfe einer GO-Analyse (*gene ontology*) genauer betrachtet. Dabei werden die zu untersuchenden Gene anhand einer Datenbank mit allen möglichen Stoffwechselwegen und Zellprozessen abgeglichen. Je mehr der zu analysierenden Gene an einem möglichen Stoffwechselweg beteiligt sind, desto signifikanter wird dieser gewertet. Die Analyse der Stoffwechselwege wurde dabei mit Reactome und ShinyGO durchgeführt (<https://reactome.org/>, Gillespie *et al.*, 2022; <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>, Ge *et al.*, 2020). Mit Hilfe von Reactome konnten so die übergeordneten Zellprozesse dargestellt und verglichen werden. Um einen genaueren Einblick in die überrepräsentierten Stoffwechselwege zu bekommen, wurden mit Hilfe von ShinyGO sog. GO-Netzwerke für die zehn am signifikantesten ( $p = <0.05$ ) überrepräsentierten Stoffwechselwege erstellt. Dabei steht jeder Punkt für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet ein bestimmter Stoffwechselweg. Je dunkler ein Punkt gefärbt ist, desto signifikanter ist er durch die zu untersuchenden Gene repräsentiert. Teilen sich Stoffwechselwege mindestens 20% der zu untersuchenden Gene, sind diese miteinander verbunden. Je stärker die Verbindung, umso mehr Gene werden dabei von zwei Stoffwechselwegen geteilt.

#### 4.1.3.2.1 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant hochregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation

Nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> zeigen sich, im Vergleich zu der Kontrolle, 174 Gene signifikant hochreguliert. Nach Inkubation mit B2<sup>p</sup> sind es 36 signifikant hochregulierte Gene. In Abb. 11 sind die, durch die signifikant hochregulierten Gene, überrepräsentierten Zellprozesse der Organoidzellen, wenn diese über 4 Stunden mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubiert wurden, graphisch dargestellt. Für die Zellen, welche mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> inkubiert wurden zeigt sich, dass Prozesse die mit dem Immunsystem, der zellulären Antwort auf Stimuli (*cellular response to stimuli*) und dem zirkadianen Rhythmus (*circadiane clock*) in Verbindung stehen, signifikant überrepräsentiert sind. Für die Zellen, die mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden zeigen sich ebenfalls Prozesse dieser drei Bereiche signifikant überrepräsentiert, jedoch sind die Bereiche Immunsystem und zelluläre Antwort auf Stimuli weniger stark repräsentiert. Zusätzlich finden sich hier noch Prozesse aus dem Bereich der Signaltransduktion (*signal transduction*).

#### 4 Ergebnisse



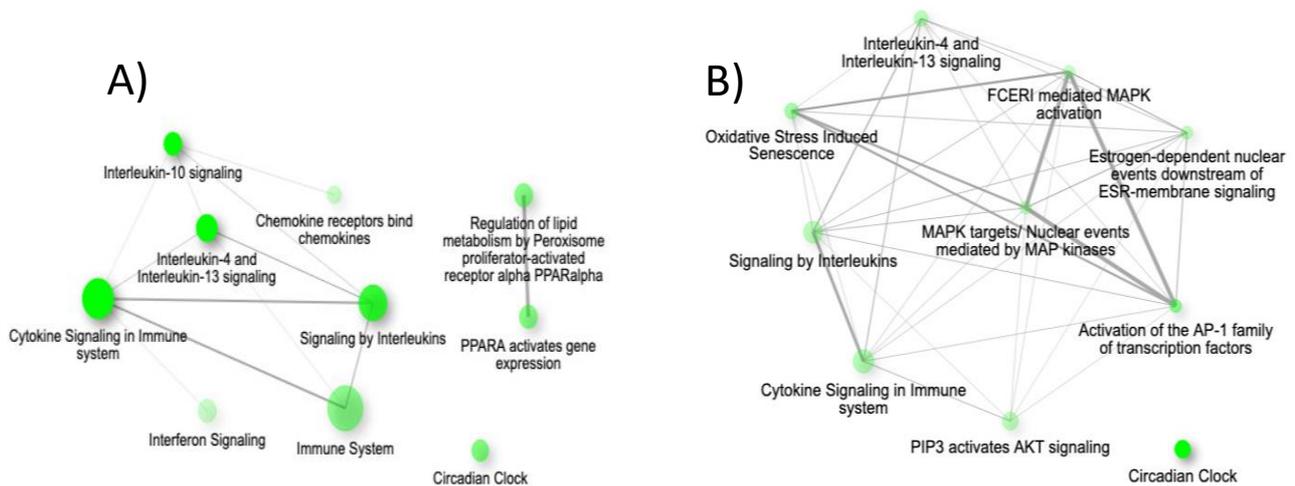
**Abbildung 11: Darstellung der, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.**

Zellprozesse die durch die signifikant hochregulierten Gene der Organoidzellen überrepräsentiert sind, sind in Gelb dargestellt. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist der Prozess repräsentiert. **Oben:** Analyse der Stoffwechselwege in den Organoidzellen inkubiert über 4 Stunden mit A1<sup>np</sup>. **Unten:** Analyse der Stoffwechselwege in den Organoidzellen inkubiert über 4 Stunden mit B2<sup>p</sup>. Graphik erstellt mit ReacFoam, Fabregat et al., 2017).

Für die genauere Betrachtung der signifikanten Stoffwechselwege wurden GO-Netzwerke erstellt. In Abb. 12 sind die GO-Netzwerke der in den Organoidzellen, durch die, im Vergleich zur Kontrolle, hochregulierten Gene, überrepräsentierten Stoffwechselwege gezeigt, wenn diese für 4 Stunden mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Abb. 12A zeigt die überrepräsentierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> inkubiert wurden und Abb. 12B, die der Organoidzellen, die mit B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Für die Organoidzellen, die mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> inkubiert wurden zeigen sich dabei vor allem Stoffwechselwege des Immunsystems. Am signifikantesten sind dabei Stoffwechselwege die mit Interleukinen (*interleukin signaling*) und Zytokinen (*cytokine*

## 4 Ergebnisse

signaling) in Verbindung stehen repräsentiert. So zeigen sich die Stoffwechselwege *interleukin-4 and interleukin-13 signaling*, *interleukin-10 signaling*, *signaling by interleukins* und *cytokine signaling in immune system* am signifikantesten repräsentiert. Für die Organoidzellen, die mit dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> inkubiert wurden, zeigen sich ebenfalls die Stoffwechselwege *interleukin-4 and interleukin-13 signaling* und *signaling by interleukins*, diese sind jedoch schwächer repräsentiert.



**Abbildung 12: GO-Netzwerke der zehn am signifikantesten, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.**

Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 4 Stunden mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 4 Stunden mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge *et al.*, 2020.

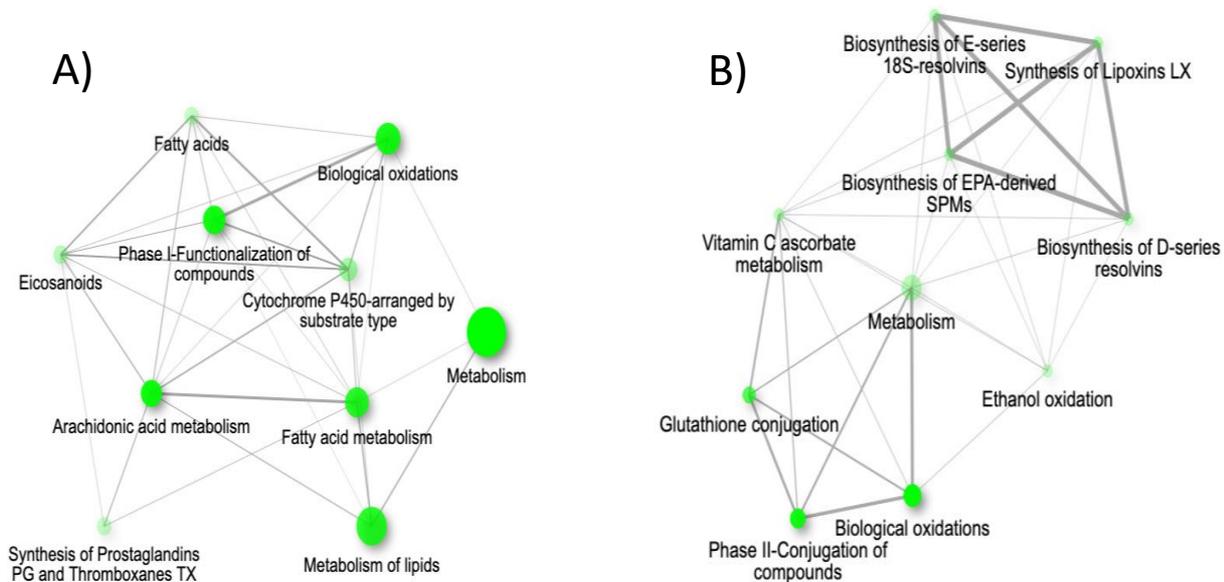
### 4.1.3.2.2 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant runterregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation

Nach 4 Stunden der Co-Inkubation mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> sind, im Vergleich zu der Kontrolle 88 Gene signifikant runterreguliert. Nach Inkubation mit B2<sup>p</sup> zeigen sich 12 signifikant runterregulierte Gene im Vergleich zur Kontrolle. In Abb. 13 sind die, durch die signifikant runterregulierten Gene, überrepräsentierten Zellprozesse der Organoidzellen gezeigt, wenn diese für 4 Stunden mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Dabei zeigt sich, dass in beiden Co-Inkubations Versuchen vor allem Gene aus dem Bereich des Zellstoffwechsels (*metabolism*) runterreguliert sind. Bei einer 4 stündigen Co-Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zeigen sich zusätzlich noch Prozesse aus dem Bereich *transport of small molecules* überrepräsentiert.



## 4 Ergebnisse

Für die genauere Betrachtung der überrepräsentierten Stoffwechselwege, innerhalb der signifikant runterregulierten Genen wurden GO-Netzwerke der Top 10 Stoffwechselwege erstellt. Abb. 14 zeigt die Netzwerke für die 4-stündige Inkubation mit Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> (Abb. 14A) und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> (Abb. 14B). Dabei ist zu erkennen, dass bei einer Inkubation mit A1<sup>np</sup> vor allem Stoffwechselwege des Zellstoffwechsels runterreguliert sind. Die signifikantesten betreffen dabei den Fettsäurestoffwechsel, wie *fatty acid metabolism*, *metabolism of lipids* und *fatty acids*. Die Top 10, durch die signifikant runterregulierten Gene, überrepräsentierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, wenn diese für 4 Stunden mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden, betreffen ebenfalls den Zellstoffwechsel. Die signifikantesten sind dabei *biological oxidations*, *phase II-conjugation of compounds* und *glutathione conjugation*.



**Abbildung 14: GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.**

Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 4 Stunden mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 4 Stunden mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge *et al.*, 2020.

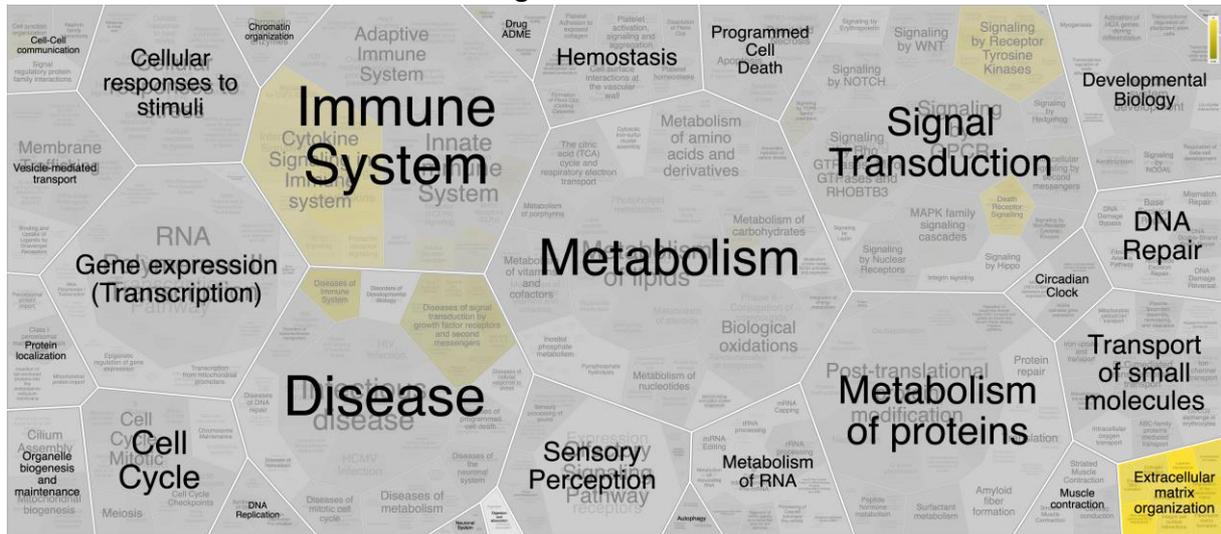
### 4.1.3.2.3 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant hochregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation

Im Weiteren wurden die, durch die signifikant hochregulierten Gene, überrepräsentierten Zellprozesse der Organoidzellen untersucht, die über 8 Stunden mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Nach Inkubation mit A1<sup>np</sup> sind 470 Gene und nach Inkubation mit B2<sup>p</sup> sind 467 Gene signifikant hochreguliert. In Abb. 15 sind die, durch die signifikant hochregulierten Gene überrepräsentierten, übergeordneten Zellprozesse graphisch dargestellt. Für beide Versuche zeigen sich dabei Gene für Prozesse des

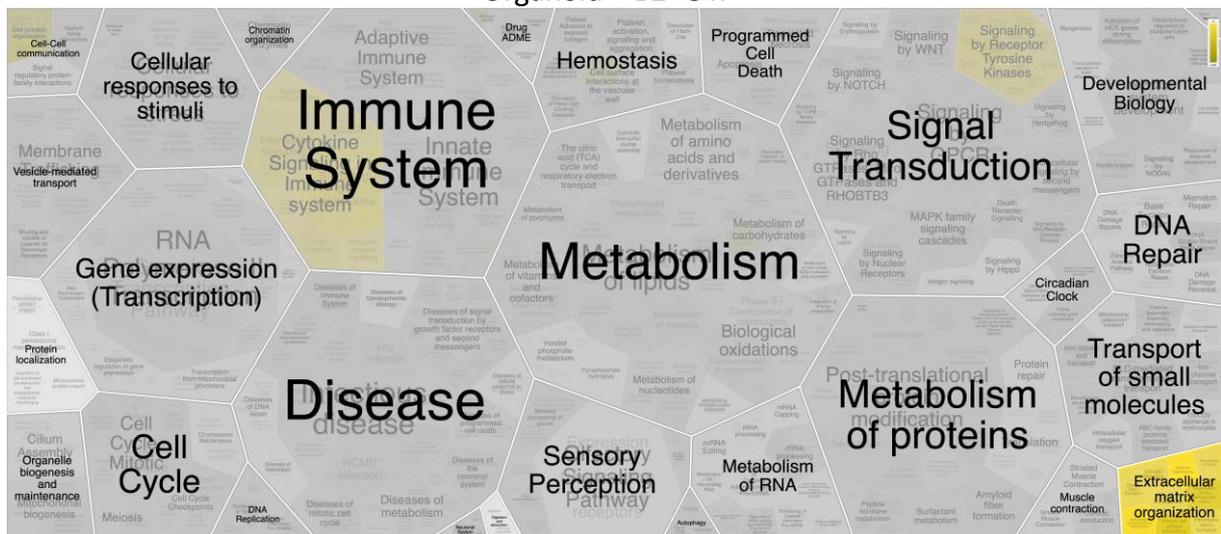
## 4 Ergebnisse

Immunsystems, der Signal Transduktion und Organisation der extrazellulären Matrix hochreguliert. Für die Co-Inkubation mit dem Klon A1<sup>np</sup> sind außerdem noch Prozesse aus dem Bereich Krankheit (*disease*) überrepräsentiert.

Organoid + A1<sup>np</sup> 8 h



Organoid + B2<sup>p</sup> 8 h

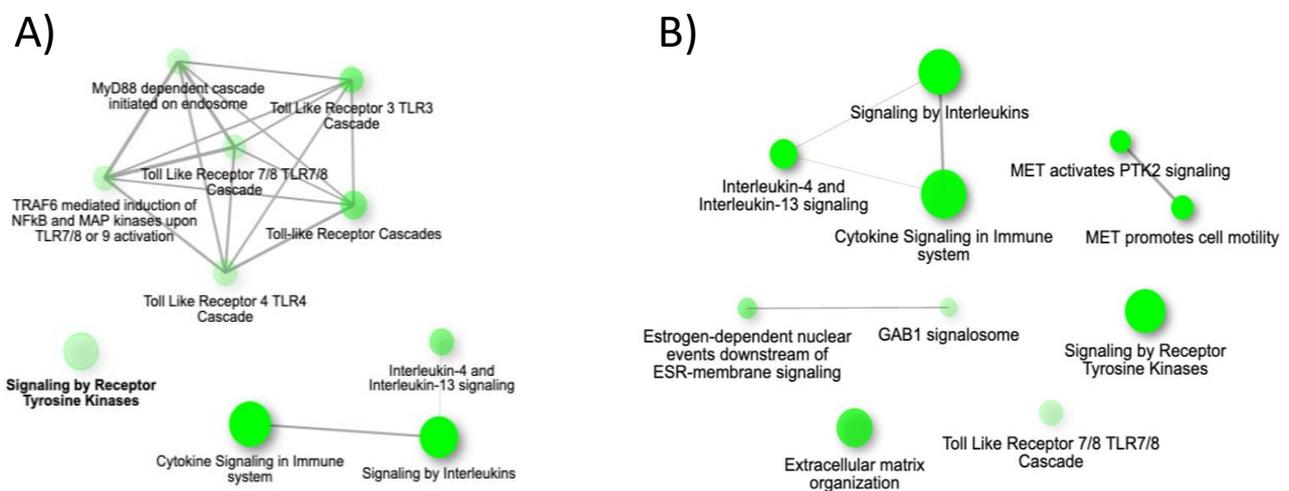


**Abbildung 15:** Darstellung der, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.

Zellprozesse die durch die signifikant hochregulierten Gene der Organoidzellen überrepräsentiert sind, sind in Gelb dargestellt. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist der Prozess repräsentiert. **Oben:** Analyse der Stoffwechselwege in den Organoidzellen inkubiert über 8 Stunden mit A1<sup>np</sup>. **Unten:** Analyse der Stoffwechselwege in den Organoidzellen inkubiert über 8 Stunden mit B2<sup>p</sup>. Graphik erstellt mit *ReacFoam*, *Fabregat et al.*, (2017).

## 4 Ergebnisse

Für einen genaueren Einblick in die, durch die signifikant hochregulierten Gene, überrepräsentierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die 8 Stunden mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubiert wurden, wurden GO-Netzwerke der 10 signifikantesten Stoffwechselwege erstellt. In Abb. 16A ist das Netzwerk der 10 signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen nach 8-stündiger Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> gezeigt. Die signifikantesten Stoffwechselwege betreffen dabei Signalwege von Zytokinen (*cytokine signaling in immune system*) und Interleukinen (*signaling by interleukins, interleukin-4 and interleukin-13 signaling*). Weiter zeigt sich ein Netzwerk für Stoffwechselwege die Toll-like Rezeptor Kaskaden betreffen. In Abb. 16B sind die Netzwerke der 10 signifikantesten Stoffwechselwege der Organoidzellen gezeigt, die über 8 Stunden mit Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Auch hier sind die Stoffwechselwege der Zytokin- und Interleukin-Signalwege am signifikantesten repräsentiert. Daneben finden sich noch die Stoffwechselwege *signaling by receptor tyrosine kinases* und *extracellular matrix organization* signifikant überrepräsentiert.



**Abbildung 16: GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.**

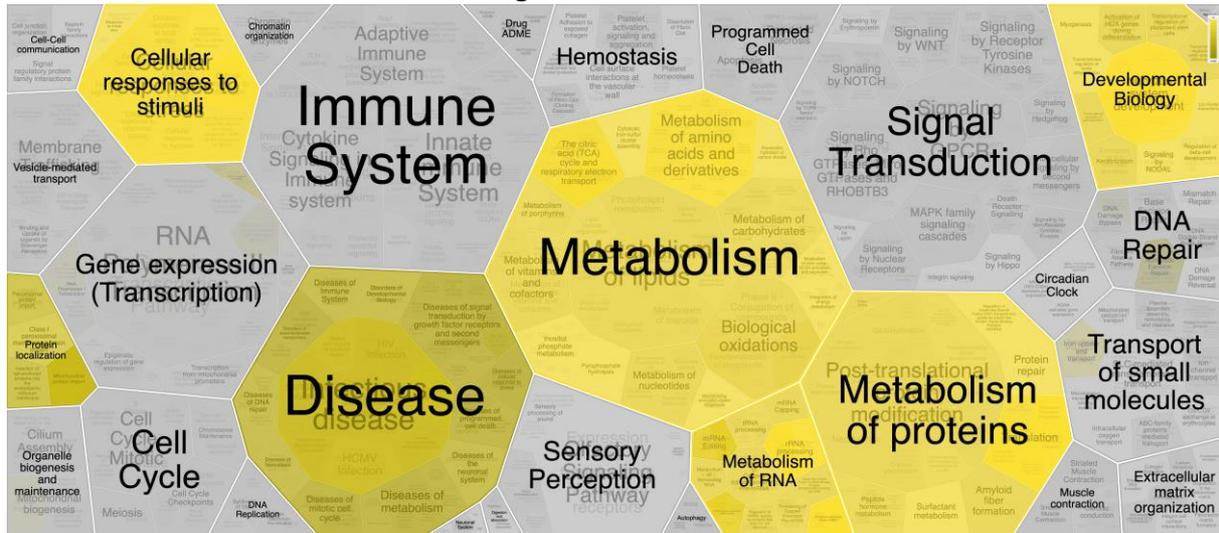
Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 8 Stunden mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 8 Stunden mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge *et al.*, 2020.

### **4.1.3.2.4 GO-Analyse der in den Organoidzellen signifikant runterregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation**

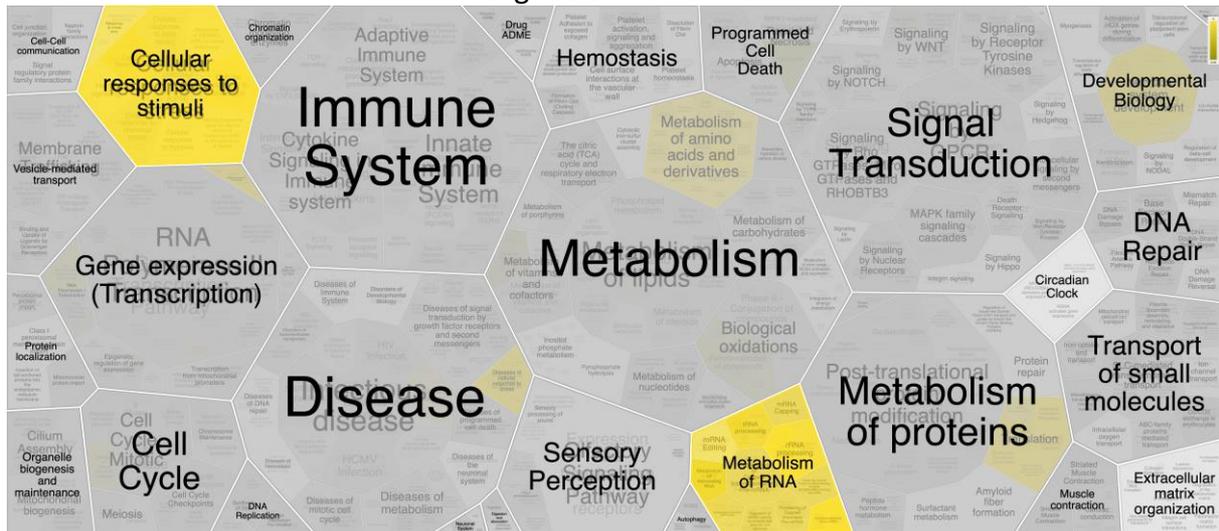
Nach einer 8-stündigen Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> zeigen sich 347 Gene in den Organoidzellen signifikant runterreguliert im Vergleich zu der Kontrolle. Nach Inkubation mit B2<sup>p</sup> sind es 277 signifikant runterregulierte Gene. Die, durch die signifikant runterregulierten Gene, überrepräsentierten Zellprozesse in den Organoidzellen, wenn diese für 8 Stunden mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> inkubiert wurden, sind in Abb. 17 graphisch dargestellt. Dabei zeigen sich für die Zellen, die mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> inkubiert wurden eine Vielzahl von Prozessen runterreguliert. So sind Prozesse aus dem Bereich der Proteinbiosynthese, des RNA Stoffwechsels, des allgemeinen Zellstoffwechsels, der Antwort auf Stimuli und aus dem Bereich Krankheit runterreguliert. Für die Zellen, die mit dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> inkubiert wurden zeigen sich diese Bereiche ebenfalls runterreguliert, wobei die Prozesse des Zellstoffwechsels, des RNA Stoffwechsels und der Bereich Krankheit weniger stark repräsentiert ist.

## 4 Ergebnisse

Organoid + A1<sup>np</sup> 8 h



Organoid + B2<sup>p</sup> 8 h

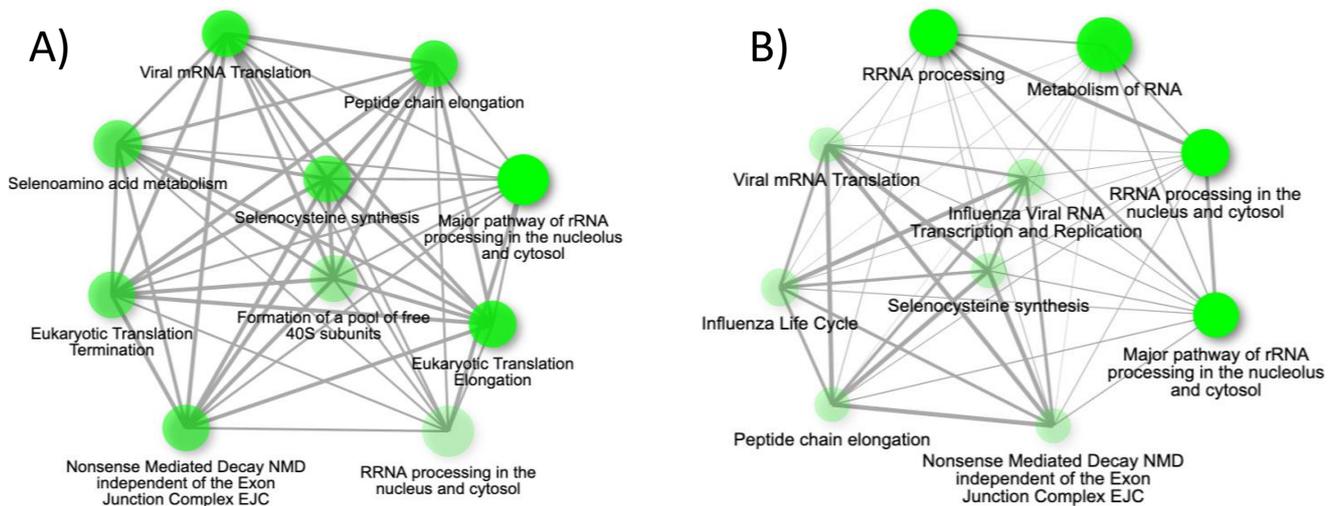


**Abbildung 17:** Darstellung der, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.

Zellprozesse die durch die signifikant hochregulierten Gene der Organoidzellen überrepräsentiert sind, sind in Gelb dargestellt. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist der Prozess repräsentiert. **Oben:** Analyse der Stoffwechselwege in den Organoidzellen inkubiert über 8 Stunden mit A1<sup>np</sup>. **Unten:** Analyse der Stoffwechselwege in den Organoidzellen inkubiert über 8 Stunden mit B2<sup>p</sup>. Graphik erstellt mit ReacFoam, Fabregat *et al.*, 2017).

Die 10 signifikantesten Stoffwechselwege aus den übergeordneten Prozessen sind in Abb. 18 durch ein GO-Netzwerk dargestellt. Abb. 18A zeigt das Netzwerk für die Organoidzellen, die mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> inkubiert wurden. Stoffwechselwege der Proteinbiosynthese und des RNA Stoffwechsels zählen zu den signifikantesten. In Abb. 18B ist das Netzwerk für die Stoffwechselwege der Organoidzellen, die mit dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> inkubiert wurden gezeigt. Hier zeigen sich hauptsächlich Stoffwechselwege aus dem Bereich des RNA Stoffwechsels und wenige aus dem Bereich der Proteinbiosynthese.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 18: GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.**

Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 8 Stunden mit Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen, die über 8 Stunden mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge *et al.*, 2020.

### 4.1.3.3 Analyse der Transkriptome der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit den 2D-Organoidkulturen

Um Unterschiede in der Genexpression zwischen den Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> und des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> nach 4 bzw. 8 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen zu identifizieren, wurden die Transkriptome der entsprechenden Trophozoiten, mittels NGS analysiert. Als Kontrolle dienten dabei Trophozoiten der jeweiligen Klone, die ohne Organoidzellen in dem Transwell-System inkubiert wurden. In Tabelle 15 ist die Anzahl an, im Vergleich zu den Kontrollen, differentiell exprimierten Gene der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gezeigt, wenn diese über 4 und 8 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden ( $\text{padj} < 0,05$ ,  $\text{foldchange} > 1,8$ ). Für die Co-Inkubation über 4 Stunden zeigen sich mit 255 Genen in A1<sup>np</sup> und 221 Genen in B2<sup>p</sup> ungefähr gleich viele differentiell exprimierte Gene im Vergleich zu den Kontrollen. In A1<sup>np</sup> zeigt sich, dass von den 255 Genen ca. die eine Hälfte hoch- und die andere Hälfte runterreguliert sind, während bei B2<sup>p</sup> ca. zwei Drittel der 221 Gene hoch- und ein Drittel runterreguliert sind. Nach 8 stündiger Inkubation zeigen sich bei beiden Ansätzen, mit 523 für A1<sup>np</sup> und 382 für B2<sup>p</sup> eine größere Anzahl an Genen differentiell exprimiert. Bei der Betrachtung der hoch- und runterregulierten Gene ergibt sich für beide Klone ein ähnliches Bild in der Verteilung, wie bei der Inkubation über 4 Stunden.

## 4 Ergebnisse

**Tabelle 15:** Anzahl an differentiell exprimierten Genen der Trophozoiten von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit den 2D-Organoidkulturen ( $p_{adj} < 0,05$ ,  $foldchange > 1,8$ ).

	Co-Inkubation 4 h			Co-Inkubation 8 h		
	Insgesamt	Hoch	Runter	Insgesamt	Hoch	Runter
A1 <sup>np</sup> + Organoid	255	117	138	523	269	254
B2 <sup>p</sup> + Organoid	221	148	73	382	248	134

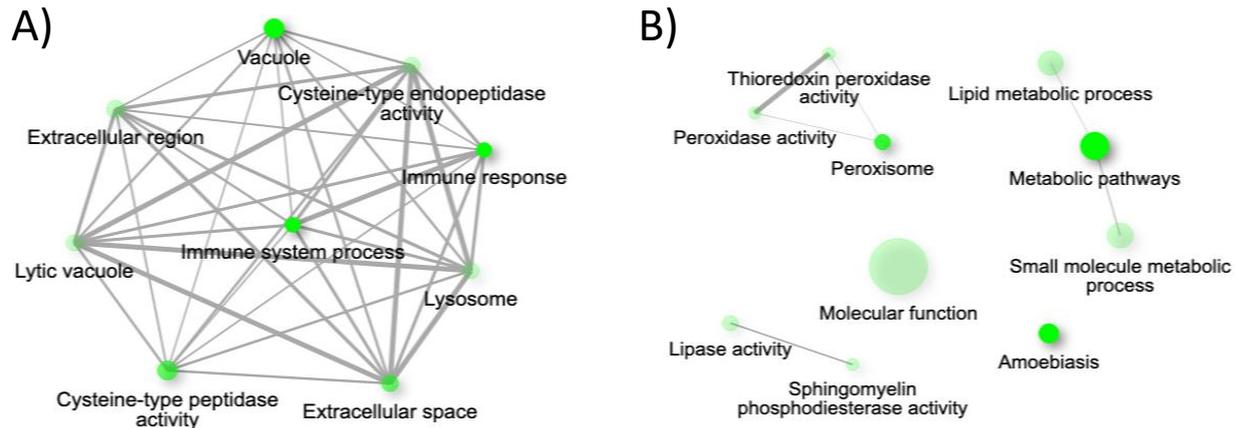
### 4.1.3.4 GO-Analysen der Trophozoiten von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

Mit Hilfe der GO-Analysen sollten, wie schon bei den Organoidzellen (siehe 4.1.2.3), die, durch die, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant runter- und hochregulierten Gene der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> überrepräsentierten Stoffwechselwege untersucht werden. Die Analyse erfolgte mit ShinyGO und PANTHER (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>, Ge *et al.*, 2020; <http://www.pantherdb.org/>, Mi *et al.*, 2021). Da die Datenbanken zu Stoffwechselwegen von *E. histolytica* noch lückenhaft sind und auch die Funktion vieler Proteine unbekannt ist, konnten nicht immer die 10 am signifikantesten regulierten Stoffwechselwege ( $p = < 0.05$ ) gefunden werden.

#### 4.1.3.4.1 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant hochregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen

Nach 4 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen sind 117 Gene in A1<sup>np</sup> und 148 Gene in B2<sup>p</sup>, im Vergleich zu den Kontrollen signifikant hochreguliert. Eine Analyse der, durch diese Gene signifikant überrepräsentierten Stoffwechselwege ist in Abb. 19 dargestellt. Dabei zeigt Abb. 19A die 9 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege des Klons A1<sup>np</sup> und Abb. 19B die 10 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege des Klons B2<sup>p</sup>. In dem Klon A1<sup>np</sup> zählen nach 4 Stunden Co-Inkubation mit den Organoidzellen Prozesse der Immunantwort (*immune system process* und *immune response*) sowie der Cysteinproteaseaktivität (*cysteine-type peptidase activity*) und aus dem Bereich Vakuolen (*vacuole*) zu den am signifikantesten überrepräsentierten. Für den Klon B2<sup>p</sup> zeigt sich ein weniger stark vernetztes Netzwerk. Zu den am signifikantesten hochregulierten Prozessen zählen hier Stoffwechselwege aus den Bereichen des Zellstoffwechsels (*metabolic pathways*, *lipid metabolic process*, *small molecule metabolic process*), der Amöbiasis und der Peroxisomenaktivität (*peroxisome*, *peroxidase activity*, *thioredoxin peroxidase activity*).

## 4 Ergebnisse



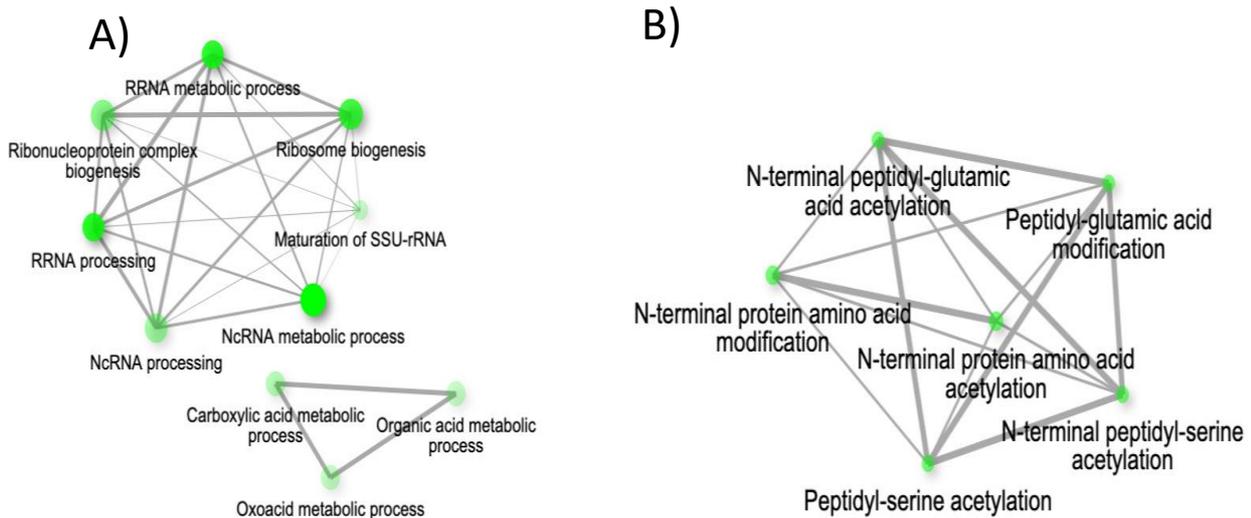
**Abbildung 19: GO-Netzwerke der 10 ( $A1^{np}=9$ ) am signifikantesten, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubierten Trophozoiten der Klone  $A1^{np}$  und  $B2^p$ .**

Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der signifikant hochregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten von  $A1^{np}$ , die über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten des Klons  $B2^p$ , die über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge *et al.*, 2020.

### 4.1.3.4.2 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant runterregulierten Gene nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen

In den Trophozoiten des Klons  $A1^{np}$  sind, im Vergleich zu der Kontrolle, nach 4 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen 138 Gene signifikant runterreguliert. In dem Klon  $B2^p$  sind es 73 Gene, die signifikant runterreguliert sind. In Abb. 20 sind die GO-Netzwerke, der 10 signifikantesten Stoffwechselwege gezeigt, die durch die signifikant runterregulierten Gene überrepräsentiert sind. Abb. 20A zeigt die Prozesse des Klons  $A1^{np}$ . Zu den signifikantesten zählen hier Prozesse des RNA Stoffwechsels (*NcrRNA metabolic process*, *RRNA processing*, *RRNA metabolic process*). Für den Klon  $B2^p$  konnten nur 6 signifikante Zellprozesse ausgemacht werden, die innerhalb die 73 signifikant runterregulierten Gene überrepräsentiert sind (Abb. 20B). Alle Prozesse sind dabei aus dem Bereich der Proteinbiosynthese.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 20: GO-Netzwerke der 10 (B2<sup>P</sup>=6) am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubierten Trophozoiten der Klone A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup>.**

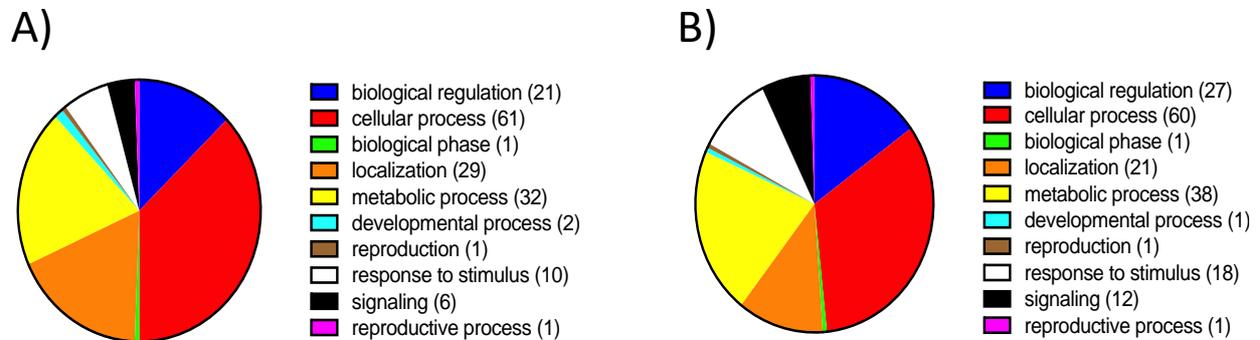
Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten von A1<sup>NP</sup>, die über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 6 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten des Klons B2<sup>P</sup>, die über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge et al., 2020

### 4.1.3.4.3 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant hochregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen

Für die 296 Gene in A1<sup>NP</sup> und die 248 Gene in B2<sup>P</sup>, die im Vergleich zu den Kontrollen, nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen, signifikant hochreguliert waren, konnten keine signifikant überrepräsentierten Stoffwechselwege ausgemacht werden. In Abb. 21 sind alle Zellprozesse, die durch die signifikant hochregulierten Gene repräsentiert werden in Kreisdiagrammen dargestellt. Abb. 21A zeigt dabei alle Prozesse, die den signifikant hochregulierten Genen des Klons A1<sup>NP</sup> zugeordnet werden konnten. Von den 248 Genen konnten 164 bekannten Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Mit 61 Genen sind die meisten dabei aus dem Bereich *cellular process*. Dieser Bereich beinhaltet Stoffwechselwege aus den Bereichen des Zellwachstums und Homöostase. Mit 32 Genen sind die zweit häufigsten Zellprozesse aus dem Bereich *metabolic process*. Hier sind Stoffwechselwege des Anabolismus und Katabolismus zusammengefasst. Weiter finden sich mit 29 Genen viele aus dem Bereich *localization*. Hier finden sich untergeordnete Stoffwechselwege des Proteintransportes innerhalb der Zelle. Der Bereich *biological regulation* ist mit 21 Genen ebenfalls höher repräsentiert. Auch hier finden sich viele Stoffwechselwege des allgemeinen Zellstoffwechsels. Abb. 21B zeigt die 180 Gene der insgesamt 248 signifikant hochregulierten Gene in B2<sup>P</sup>, die einem zellulären Prozess zugeordnet werden konnten. Interessanterweise ergibt sich hier ähnliches Bild, wie für A1<sup>NP</sup>. Der Bereich *cellular process* ist mit 60 Genen

## 4 Ergebnisse

ebenfalls am häufigsten vertreten, gefolgt von *metabolic process* mit 38 Genen. Auch die Bereiche *localization* und *biological regulation*, sind mit jeweils 21 und 27 Genen häufig vertreten. Von den 180 Genen sind 18 aus dem Bereich *response to stimulus*. Darunter fallen unter Anderem Stoffwechselwege, die als Reaktion auf chemische oder physikalische Reize angeregt werden.



**Abbildung 21: Kreisdiagramme der durch die signifikant hochregulierten Gene repräsentierten Stoffwechselwege der Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.**

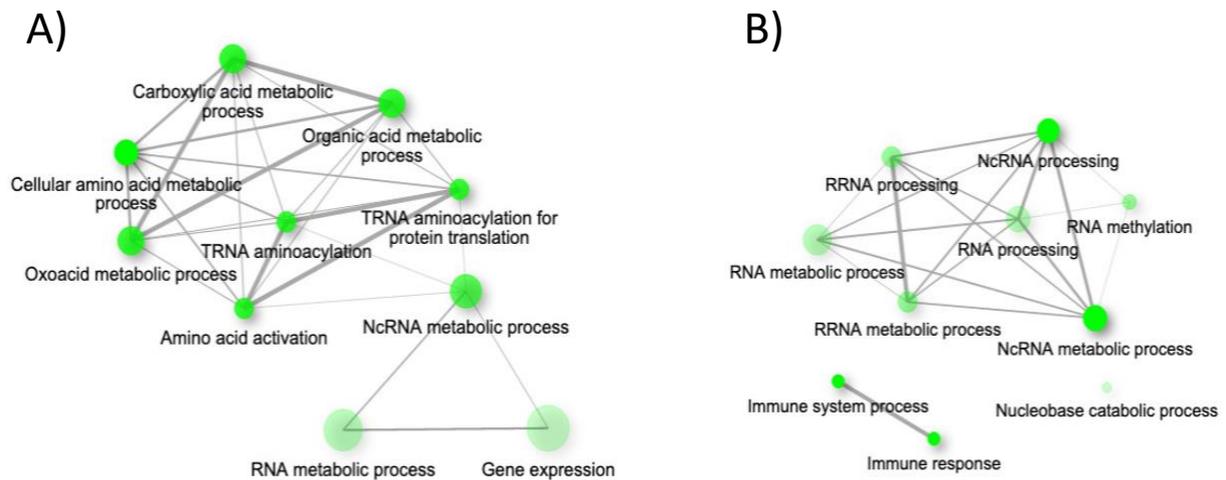
**A)** Kreisdiagramm der Stoffwechselwege des Klons A1<sup>np</sup>, die nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen hochreguliert sind. **B)** Kreisdiagramm der Stoffwechselwege des Klons B2<sup>p</sup>, die nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen hochreguliert sind.

Graphiken wurden erstellt nach Daten aus PANTHER, Mi *et al.*, 2021.

### 4.1.3.4.4 GO-Analyse der in den Trophozoiten signifikant runterregulierten Gene nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen

Nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen sind 254 Gene in A1<sup>np</sup> und 134 Gene in B2<sup>p</sup>, im Vergleich zu den Kontrollen signifikant runterreguliert. Abb. 22 zeigt die 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten Stoffwechselwege der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>. Abb. 22A zeigt das Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege des Klons A1<sup>np</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen. Dabei zählen RNA Stoffwechselwege (*NcrRNA metabolic process*, *TRNA aminoacylation for protein translation*) und Stoffwechselwege der Proteinbiosynthese (*amino acid activation*, *cellular amino acid metabolic process*) zu den signifikantesten. Das Netzwerk unter Abb. 22B zeigt die 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege des Klons B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen. Neben dem RNA Stoffwechsel (*NcrRNA processing*, *NcrRNA metabolic process*) sind noch Prozesse der Immunantwort (*immune system process*, *immune response*) am signifikantesten runterreguliert.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 22** GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 8 Stunden mit Organoidzellen inkubierten Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.

Jeder Punkt steht für einen Stoffwechselweg. Je größer der Punkt, desto mehr Gene beinhaltet der Stoffwechselweg. Je stärker die Färbung, desto signifikanter ist ein Stoffwechselweg repräsentiert. Punkte sind verbunden, wenn sie mindestens 20% der zu untersuchenden Gene teilen. Je mehr Gene von zwei Stoffwechselwegen geteilt werden, desto stärker ist die Verbindung. **A)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten von A1<sup>np</sup>, die über 8 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden. **B)** GO-Netzwerk der 10 am signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup>, die über 8 Stunden mit Organoidzellen inkubiert wurden. Graphik erstellt mit ShinyGO, Ge et al., 2020

### 4.1.3.5 Analyse der differentiell exprimierten Gene in A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

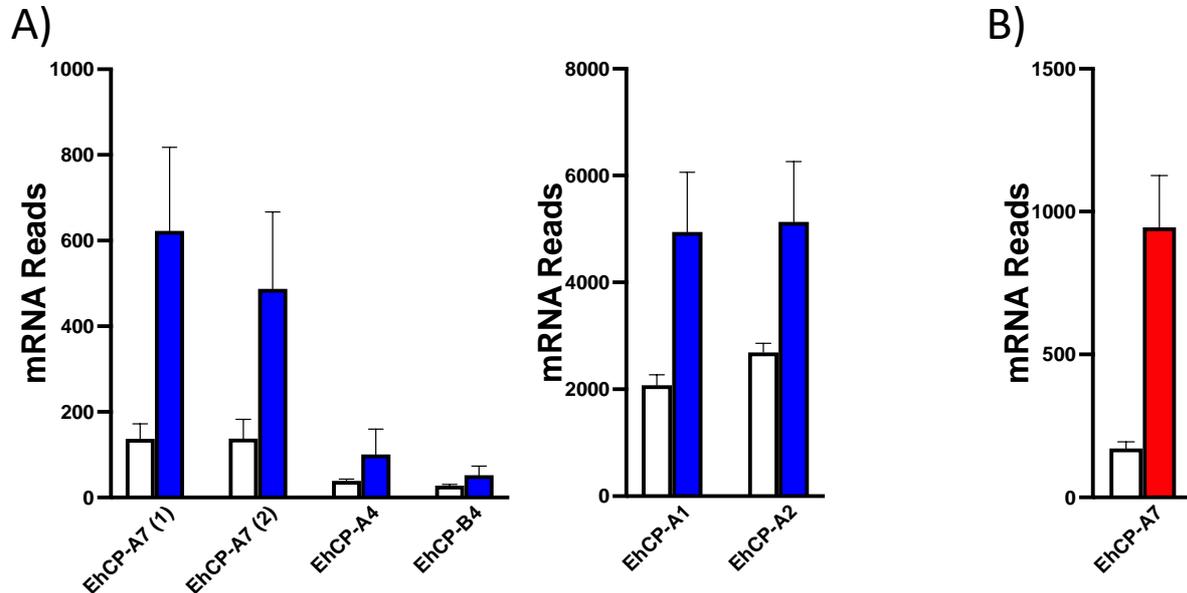
Um einen besseren Einblick in die unterschiedliche Genexpression der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, wenn diese zusammen mit den Organoidzellen inkubiert wurden, zu bekommen, wurden die differentiell exprimierten Gene genauer betrachtet. Dabei zeigt sich, dass in beiden Klonen Gene die für Cysteinproteasen codieren signifikant hochreguliert sind im Vergleich zu den Kontrollen. Interessanterweise finden sich unter den, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant runterregulierten Genen einige die für verschiedene Untereinheiten des Gal/GalNAc-Lektin codieren.

#### 4.1.3.5.1 Analyse der nach 4 Stunden Co-Inkubation differentiell exprimierten Gene in den Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

In der Abb. 23 sind die, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant hochregulierten Cysteinproteasen der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 4 Stunden Inkubation mit den Organoidzellen graphisch dargestellt. Gezeigt ist dabei ein Vergleich der mRNA *reads* zwischen den Kontrollen und der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>. Die beiden Diagramme unter Abb. 23A zeigen die Cysteinproteasen, die in dem Klon A1<sup>np</sup> (blaue Balken) nach 4 Stunden Inkubation mit den Organoidzellen, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken) signifikant hochreguliert waren. Dabei ist zu erkennen, dass insgesamt fünf Cysteinproteasen signifikant hochreguliert sind: EhCP-A7, EhCP-A4, EhCP-B4, EhCP-A1 und die EhCP-A2. Für die EhCP-A7 finden sich dabei zwei

## 4 Ergebnisse

sequenzidentische Gene (*ehi\_039610* und *ehi\_010850*). Nur ein Gen der 148 signifikant hochregulierten Gene des Klons B2<sup>P</sup> codiert für eine Cysteinprotease. In Abb. 23B sind die mRNA reads des Gens *ehi\_010850*, welches für die EhCP-A7 codiert, des Klons B2<sup>P</sup> (rote Balken) im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken) gezeigt.

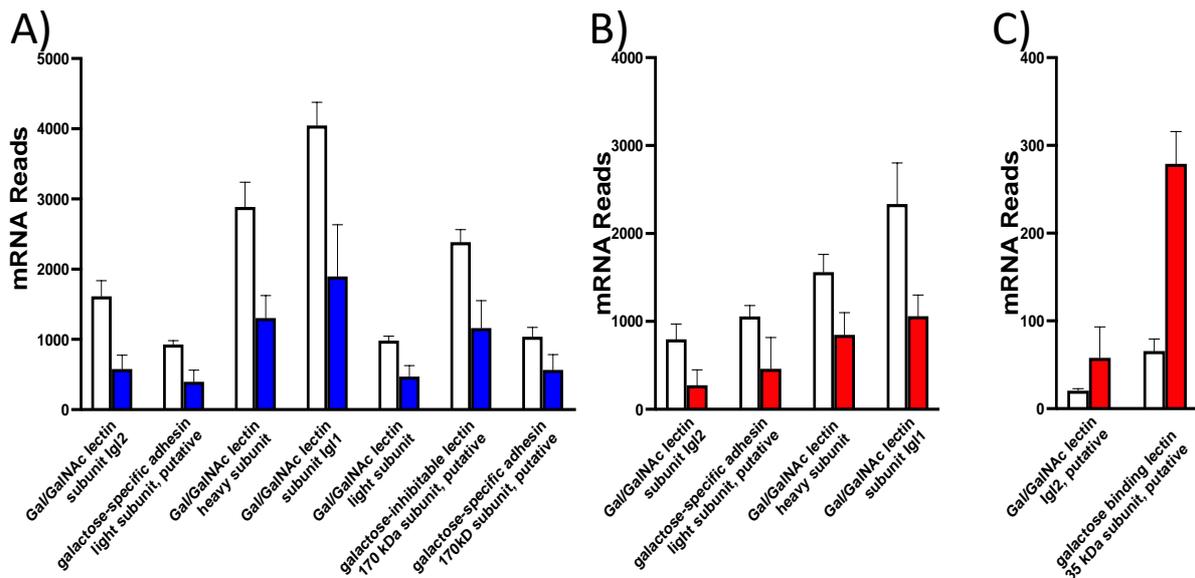


**Abbildung 23: Vergleiche der mRNA reads von signifikant hochregulierten Cysteinproteasengenen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. Padj-Wert: <0,05, FoldChange: >1,8. Angleichung der padj-Werte mit Holm Methode. **A)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken) signifikant hochregulierten Cysteinproteasen des Klons A1<sup>np</sup> (blaue Balken) **B)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken) signifikant hochregulierten Cysteinproteasen des Klons B2<sup>P</sup> (rote Balken).

In Abb. 24 sind die mRNA reads, der für Untereinheiten des Gal/GalNAc Lektin codierende Gene gezeigt, die in den differentiell exprimierten Genen der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup> zu finden sind, wenn diese über 4 Stunden mit Organoidzellen co-inkubiert wurden. Abb. 24A zeigt dabei die mRNA reads der 7 signifikant runterregulierten Lektinogene des Klons A1<sup>np</sup> (blaue Balken) im Vergleich zu der Kontrolle (weiße Balken). In Abb. 24B sind die mRNA reads der 4, in dem Klon B2<sup>P</sup> (rote Balken), signifikant runterregulierten Lektinogene, im Vergleich zu der Kontrolle (weiße Balken) dargestellt. Alle 4 Gene sind ebenfalls in dem Klon A1<sup>np</sup> signifikant runterreguliert. Interessanterweise finden sich in dem Klon B2<sup>P</sup> nach 4 Stunden Co-Inkubation mit den Organoidzellen auch 2 für das Gal/GalNAc Lektin codierende Gene unter den, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant hochregulierten Genen. Die mRNA reads der beiden Gene für den Klon B2<sup>P</sup> (rote Balken) und der Kontrolle (weiße Balken) sind in Abb. 24C dargestellt.

## 4 Ergebnisse



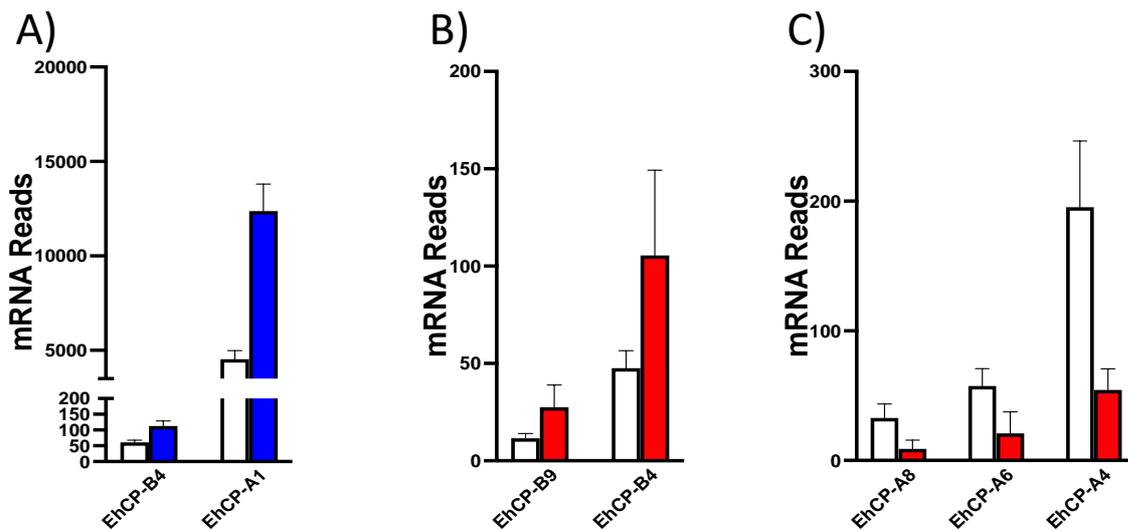
**Abbildung 24: Vergleiche der mRNA reads von signifikant hoch- und runterregulierten Lektinen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. Padj-Wert: <0,05, FoldChange: >1,8. Angleichung der padj-Werte mit Holm Methode. **A)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant runterregulierten Lektinengen des Klons A1<sup>np</sup> (blaue Balken). **B)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant runterregulierten Lektinengen des Klons B2<sup>p</sup> (rote Balken). **C)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant hochregulierten Lektinengen des Klons B2<sup>p</sup> (rote Balken).

### 4.1.3.5.2 Analyse der nach 8 Stunden Co-Inkubation differenziell exprimierten Gene in A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

Nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen finden sich bei den beiden Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> unter den differenziell exprimierten Genen ebenfalls welche, die für Cysteinproteasen und verschiedene Untereinheiten des Gal/GalNAc Lektin codieren. In Abb. 25 sind die mRNA reads der in den Klonen A1<sup>np</sup> (blaue Balken) und B2<sup>p</sup> (rote Balken), im Vergleich zu den Kontrollen (weiße Balken), nach 8 Stunden Co-Inkubation, signifikant hoch- und runterregulierten Cysteinproteasen gezeigt. Aus Abb. 25A ist zu erkennen, dass in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> die Cysteinproteasen EhCP-A1 und EhCP-B4 signifikant hochreguliert sind im Vergleich zu der Kontrolle. Diese beiden sind ebenfalls nach 4 Stunden der Co-Inkubation in dem Klon A1<sup>np</sup> hochreguliert. Abb. 25B zeigt die mRNA reads der beiden, nach 8 Stunden Co-Inkubation, signifikant hochregulierten Cysteinproteasen EhCP-B9 und EhCP-B4 des Klons B2<sup>p</sup>. In Abb. 25C sind die mRNA reads der 3 Cysteinproteasen EhCP-A4, EhCP-A6 und EhCP-A8 gezeigt, die in dem Klon B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen signifikant runterreguliert sind.

## 4 Ergebnisse

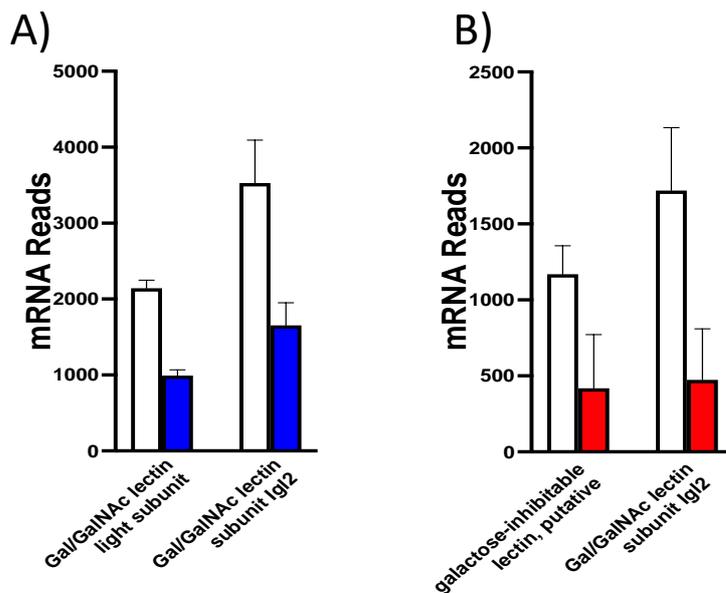


**Abbildung 25: Vergleiche der mRNA reads von signifikant hoch- und runterregulierten Cysteinproteasengen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. Padj-Wert: <0,05, FoldChange: >1,8. Angleichung der padj-Werte mit Holm Methode. **A)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant hochregulierten Cysteinproteasen des Klons A1<sup>np</sup> (blaue Balken). **B)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant hochregulierten Cysteinproteasen des Klons B2<sup>p</sup> (rote Balken). **C)** Vergleiche der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße balken), signifikant runterregulierte Cysteinproteasen des Klons B2<sup>p</sup> (rote balken).

In beiden Klonen finden sich nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen unter den signifikant runterregulierten Genen welche, die für Untereinheiten des Gal/GalNAc Lektin codieren. In Abb. 26 sind die mRNA reads der in den Klonen A1<sup>np</sup> (blaue Balken) und B2<sup>p</sup> (rote Balken), im Vergleich zu den Kontrollen (weiße Balken), nach 8 Stunden Co-Inkubation, signifikant runterregulierte Lektिंगene dargestellt. Abb. 26A zeigt die beiden Gene des Klons A1<sup>np</sup> im Vergleich zur Kontrolle. Beide sind ebenfalls nach 4 Stunden Co-Inkubation in dem Klon A1<sup>np</sup> signifikant runterreguliert. Abb. 26B zeigt die beiden signifikant runterregulierten Lektिंगene des Klons B2<sup>p</sup>. Das Gen *ehi\_065330*, codierend für Gal/GalNAc lectin subunit *Igl2*, ist ebenfalls nach 4 Stunden Co-Inkubation in dem Klon B2<sup>p</sup> signifikant runterreguliert

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 26: Vergleiche der mRNA reads von signifikant runterregulierten Lektinengen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. Padj-Wert: <0,05, FoldChange: >1,8. Angleichung der padj-Werte mit Holm Methode. **A)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant runterregulierten Lektinengen des Klons A1<sup>np</sup> (blaue Balken). **B)** Vergleich der mRNA reads von, im Vergleich zur Kontrolle (weiße Balken), signifikant runterregulierten Lektinengen des Klons B2<sup>p</sup> (rote Balken).

### 4.1.3.5 Vergleich zum Wildtyp

In einem weiteren Ansatz wurden die Transkriptome der Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>, die in dem Transwell-System ohne Organoidzellen für 4 Stunden inkubiert wurden, mit denen von normal kultivierten Trophozoiten der beiden Klone verglichen. Mit Hilfe dieses Vergleiches konnte so überprüft werden, ob die Trophozoiten eine veränderte Genexpression als Reaktion auf die Kultivierung in dem Transwell-System zeigen. In Tabelle 16 ist die Anzahl an differentiell exprimierten Genen in den Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> im Vergleich zu normal kultivierten Trophozoiten der beiden Linien gezeigt. Es zeigt sich, dass mit 738 bei A1<sup>np</sup> und 1005 bei B2<sup>p</sup> eine Vielzahl von Genen differentiell exprimiert werden. Während bei A1<sup>np</sup> mit 342 Genen ungefähr die Hälfte der 738 differentiell exprimierten Gene hoch- und mit 396 Genen die andere Hälfte runterreguliert sind, sind bei B2<sup>p</sup> mit 611 hoch- und 394 runterregulierten Genen ungefähr zwei Drittel der 1005 differentiell exprimierten Gene hoch- und ein Drittel runterreguliert.

**Tabelle 16:** Anzahl an differentiell exprimierten Genen der im Transwell-System inkubierten Trophozoiten von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> im Vergleich zum WT (padj<0,05, foldchange>1,8).

	Inkubation 4 h		
	Insgesamt	Hoch	Runter
A1 <sup>np</sup>	738	342	396
B2 <sup>p</sup>	1005	611	394

#### 4 Ergebnisse

Bei einer genaueren Betrachtung der differentiell exprimierten Gene zeigte sich, dass von den signifikant hochregulierten Genen eine Vielzahl für die klassischen Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* codieren. In Tabelle 17 sind die Gene, welche für Cysteinproteasen, Gal/GalNAc Lektine, *amoebapores* und die Metalloproteasen codieren, die in den, im Vergleich zu normal kultivierten Trophozoiten, signifikant hochregulierten Genen der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> zu finden sind, wenn diese über 4 Stunden im Transwell-System ohne Organoide inkubiert wurden. Dabei zeigt sich, dass in A1<sup>np</sup> 3 und in B2<sup>p</sup> 7 Cysteinproteasengene signifikant hochreguliert sind im Vergleich zu normal kultivierten Trophozoiten der beiden Klone. In A1<sup>np</sup> ist ein *amoebapores*-Gen und in B2<sup>p</sup> 2 Gene signifikant hochreguliert. Für Untereinheiten des Gal/GalNAc Lektin codierende Gene finden sich in A1<sup>np</sup> 3 und in B2<sup>p</sup> 5 Gene. Interessanterweise ist in A1<sup>np</sup> das Gen, welches für die Metalloprotease EhMP8-2 codiert ebenfalls signifikant hochreguliert, während in B2<sup>p</sup> das Gen für die Metalloprotease EhMP8-1 signifikant hochreguliert ist.

**Tabelle 17:** Signifikant hochregulierte Gene der klassischen Pathogenitätsfaktoren in den Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 4 Stunden Inkubation im Transwell-System

	A1 <sup>np</sup>		B2 <sup>p</sup>	
	Accession Nr.	Gename	Accession Nr.	Gename
<b>Cysteinproteasen</b>	EHI_074180	EhCP-A1	EHI_074180	EhCP-A1
	EHI_168240	EhCP-A5	EHI_050570	EhCP-A4
	EHI_006920	EhCP-C1	EHI_168240	EhCP-A5
			EHI_010850	EhCP-A7
			EHI_062480	EhCP-A10
			EHI_197490	EhCP-A11
			EHI_181230	EhCP-B9
<b>Amoebapores</b>	EHI_159480	Ameobapore A	EHI_159480	Ameobapore A
			EHI_159480	Ameobapore B
<b>Gal/GalNAc Lektin</b>	EHI_006980	Gal/GalNAc lectin subunit Ig1	EHI_027800	galactose binding lectin 35 kDa subunit, putative
	EHI_042370	galactose-specific adhesin 170kD subunit, putative	EHI_042370	galactose-specific adhesin 170kD subunit, putative
	EHI_065330	Gal/GalNAc lectin subunit Ig2	EHI_065330	Gal/GalNAc lectin subunit Ig2
			EHI_133900	galactose-inhibitable lectin 170 kDa subunit, putative
			EHI_006980	Gal/GalNAc lectin subunit Ig1
<b>MP8</b>	EHI_042870	EhMP8-2	EHI_200230	EhMP8-1

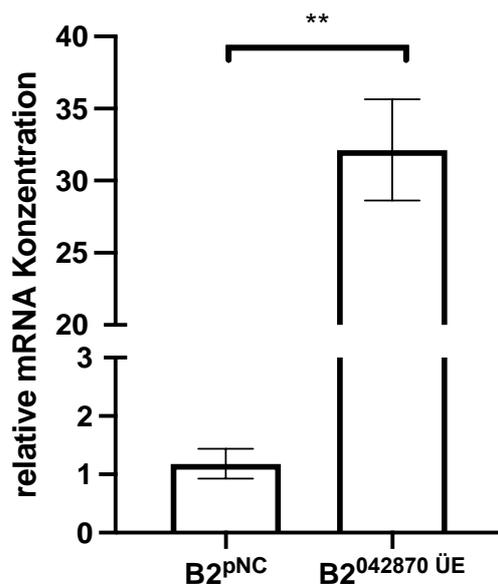
## 4.2 Charakterisierung der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2

Die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 von *E. histolytica* ähneln dem Leishmanolysin, einem wichtigen Pathogenitätsfaktor von *Leishmania major*. Im Weiteren konnte für EhMP8-2 ein negativer Effekt auf die Pathogenität der *E. histolytica* Trophozoiten gezeigt werden (Meyer *et al.*, 2016). Während die EhMP8-1 in den beiden Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> in gleichem Maße exprimiert wird, ist die EhMP8-2 ca. 150-fach stärker in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> exprimiert im Vergleich zum pathogenen Klon B2<sup>p</sup>. Daher standen für die nähere Charakterisierung der beiden Metalloproteasen verschiedene Transfektanten zur Verfügung in denen die Expression der Gene *ehi\_200230* (EhMP8-1) und *ehi\_042870* (EhMP8-2) entweder *gesilenced* oder überexprimiert war (Dissertation Lender, 2019). Für den nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> standen die *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>, A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup> zur Verfügung, in denen jeweils die Expression der EhMP8-1, der EhMP8-2 und beider Metalloproteasen gleichzeitig inhibiert ist. In dem *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> ist die Expression der EhMP8-1 inhibiert und in dem Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> die Expression der EhMP8-2 gesteigert. Als Kontrolle für den Überexprimierer wurde dem Klon B2<sup>p</sup> der Leervektor transfiziert. Dieser wird als B2<sup>pNC</sup> bezeichnet. Für die Charakterisierung der beiden Metalloproteasen wurden die Transfektanten im Hinblick auf verschiedene phänotypische Merkmale untersucht, die mit der Pathogenität assoziiert werden. Mit Hilfe von Transkriptomanalysen der Transfektanten sollten mögliche Einflüsse auf die Expression weiterer Gene gezeigt werden. Abschließend sollten die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 in den Trophozoiten lokalisiert werden.

### 4.2.1 Überprüfung von Überexpression und *silencing* der Gene *ehi\_200230* und *ehi\_042870* in den *E. histolytica* Transfektanten

Die verwendeten Transfektanten wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit generiert, sondern standen bereits zur Verfügung und befanden sich bereits länger in Kultur (Dissertation Lender, 2019). Um sicher zu gehen, dass die Gene, welche für die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 codieren, in den Trophozoiten der jeweiligen Transfektanten weiterhin überexprimiert oder *gesilenced* waren, wurden diese mittels qPCR bzw. NGS überprüft. Gezeigt sind die Ergebnisse der qPCR für den Überexprimierer des Klons B2<sup>p</sup>. Für die *silencer* der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sind die Ergebnisse der NGS gezeigt. In Abb. 27 ist die relative mRNA Konzentration, ermittelt durch die Delta-Delta-CT Methode, des Überexprimierers B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> im Vergleich zu der Kontrolle B2<sup>pNC</sup>, welcher nur den Leervektor transfiziert wurde, dargestellt. Zu erkennen ist, dass die relative mRNA Konzentration des Genes *ehi\_042870* in dem Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> 30-fach höher ist im Vergleich zu der, auf 1 nominierten, Kontrolle B2<sup>pNC</sup>. Durch die mehr als 3-fach erhöhte Expression entspricht die Transfektante somit der Definition eines Überexprimierers und konnten für weitere Versuche eingesetzt werden.

#### 4 Ergebnisse

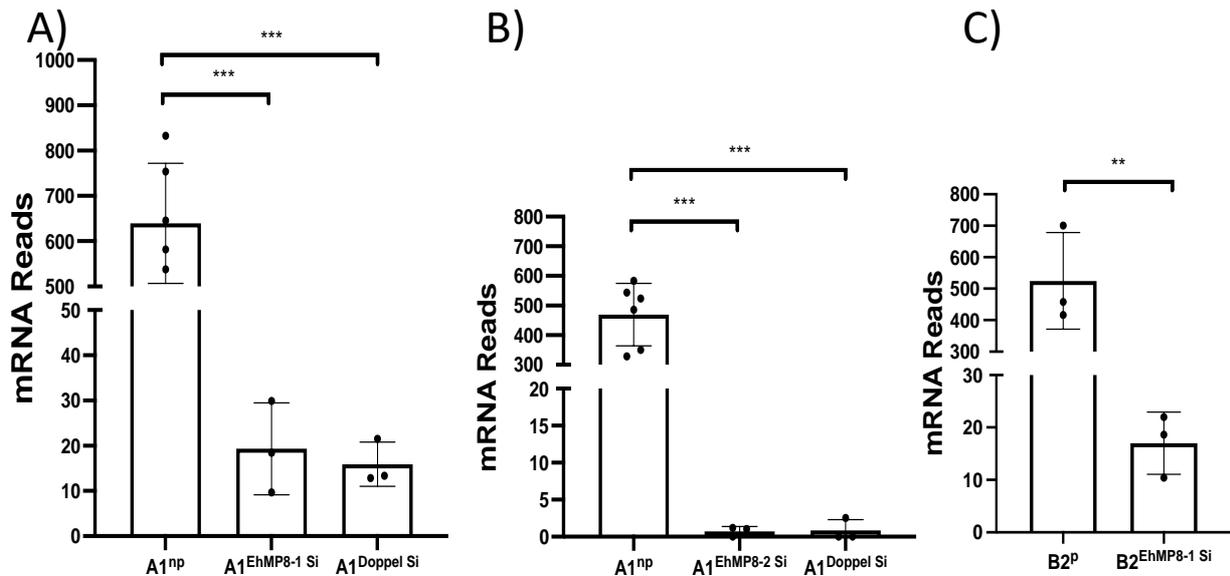


**Abbildung 27: Relative mRNA Konzentration des Genes *ehj\_042870* in dem Transfektanten B2<sup>EhMP8-2 UE</sup>.**

Aus den Trophozoiten der Transfektanten B2<sup>EhMP8-2 UE</sup> und B2<sup>pNC</sup> isolierte RNA wurde in der qPCR auf das Konzentrationslevel, der für die EhMP8-2 codierenden mRNA untersucht. Relative mRNA Konzentration wurde mittels der Delta-Delta-CT Methode bestimmt. Als Referenzgen diente  $\beta$ -actin. Die Kontrolle B2<sup>pNC</sup> wurde auf 1 normiert. B2<sup>EhMP8-2 UE</sup>: Klon B2<sup>p</sup> Überexprimierer der EhMP8-2; B2<sup>pNC</sup>: Klon B2<sup>p</sup> mit Leervektor (Mittelwert $\pm$ Standardfehler, n=2 im Doppelansatz, unpaired Student's t test, \*\*p $\leq$ 0,01).

In Abb. 28 sind die gelesenen Fragmente (*reads*) der für die Metalloproteasen codierenden mRNA in den einzelnen Transfektanten und Kontrollen gezeigt. Dieser Wert gibt Auskunft darüber, wie viele Treffer einer bestimmten mRNA Sequenz sich ergaben, wenn diese mit einem Referenzgenom verglichen wurde. Ein hoher Wert gibt dabei also an, dass eine größere Menge mRNA eines bestimmten Gens in der Ausgangsprobe vorlag. In Abb. 28A sind die *reads* des Genes *ehj\_200230* in den *silencing* Transfektanten A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup> im Vergleich zur der Kontrolle A1<sup>np</sup> dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant geringere Anzahl an *reads* für das Gen *ehj\_200230* in den beiden Transfektanten im Vergleich zum Klon A1<sup>np</sup>, wobei die Expression im Mittel um das 30-fache reduziert ist. In Abb. 28B sind die *reads* des Genes *ehj\_042870* der beiden nicht-pathogenen *silencing* Transfektanten im Vergleich zur Kontrolle A1<sup>np</sup> gezeigt. Dabei zeigt sich eine signifikant geringere Anzahl der *reads* in den Transfektanten im Vergleich zur Kontrolle. Im Mittel ist die Expression des Gens um das 450-fache reduziert im Vergleich zum Klon A1<sup>np</sup>. Das Abb. 28C zeigt die *reads* für das Gen *ehj\_200230* in dem Transfektanten B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>pNC</sup>. Auch hier ist eine signifikante Reduktion der *reads* für das Gen *ehj\_200230* in der Transfektante B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>pNC</sup> zu erkennen. Die Expression ist im Mittel um das 30-fache reduziert. Für alle Transfektanten zeigte sich somit eine stark reduzierte Expression der jeweiligen Metalloproteasegene im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Dabei lagen die einzelnen *reads* im Mittel bei weniger als 25, was für ein erfolgreiches *silencing* der Gene in allen Transfektanten spricht. Die Transfektanten konnten in weiteren Versuchen eingesetzt werden.

## 4 Ergebnisse



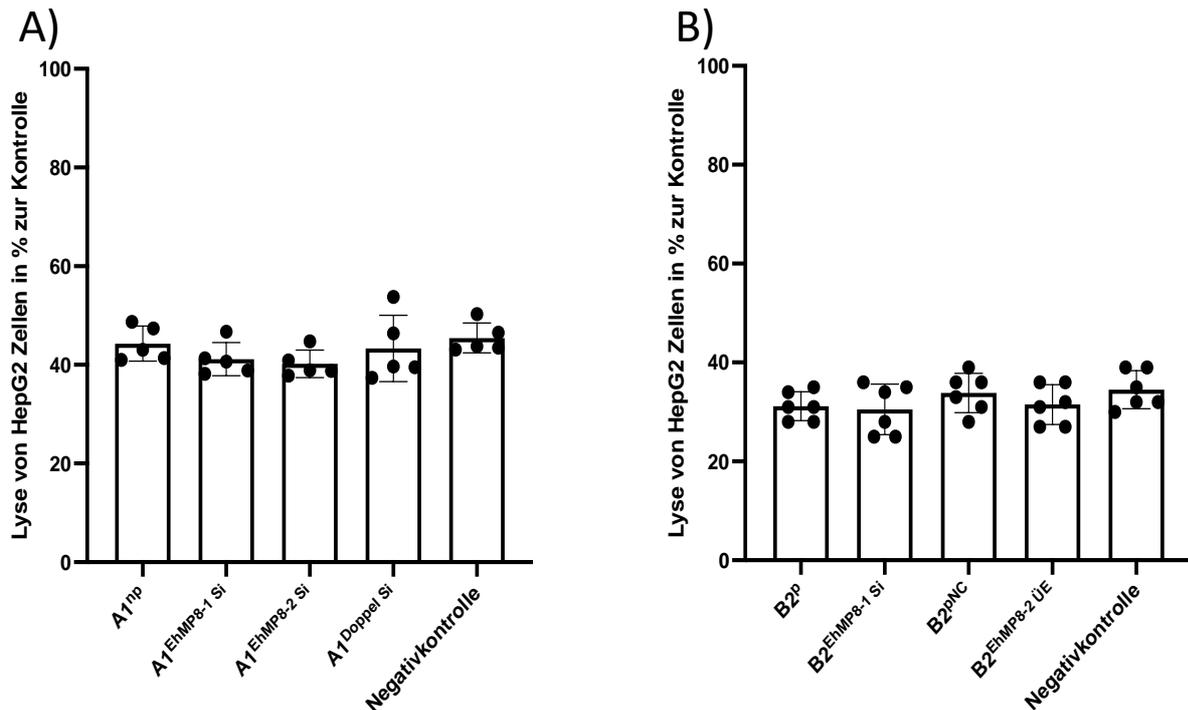
**Abbildung 28: Anzahl der mRNA reads der beiden Gene *ehi\_200230* und *ehi\_042870* in den Metalloprotease-Transfektanten und Kontrollen.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. **A):** mRNA reads des Gens *ehi\_200230* in dem Klon A1<sup>np</sup> und den beiden Metalloprotease-Transfektanten A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup>. **B)** mRNA reads des Gens *ehi\_042870* in dem Klon A1<sup>np</sup> und den beiden Metalloprotease-Transfektanten A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup>. **C):** mRNA reads des Gens *ehi\_200230* in dem Klon B2<sup>p</sup> und dem silencer B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>. A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> silencer der EhMP8-1; A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> silencer der EhMP8-2; A1<sup>Doppel Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> silencer der EhMP8-1 und EhMP8-2; B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon B2<sup>p</sup> silencer der EhMP8-1 (Mittelwert±Standardfehler, n=3-6, unpaired Student's t test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0.001)

### 4.2.2 Lyse von HepG2 Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten

Um einen Einfluss der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf die Fähigkeit der Trophozoiten Zellen zu lysieren zu untersuchen, wurden die Transfektanten zusammen mit fluoreszenzgefärbten HepG2 Zellen inkubiert und die Freisetzung des Farbstoffes im Überstand photometrisch gemessen. Dabei wurde der Mittelwert der Positivkontrolle, welche mit Triton X-100 behandelt wurde, als 100% definiert und die prozentuale lytische Aktivität der Transfektanten und der Negativkontrolle darauf berechnet. Aus der Abb. 29 geht hervor, dass die Transfektanten des Klones A1<sup>np</sup> (Abb. 29A) und des Klones B2<sup>p</sup> (Abb. 29B), sowie die jeweiligen Kontrollen die gleichen Werte wie die Negativkontrollen (Inkubation mit NaPBS anstatt Trophozoiten) zeigen. Somit zeigt sich, dass die Trophozoiten von *E. histolytica* in diesem Ansatz nicht in der Lage waren HepG2 Zellen zu lysieren und die veränderte Expression der Metalloproteasen keinen Einfluss darauf nimmt.

## 4 Ergebnisse



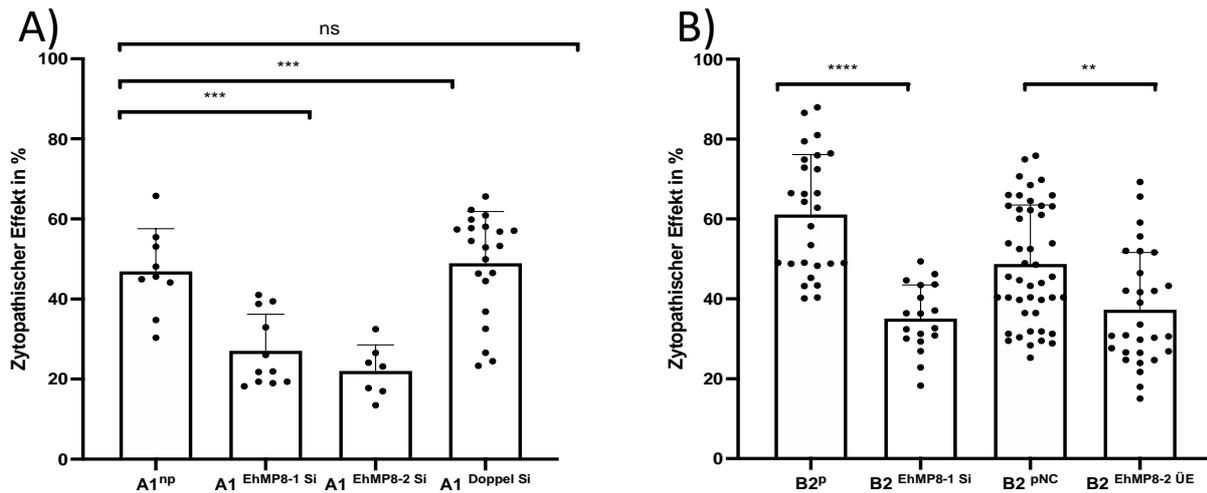
**Abbildung 29: Lytische Aktivität der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gegenüber HepG2 Zellen.**

Messung des durch Lyse freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffes CMFDA im Überstand in Prozent, bezogen auf die Kontrolle. Die Messung fand photometrisch bei 485/535 nm statt und die Werte wurden in Relation zu der, als 100% definierten, Kontrolle gesetzt. **A)** Klon A1<sup>np</sup> und Transfektanten des Klons A1<sup>np</sup>. **B)** Klon B2<sup>p</sup> und Transfektanten des Klons B2<sup>p</sup>. Negativkontrollen mit NaPBS anstatt Trophozoiten inkubiert. A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1; A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-2; A1<sup>Doppel Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1 und EhMP8-2; B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon B2<sup>p</sup> *silencer* der EhMP8-1; B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup>: Klon B2<sup>p</sup> Überexprimierer der EhMP8-2. (Mittelwert±Standardfehler, *unpaired Student's t test*)

### 4.2.3 Zytopathischer Effekt der *E. histolytica* Trophozoiten auf HepG2 Zellen

Um einen Einfluss der beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf den zytopathischen Effekt zu untersuchen, wurden die Transfektanten zusammen mit adhären, fluoreszenzgefärbten HepG2 Zellen inkubiert und anschließend der Farbstoffgehalt der verbleibenden, adhären HepG2 Zellen, durch Lyse dieser, bestimmt. Dabei wurden die Werte der Negativkontrollen gemittelt und als 100% gesetzt. Anschließend wurden die Messungen der Proben auf diese bezogen und von 100% subtrahiert, um so die prozentualen Werte der abgelösten HepG2 Zellen zu ermitteln. Der erhaltene Prozentwert wurde dann als zytopathischer Effekt der jeweiligen Trophozoiten auf die HepG2 Zellen definiert. Aus der Abb. 30A geht hervor, dass die beiden *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> eine signifikant geringere zytopathische Aktivität aufweisen, als die Kontrolle A1<sup>np</sup>. Interessanterweise zeigt der Doppel-*silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle A1<sup>np</sup>. Für die Transfektanten des Klones B2<sup>p</sup> (Abb. 30B) zeigt sich für den *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> ebenfalls ein signifikant geringerer zytopathischer Effekt im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>p</sup>. Auch der Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> zeigt einen signifikant geringeren zytopathischen Effekt auf die HepG2 Zellen im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>pNC</sup>.

## 4 Ergebnisse



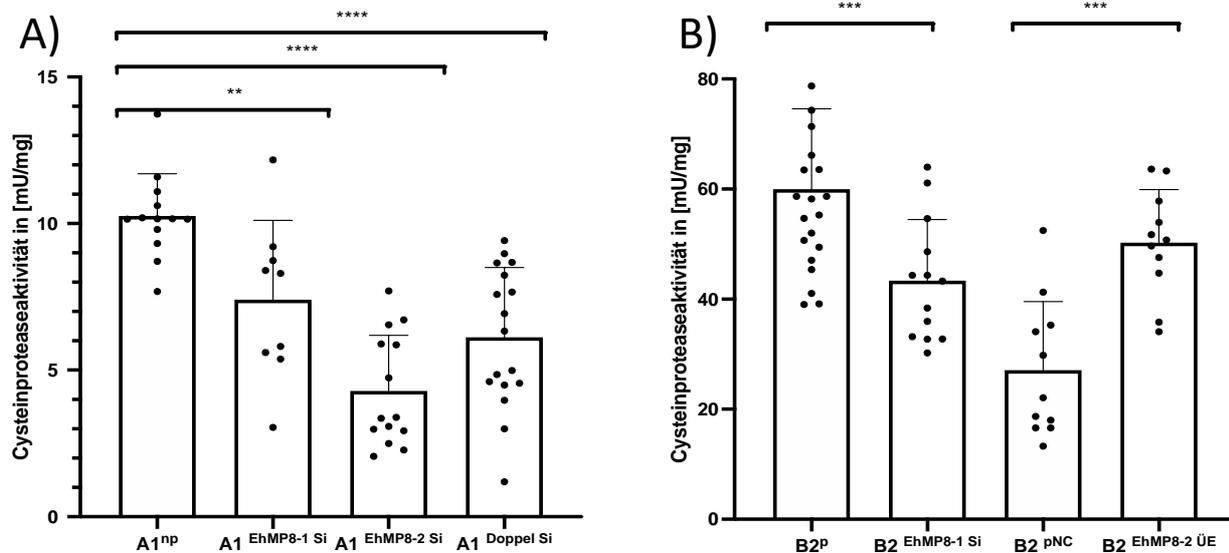
**Abbildung 30: Zytopathischer Effekt der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> auf HepG2 Zellen.**

Darstellung der durch die Trophozoiten abgelösten HepG2 Zellen (zytopathischer Effekt) in Prozent. Nach Inkubation mit den Trophozoiten wurden die verbleibenden, adhärenen HepG2 Zellen (markiert durch den Farbstoff BCECF, AM) lysiert und der freigesetzte Farbstoff BCECF AM im Überstand photometrisch bei 485/535 nm gemessen. Die Negativkontrolle wurde als 100% gesetzt und die gemessenen Werte darauf bezogen. Durch den Abzug der errechneten Werte von 100% wurde der prozentuale Teil der durch die Trophozoiten abgelösten Zellen ermittelt. **A)** Klon A1<sup>np</sup> und die Transfektanten des Klons A1<sup>np</sup> **B)** Klon B2<sup>p</sup> und die Transfektanten des Klons B2<sup>p</sup>. A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1; A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-2; A1<sup>Doppel Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1 und EhMP8-2; B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon B2<sup>p</sup> *silencer* der EhMP8-1; B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup>: Klon B2<sup>p</sup> Überexprimierer der EhMP8-2 (Mittelwert±Standardfehler, unpaired Student's t test, ns=p>0,05, \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001, \*\*\*\*p≤0,0001).

### 4.2.4 Cysteinproteaseaktivität der *E. histolytica* Trophozoiten

Um einen möglichen Einfluss der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 auf die Aktivität der Cysteinprotease zu ermitteln, wurden die Lysate der unterschiedlichen Transfektanten auf ihre Cysteinproteaseaktivität untersucht und mit ihren jeweiligen Kontrollen verglichen. Dabei wurde der Umsatz des Substrates Z-Arg-Arg pNA durch die in den Lysaten enthaltenen Cysteinproteasen photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Mit Hilfe des vorher bestimmten Proteingehaltes der gemessenen Proben konnte dann die spezifische Cysteinproteaseaktivität berechnet werden. In Abb. 31A ist zu erkennen, dass die drei Transfektanten A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>, A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup> alle eine signifikant geringere Cysteinproteasenaktivität zeigen, als die Kontrolle A1<sup>np</sup>. Der *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> zeigt hierbei die geringste Aktivität. Der *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> zeigt ebenfalls eine signifikant geringere Aktivität im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>p</sup>, während der Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> eine signifikant höhere Aktivität zeigt, als die Kontrolle B2<sup>pNC</sup> (Abb. 31B). Allgemein zeigt sich eine höhere Cysteinproteaseaktivität bei allen Proben des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> im Vergleich zu Proben des nicht-pathogenen Klones A1<sup>np</sup>.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 31: Cysteinproteaseaktivität der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> in mU/mg.**

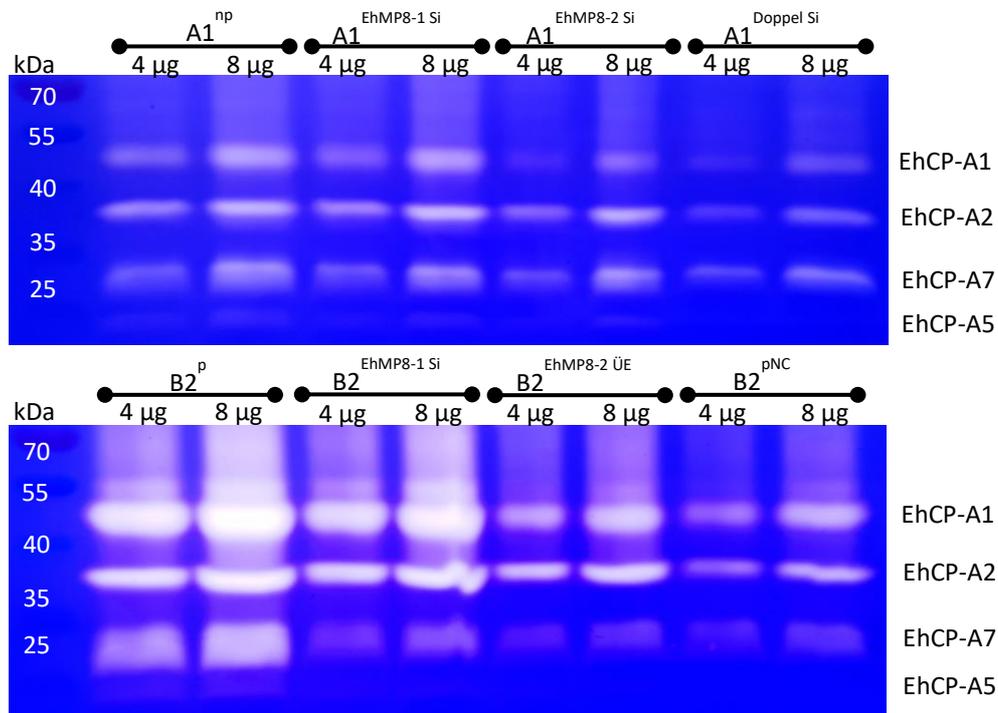
Der Umsatz von 100  $\mu$ M des Substrates Z-Arg-Arg pNA durch die Cysteinproteasen in den Lysaten wurde photometrisch über einen Zeitraum von 20 min bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Anschließend wurde die Volumenaktivität berechnet und mit Hilfe des vorher ermittelten Proteingehaltes der Proben die spezifische Aktivität in mU/mg ermittelt. **A)** Klon A1<sup>np</sup> und Transfektanten des Klons A1<sup>np</sup>. **B)** Klon B2<sup>p</sup> und Transfektanten des Klons B2<sup>p</sup>. A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1; A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-2; A1<sup>Doppel Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1 und EhMP8-2; B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon B2<sup>p</sup> *silencer* der EhMP8-1; B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup>: Klon B2<sup>p</sup> Überexprimierer der EhMP8-2. (Mittelwert $\pm$ Standardfehler, unpaired Student's t test, \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

### 4.2.5 Substratgelelektrophorese zum Nachweis einzelner Cysteinproteasen der *E. histolytica* Trophozoiten

Mit Hilfe der Substratgelelektrophorese sollte die Aktivität einzelner Cysteinproteasen in den Metalloprotease-Transfektanten visuell dargestellt und mit den jeweiligen Kontrollen verglichen werden, um einen möglichen Einfluss der Metalloproteasen auf diese zu ermitteln. Dabei wurden die in den jeweiligen Lysaten befindlichen Cysteinproteasen nach ihrer Größe aufgetrennt und verdauten anschließend die im Gel zugesetzte Gelatine. Diese Bereiche lassen sich dann nicht mit Coomassie anfärben. Die Stärke und Lage dieser Aktivitätsbanden geben Auskunft über die Aktivität und Art der Cysteinproteasen. Es lassen sich so die vier Cysteinproteasen EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5 und EhCP-A7 in den Lysaten unterscheiden. Mittels BCA Assay wurde vorher der Proteingehalt der Lysate ermittelt und es wurden pro Probe 4  $\mu$ g und 8  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt. In Abb. 32 sind die beiden Substratgele gezeigt, wobei der obere Teil die Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zeigt und der untere Teil die Transfektanten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup>. Dabei ist zu erkennen, dass die *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup> schwächere Aktivitätsbanden in den 4  $\mu$ g und 8  $\mu$ g Proben für alle Cysteinproteasen zeigen im Vergleich zur Kontrolle A1<sup>np</sup>. Zwischen dem *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und der Kontrolle A1<sup>np</sup> gibt es keine erkennbaren Unterschiede. Die Lysate der Transfektanten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup>, sowie des Klon B2<sup>p</sup> selbst, zeigen allgemein stärkere Aktivitätsbanden, als die Lysate der nicht-pathogenen Linie A. Der *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> zeigt deutlich schwächere Banden in den 4  $\mu$ g und 8  $\mu$ g Proben für die beiden Cysteinproteasen EhCP-A5 und EhCP-A7 im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>p</sup>. Der Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> zeigt in

## 4 Ergebnisse

den beiden 4  $\mu\text{g}$  und 8  $\mu\text{g}$  Proben stärkere Aktivitätsbanden der beiden Cysteinproteasen EhCP-A1 und EhCP-A2 im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>pNC</sup>. Die Lysate des Transfektanten B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> und der Kontrolle B2<sup>pNC</sup> zeigen für alle Cysteinproteasen schwächere Banden im Vergleich zu dem *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> und dem Klon B2<sup>p</sup>.



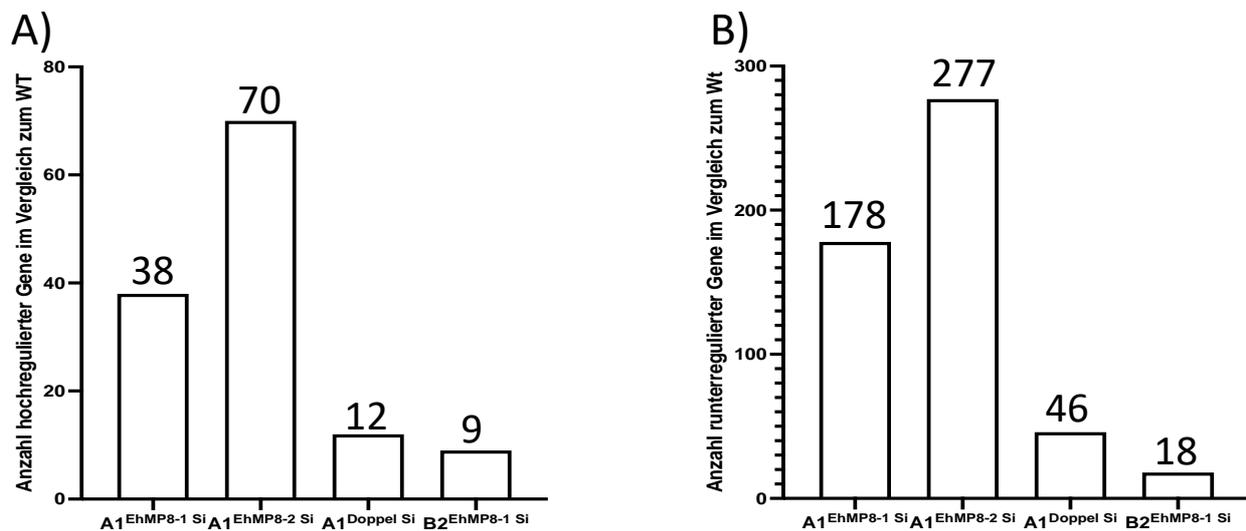
**Abbildung 32: Substratgele der Lysate der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.** 12% SDS Polyacrylamid Gele mit 0,1% Gelatine, gelaufen bei 25mA bei 4°C. Marker: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* von Thermo Fisher Scientific. Aufgetragen wurden pro Probe jeweils 20  $\mu\text{L}$  Lysate mit 4  $\mu\text{g}$  und 8  $\mu\text{g}$  Gesamtproteingehalt. **Oben:** Klon A1<sup>np</sup> und Transfektanten des Klons A1<sup>np</sup>. **Unten:** Klon B2<sup>p</sup> und Transfektanten des Klons B2<sup>p</sup>. A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1; A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-2; A1<sup>Doppel Si</sup>: Klon A1<sup>np</sup> *silencer* der EhMP8-1 und EhMP8-2; B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>: Klon B2<sup>p</sup> *silencer* der EhMP8-1; B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup>: Klon B2<sup>p</sup> Überexprimierer der EhMP8-2.

### 4.2.6 Analyse der Transkriptomdaten der Metalloprotease *silencer*

Durch die Charakterisierung der unterschiedlichen phänotypischen Merkmale der Metalloprotease-Transfektanten konnten Unterschiede in der Cysteinproteaseaktivität, dem zytopathischen Effekt und der Zerstörung des Organoidzellrasens im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen (A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>) gezeigt werden. Durch den Vergleich der Transkriptome der Transfektanten und den Wildtypen sollten mögliche Erklärungen für diese Unterschiede gefunden werden. Weiter konnte so überprüft werden, ob die Genexpression in den *silencern* erfolgreich gehemmt wurde (siehe 4.2.1) Bei der Analyse wurden nur die Metalloprotease *silencer* der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> untersucht. Es wurden nur Gene betrachtet, die einen *p*-Wert von  $<0,05$  aufwiesen und mindestens 1,8-fach höher bzw. niedriger im Vergleich zu den Wildtypen exprimiert wurden. In Abb. 33 ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene der *silencer* im Vergleich zu den Wildtypen graphisch dargestellt. Abb. 33A zeigt dabei die hochregulierten und Abb. 33B die runterregulierten Gene. Für alle *silencer* ist zu erkennen, dass wesentlich mehr Gene runter- als hochreguliert sind im Vergleich zu den Wildtypen. Der *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> zeigt die meisten differentiell exprimierten Gene, wobei 70 hoch- und 277 runterreguliert sind. Der *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> zeigt mit 38 hoch- und 178 runterregulierten

## 4 Ergebnisse

Genen ebenfalls eine größere Anzahl an differentiell exprimierten Genen. Interessanterweise sind in dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> mit 12 hoch- und 46 runterregulierten Genen wesentlich weniger Gene unterschiedlich exprimiert als in den beiden *silencern* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>, bei denen jeweils die Expression nur eines der für die Metalloproteasen codierenden Gens *gesilenced* ist. Die kleinste Anzahl an differentiell exprimierten Genen im Vergleich zu dem Wildtypen zeigt der *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Hier sind 9 hoch- und 18 runterreguliert im Vergleich zur Kontrolle B2<sup>P</sup>.

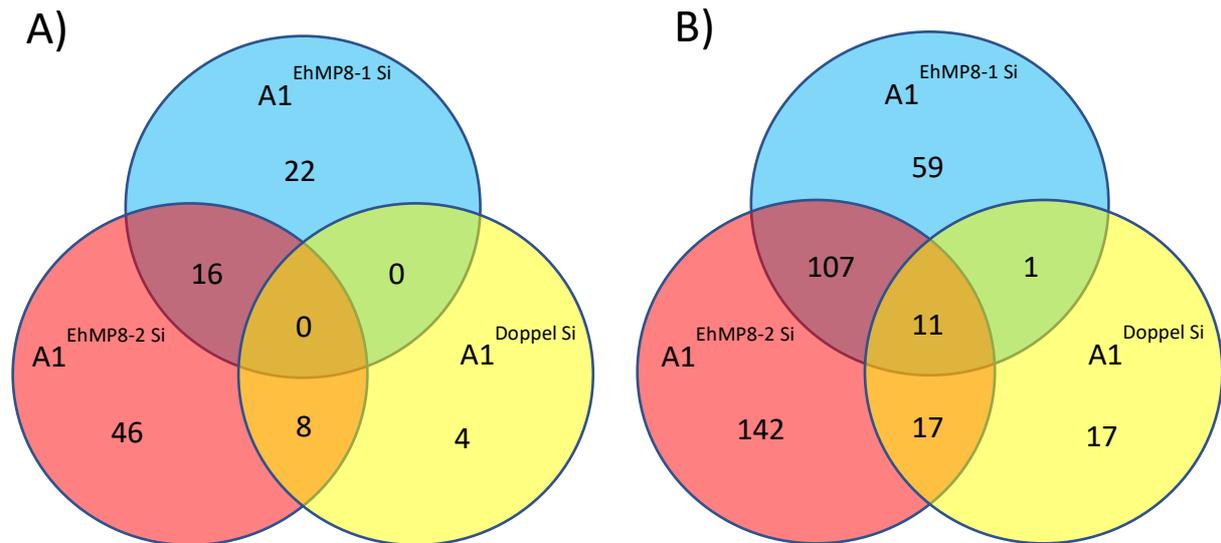


**Abbildung 33: Anzahl an differentiell exprimierten Genen in den Metalloprotease *silencern* im Vergleich zu den Wildtypen (WT) A1<sup>np</sup> und B2<sup>P</sup>.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. Padj-Wert: <0,05, FoldChange: >1,8.

Die erste Betrachtung der Transkriptome zeigt große Unterschiede in der Anzahl an differentiell exprimierten Genen zwischen den Metalloprotease *silencern* im Vergleich zu ihren Wildtypen. In Abb. 34 ist der Vergleich der Anzahl an differentiell exprimierten Genen in den drei untersuchten *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> durch ein Venn-Diagramm dargestellt. Jeder *silencer* ist dabei durch einen Kreis abgebildet. Die Zahl im Kreis steht für die Anzahl an Genen, die nur in dem jeweiligen *silencer* reguliert sind. Die Anzahl an Genen, die in zwei oder drei *silencern* gleich reguliert sind, stehen in den Überschneidungsbereichen der jeweiligen Kreise. Abb. 34A zeigt den Vergleich der hochregulierten Gene und Abb. 34B den Vergleich der runterregulierten Gene. Bei dem Vergleich der hochregulierten Gene ist zu erkennen, dass es keine Gene gibt, die in allen drei *silencern* gleich reguliert sind. Gleiches gilt für die *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup>. Die meisten der in dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> hochregulierten Gene sind ebenfalls in dem *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> reguliert. Zwischen den beiden *silencern* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> finden sich 16 Gene die gleichermaßen hochreguliert sind. Betrachtet man die runterregulierten Gene, zeigt sich, dass nur 11 Gene in allen drei *silencern* gleichermaßen reguliert sind. Mit 107 Genen sind zwischen den beiden *silencern* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> die meisten Gene gleichermaßen runterreguliert. Knapp zweidrittel der in dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> runterregulierten Gene sind ebenfalls in mindestens einem anderen *silencer* reguliert.

## 4 Ergebnisse

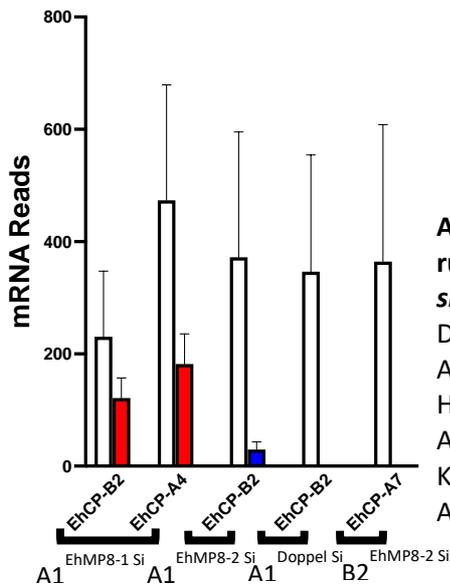


**Abbildung 34: Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene in den Metalloprotease *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup>.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB (Aurrecochea *et al.*, 2001). Padj-Wert: <0,05, *FoldChange*: >1,8. **A)** Vergleich der hochregulierten Gene der *silencer* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup>. **B)** Vergleich der runterregulierten Gene der *silencer* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup>.

Der Vergleich der Anzahl an differentiell exprimierten Genen bei den Metalloprotease *silencern* ergab, dass in dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> zwar die wenigsten Gene unterschiedlich reguliert sind, jedoch die meisten davon ebenfalls in mindestens einem der anderen *silencer* reguliert sind. Bei genauerer Betrachtung der Gene zeigt sich, dass ca. die Hälfte der in dem *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> runterregulierten Gene für Proteine aus der AIG1 Familie codieren. Weiter finden sich viele dieser Gene ebenfalls in mindestens einem der beiden anderen *silencer* reguliert. So codieren rund die Hälfte der in allen drei *silencern* runterregulierten Gene für Proteine aus dieser Familie. Da für die *silencer* eine geringere Cysteinproteaseaktivität im Vergleich zu den Wildtypen gezeigt werden konnte, wurden die Transkriptome auf Gene untersucht, die für Cysteinproteasen codieren. In Abb. 35 sind Gene, welche für Cysteinproteasen codieren und in den *silencern* signifikant runterreguliert sind graphisch dargestellt. Dabei ist ein Vergleich der mRNA *reads* der Wildtypen (weiße Balken) und der *silencer* (farbige Balken) abgebildet. Es zeigt sich, dass in allen drei *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> die Cysteinprotease EhCP-B2 signifikant runterreguliert ist im Vergleich zum Wildtyp A1<sup>np</sup>. Für den *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> zeigt sich das, im Vergleich zum Wildtyp B2<sup>p</sup>, die Cysteinprotease EhCP-A7 signifikant runterreguliert ist. In dem *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> ist zusätzlich die EhCP-A4 signifikant runterreguliert.

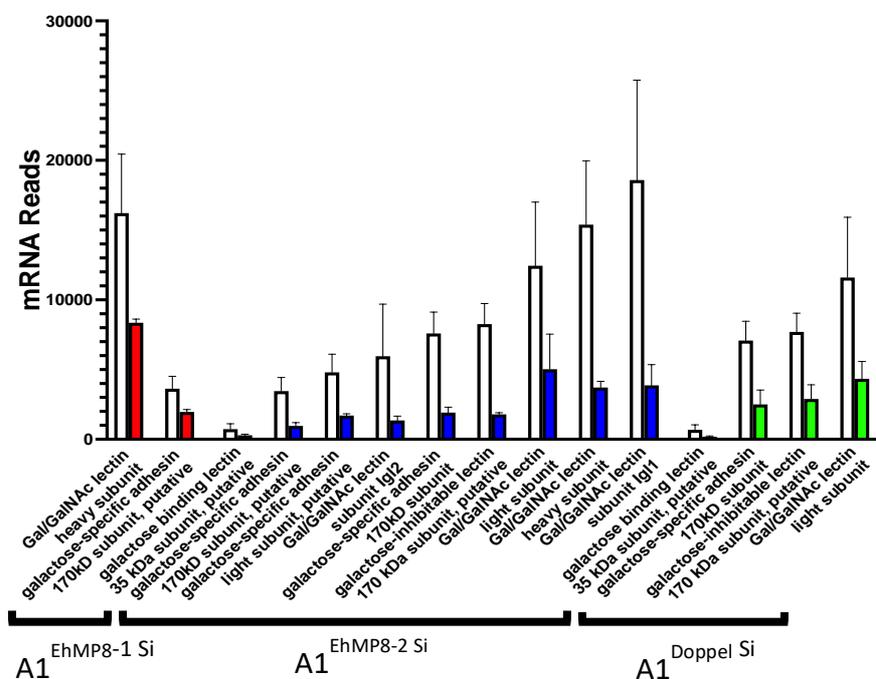
#### 4 Ergebnisse



**Abbildung 35: Vergleich der mRNA reads von signifikant runterregulierten Cysteinproteasengen der Metalloproteasen *silencer* im Vergleich zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. P-Wert: <0,05, *FoldChange*: >1,8. Angleichung der P-Werte mit Holm Methode. Weiße Balken: Kontrolle A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>. Rote Balken: A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Blaue Balken: A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>.

Durch eine weitere Betrachtung der runterregulierten Gene in den *silencern* zeigte sich, dass in den *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> einige Gene zu finden waren, die für verschiedene Untereinheiten des Gal/GalNAc-Lektins codieren. In Abb. 36 sind die Vergleiche der mRNA reads der Lektिंगene des Wildtyps A1<sup>np</sup> (weiße Balken) und den einzelnen *silencern* (farbige Balken) dargestellt. Zu erkennen ist, dass in dem *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> mit neun Genen die meisten für das Gal/GalNAc-Lektin codierenden Gene signifikant runterreguliert sind. Interessanterweise sind keine der regulierten Lektिंगene in allen drei *silencern* gemeinsam signifikant runterreguliert. Jedoch sind alle Lektिंगene, die in den *silencern* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup> signifikant runterreguliert sind auch in dem *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> signifikant runterreguliert.

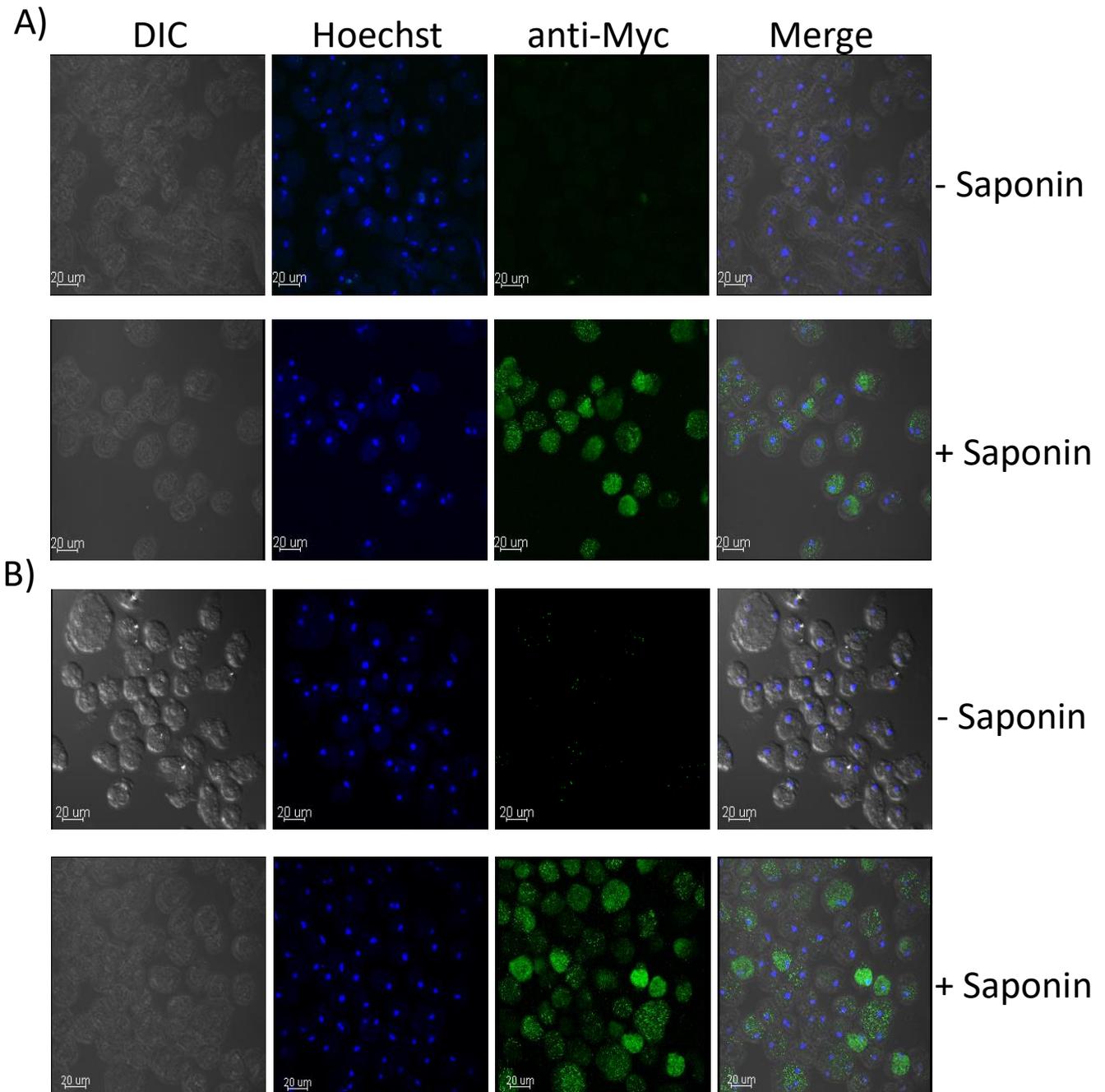


**Abbildung 36: Vergleich der mRNA reads von signifikant runterregulierten Gal/GalNAc-Lektin Untereinheiten der Metalloproteasensilencer im Vergleich zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.**

Daten aus der NGS Analyse wurden mit Trimmomatic getrimmt. Angleichung erfolgte mit RSEM und Bowtie2software. Grundlage: HM-1:IMMS von AmoebaDB. P-Wert: <0,05, *FoldChange*: >1,8. Angleichung der P-Werte mit Holm Methode. Weiße Balken: Kontrolle A1<sup>np</sup>. Rote Balken: A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Blaue Balken: A1<sup>EhMP8-2 Si</sup>. Grüne Balken: A1<sup>Doppel Si</sup>.

### 4.2.7 Lokalisation der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 in den *E. histolytica* Trophozoiten

Die beiden Metalloproteasen sollten mittels *Myc-tag* innerhalb der Trophozoiten lokalisiert werden. Dafür wurden mittels eines Expressionsplasmides die beiden Metalloproteasen in Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> überexprimiert, wobei an die Proteine zusätzlich ein *Myc-tag* fusioniert wurde. Dieser konnte dann mittels spezifischer Antikörper detektiert und mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie lokalisiert werden. Abb. 37 zeigt eine Übersicht von mehreren Trophozoiten der A1<sup>np</sup> Metalloprotease-*Myc*-Überexprimierer. Gezeigt sind dabei durchlichtmikroskopische Aufnahmen (DIC), Färbung der Zellkerne (Hoechst), Färbung des *Myc-tag* (anti-*Myc*) und eine Überlagerung der drei Bilder (Merge). Es wurden je zwei Ansätze durchgeführt. Der Ansatz mit Saponin (+ Saponin) ermöglicht eine Lokalisation im Zellinneren, da die Zellmembranen durch die Behandlung durchlässig gemacht wird. Die Ansätze ohne Saponin (- Saponin) ermöglichen eine Lokalisation an der Oberfläche. Abb. 37A zeigt die beiden Ansätze der Färbung des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-1 Myc ÜE</sup>. Dabei zeigt sich eine Färbung des Zellinneren durch den anti-*Myc* Antikörper, wenn diese mit Saponin behandelt wurden. Die Färbung tritt unterschiedlich stark in den Trophozoiten auf und zeigt eine punktförmige Verteilung. Die Ansätze ohne Saponin zeigen dagegen keine Färbung durch die anti-*Myc* Antikörper. In Abb. 37B sind die Aufnahmen der Färbung des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-2 Myc ÜE</sup> gezeigt. Auch hier zeigt sich eine punktförmige Lokalisation der EhMP8-2, die unterschiedlich stark in den Trophozoiten auftritt. Die Ansätze ohne Saponin zeigen keine Färbung durch die anti-*Myc* Antikörper.

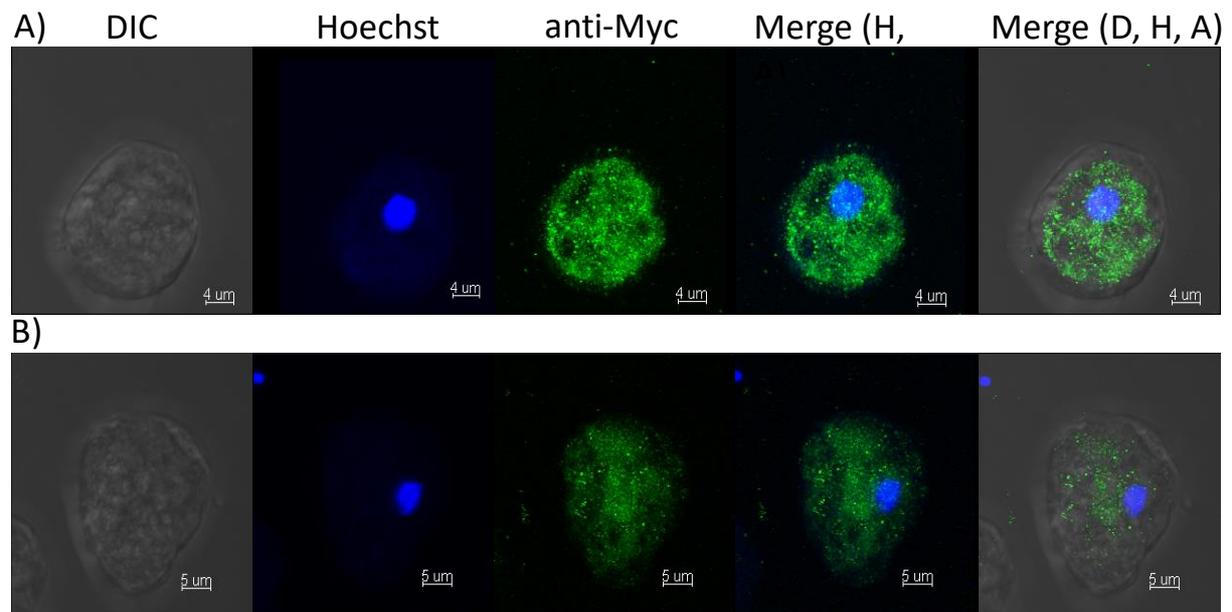


**Abbildung 37: Mikroskopische Analyse von Trophozoiten der Myc-Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 mittels anti-Myc Antikörper.**

Die Myc-Transfektanten wurden in zwei Fraktionen eingeteilt. Die Fraktion ohne Saponin (- Saponin) ermöglichte eine Färbung der Zelloberfläche, die Fraktion mit Saponin (+ Saponin) ermöglichte eine Färbung des Zellinneren. Gezeigt sind Durchlichtaufnahmen (DIC), Färbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (1:400), Färbung der EhMP8-1 und EhMP8-2 durch anti-Myc Antikörper (1:600) und eine Überlagerung der Aufnahmen (Merge). Die Bilder wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen und übereinandergelegt. **A)** Aufnahmen der Färbung von Trophozoiten des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-1 Myc UE</sup>. **B)** Aufnahmen der Färbung von Trophozoiten des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-2 Myc UE</sup>.

## 4 Ergebnisse

Die Übersichtsaufnahmen der Trophozoiten zeigen für die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 eine Lokalisation im Zellinneren. Daher wurden von einzelnen Trophozoiten der beiden Myc-Transfektanten mikroskopische Aufnahmen der Färbung durch anti-Myc Antikörper mittels eines Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen und die Aufnahmen übereinandergelagt. In Abb. 38 sind die Aufnahmen einzelner Trophozoiten der Myc-Transfektanten gezeigt. Dabei wurden durchlichtmikroskopische Aufnahmen (DIC), Aufnahmen der Färbung der Zellkerne (Hoechst), Aufnahmen der Färbung des Myc-tag (anti-Myc) und Überlagerung von Hoechst und anti-Myc (Merge H, A) sowie Überlagerung von Hoechst, anti-Myc und DIC (Merge D,H, A) angefertigt. In Abb. 38A sind die Aufnahmen der Färbung des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-1 Myc ÜE</sup> gezeigt. Es zeigt sich eine Lokalisation der EhMP8-1 im Zytoplasma, wobei eine spezifische punktförmige Färbung zu erkennen ist. Weiter gibt es ungefärbte Bereiche um Organellen, bei denen es sich wahrscheinlich um Vakuolen handelt. Die Plasmamembran weist keine Färbung auf. Abb. 38B zeigt die Aufnahmen der Färbung des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-2 Myc ÜE</sup>. Auch hier ist eine spezifische punktförmige Lokalisation der EhMP8-2 im Zytoplasma zu erkennen. Die Plasmamembran ist dabei ungefärbt und Signal-negative Bereiche im Zytoplasma deuten auf ungefärbte Vakuolen hin.

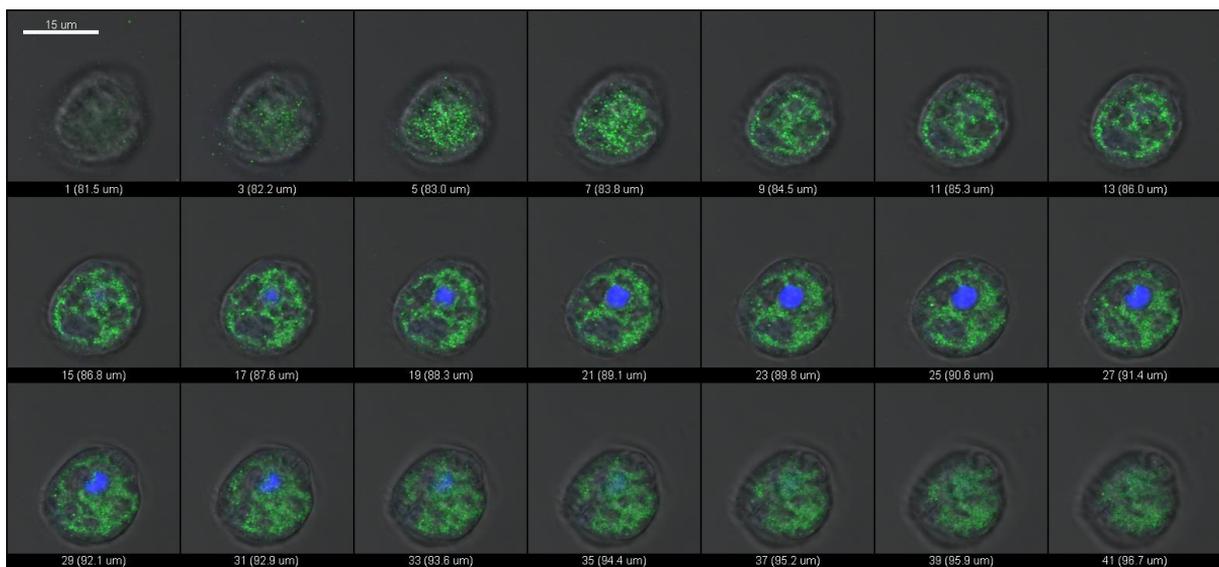


**Abbildung 38: Mikroskopische Analyse von Trophozoiten der Myc-Transfektanten des nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 mittels anti-Myc Antikörper.**

Gezeigt sind Durchlichtaufnahmen (DIC), Färbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (1:400), Färbung der EhMP8-1 und EhMP8-2 durch anti-Myc Antikörper (1:600) und eine Überlagerung der Aufnahmen (Merge). Die Membranen der Trophozoiten wurden durch Zugabe von Saponin durchlässig für die Antikörper gemacht. Die Bilder wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen und übereinandergelagt. **A)** Aufnahmen der Färbungen eines Trophozoiten des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-1 Myc ÜE</sup>. **B)** Aufnahmen der Färbungen eines Trophozoiten des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-2 Myc ÜE</sup>.

## 4 Ergebnisse

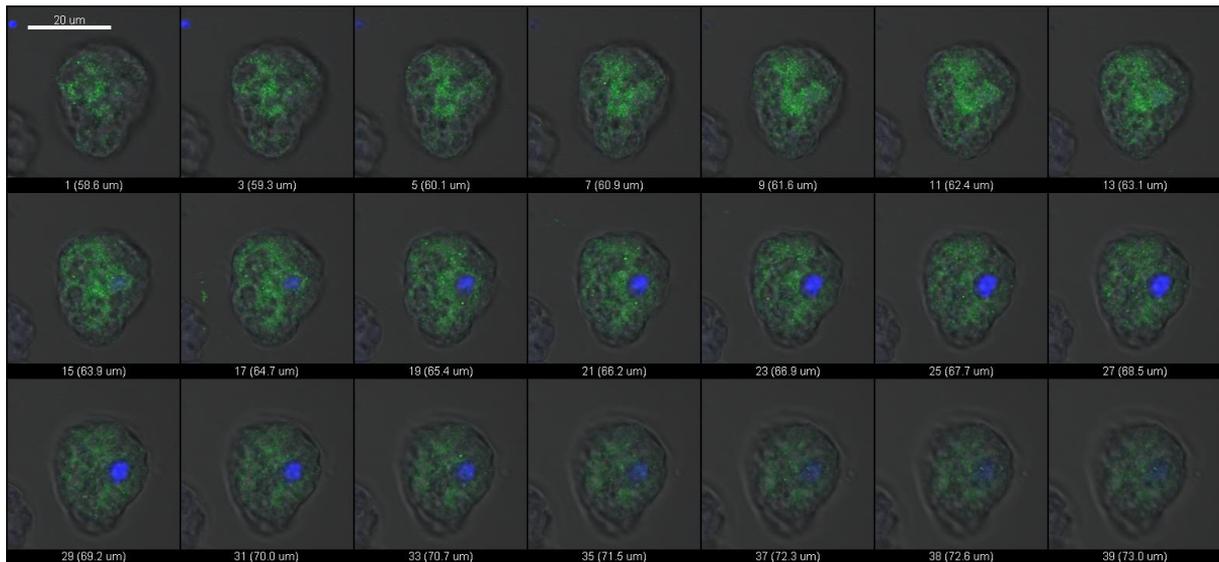
Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie konnten die mit dem Myc-tag fusionierten Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 im Zytoplasma der Trophozoiten nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Überlagerungen der Aufnahmen eine spezifische punktförmige Lokalisation, wobei bestimmte Bereiche nicht angefärbt werden konnten. Um eine genauere Lokalisation in den dreidimensionalen Zellen zu erhalten, können die einzelnen Bilder in einer Reihe betrachtet werden. Ein Bild zeigt dabei einen Schnitt durch die Trophozoiten mit einer Dicke von 0,38  $\mu\text{m}$ . Die Aufnahmen zeigen dabei eine Überlagerung der Färbung mit Hoechst, anti-Myc Antikörpern und den Durchlichtaufnahmen. In Abb. 39 sind die Bilder eines Trophozoiten des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-1 Myc ÜE</sup> gezeigt. Es wurden insgesamt 42 Bilder aufgenommen, wobei hier nur jedes zweite Bild der Reihe dargestellt ist. Anhand der ersten Aufnahmen der Reihe lässt sich erkennen, dass die Färbung erst beginnt, sobald man sich innerhalb der Zelle befindet. Eine Oberflächenfärbung ist nicht zu erkennen. Innerhalb der Zellen lassen sich spezifische punktförmige Lokalisationsmuster ausmachen. Klar zu erkennen sind nicht gefärbte Bereiche in Vakuolen und dem Zellkern. Es zeigt sich keine Färbung des Exoplasma. Abb. 40 zeigt die Bilder durch einen Trophozoiten des Überexprimierers A1<sup>EhMP8-2 Myc ÜE</sup>. Es wurden insgesamt 39 Bilder angefertigt, wobei auch hier nur jedes zweite dargestellt ist. Auch hier lässt sich die EhMP8-2 in spezifischen punktförmigen Mustern im Zytoplasma lokalisieren. Sowohl im Exoplasma, als auch auf der Zelloberfläche, in den Vakuolen und im Bereich des Zellkerns ist die EhMP8-2 nicht nachweisbar.



**Abbildung 39: Einzelbilder der konfokalen Mikroskopaufnahmen eines Trophozoiten des Myc-Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloprotease EhMP8-1 mittels anti-Myc Antikörper.**

Die Einzelbilder zeigen Schnitte durch die Trophozoiten mit einer Dicken von 0,38  $\mu\text{m}$ . Es wurden insgesamt 42 Bilder angefertigt, wobei hier nur jedes zweite abgebildet ist. Die einzelnen Bilder zeigen eine Überlagerung der Durchlichtaufnahmen, der Färbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (blau, 1:400) und der Färbung der EhMP8-1 durch anti-Myc Antikörper (grün, 1:600). Die Membranen der Trophozoiten wurden durch Zugabe von Saponin durchlässig für die Antikörper gemacht. Die Bilder wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen.

## 5 Diskussion



**Abbildung 40: Einzelbilder der konfokalen Mikroskopaufnahmen eines Trophozoiten des Myc-Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloprotease EhMP8-2 mittels anti-Myc Antikörper.**

Die Einzelbilder zeigen Schnitte durch die Trophozoiten mit einer Dicken von 0,38 µm. Es wurden insgesamt 39 Bilder angefertigt, wobei hier nur jedes zweite abgebildet ist. Die einzelnen Bilder zeigen eine Überlagerung der Durchlichtaufnahmen, der Färbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (blau, 1:400) und der Färbung der EhMP8-2 durch anti-Myc Antikörper (grün, 1:600). Die Membranen der Trophozoiten wurden durch Zugabe von Saponin durchlässig für die Antikörper gemacht. Die Bilder wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen.

## 5 Diskussion

*Entamoeba histolytica* zählt vor allem in tropischen und subtropischen Regionen mit schlechten hygienischen Standards zu einem wichtigen Humanparasiten. Im Jahr 2016 starben rund 26700 Menschen an den Folgen einer Infektion mit *E. histolytica* (Collaborators, 2018). Dabei verlaufen rund 90% der Infektionen asymptomatisch (Blessmann *et al.*, 2003). In 10% der Fälle kommt es zu einer invasiven, intestinalen Amöbiasis, bei der es zu einer massiven Zerstörung des Darmgewebes kommt und der Parasit über den Blutstrom weitere Organe befallen kann (Lucius & Loos-Frank, 2008). Die häufigste Form einer solchen extra-intestinalen Amöbiasis endet in der Leber mit der Bildung von Amöbenleberabszessen (ALA) (Stanley, 2003). Neben spezifischen Wirtsfaktoren wie Alter, Geschlecht und Immunantwort spielen auch Pathogenitätsfaktoren des Parasiten eine wichtige Rolle bei dem Krankheitsverlauf. Cysteinproteasen, *amoebapores* und Lektine sind bisher die am häufigsten beschriebenen und untersuchten Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* (Ralston & Petri, 2011).

Auch wenn schon einige Faktoren und Umstände, die eine invasive Verlaufsform der Amöbiasis begünstigen, beschrieben wurden, sind die Gründe und Mechanismen der Gewebeanvasion noch weitgehend ungeklärt. Die meisten der bisher aufgestellten Daten stammen von Versuchen an einfachen Zellkulturen (Martinez-Palomo *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1994; Leroy *et al.*, 2000; Lejeune *et al.*, 2011; Betanzos *et al.*, 2013). Erst in den letzten Jahren kamen komplexere dreidimensionale Modelle dazu, die aus verschiedenen Zelltypen bestehen und die *in vivo* Situation besser nachstellen können (Bansal *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2014; Aguilar-Rojas *et al.*, 2020). Viele dieser Modelle lassen sich jedoch schwer

reproduzieren oder in einem Labor implementieren. Dazu kommt, dass dabei oft Krebszelllinien verwendet werden, die sich durch einen veränderten Stoffwechsel auszeichnen und daher nicht den *in vivo* vorkommenden Wirtszellen entsprechen. Ein weiteres Problem stellen die, bei den Versuchen, unterschiedlich verwendeten Isolate und Zelllinien von *E. histolytica* dar. Oftmals unterscheiden sich die Isolate genetisch stark voneinander, was einen Vergleich der Ergebnisse erschwert.

Die Charakterisierung neuer Pathogenitätsfaktoren von *E. histolytica* stellt einen weiteren wichtigen Punkt zum besseren Verständnis der Gewebeinvasion dar. Ein wichtiges Mittel für die Identifizierung dieser Faktoren stellen vergleichende Transkriptomstudien von *E. histolytica* Isolaten und Zelllinien dar, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden (Biller *et al.*, 2009; Biller *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2016). Bei einer auf dem Isolat HM-1:IMSS beruhenden Studie, aus dem die nicht-pathogene Zelllinie A und die pathogene Zelllinie B generiert wurden, wurden die Transkriptome von, aus beiden Zelllinien hervorgegangenen Klonen, verglichen (Meyer *et al.*, 2016). Pathogenität beschreibt dabei die Fähigkeit der Trophozoiten nach intrahepatischer Injektion im Tiermodell (*Meriones unguiculatus* und *Mus musculus*) ALAs zu induzieren. Eines der am stärksten differentiell exprimierten Gene stellt dabei das Gen *ehi\_042870* dar, welches für die Metalloprotease EhMP8-2 codiert. Dieses Gen ist ca. 150-fach höher in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> im Vergleich zu dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> exprimiert. Wird das Gen in dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> künstlich überexprimiert führt dies zu einer signifikanten Abnahme der Pathogenität im Tiermodell (Meyer *et al.*, 2016). Das Ausschalten des Gens in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> führte zwar zu einer Steigerung der Pathogenität, diese war jedoch nicht signifikant (Matthiesen *et al.*, 2018). Neben der EhMP8-2 konnte noch eine weitere Metalloprotease, die EhMP8-1, in *E. histolytica* identifiziert werden. Diese ist in den beiden Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gleichermaßen exprimiert.

### 5.1 Gewebeinvasion von *E. histolytica* Trophozoiten anhand eines humanen 2D-Organoidmodells

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik von *in vitro* Untersuchungen der Gewebeinvasion von *E. histolytica* Trophozoiten, sollte in dieser Arbeit der Prozess anhand eines humanen, intestinalen 2D-Organoidmodells genauer betrachtet werden. Ein großer Vorteil besteht dabei darin, dass die verwendeten Zellen von humanen Stammzellen abstammen und durch die Differenzierung in die unterschiedlichen Zelltypen die *in vivo* Situation gut nachbilden. Ein weiterer Vorteil besteht in der Selbsterneuerung der Organoidzellen, sowie der einfachen Kultivierbarkeit. Dies erlaubt eine einfache Reproduktion der Versuche. Weiter wurde mit Klonen gearbeitet, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden (A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>), jedoch von demselben Isolat (HM-1:IMSS) abstammen. Zudem sollten verschiedene Transfektanten der beiden Klone, bei denen die Gene für die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 mittels RNAi-basiertem *silencing* ausgeschaltet wurden, in ihrer Fähigkeit der Gewebeinvasion in diesem Modell untersucht werden.

### 5.1.1 Gewebeinvasion von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> und Einfluss der Proteasen

Durch die TEER Messung von, mit Trophozoiten co-inkubierten, 2D-Organoidzellen, sollten erste Rückschlüsse auf die Gewebeinvasion von *E. histolytica* gezogen werden. Dazu wurden die 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> in unterschiedlicher Zellzahl für 8 Stunden co-inkubiert und in regelmäßigen Abständen der TEER gemessen (siehe 4.1.1.1). Es zeigte sich, dass der TEER bei allen Zellzahlen über die 8 Stunden rapide abfällt. Der Effekt ist umso größer, je mehr Trophozoiten auf die Organoidzellen gegeben werden. Während bei einer Zellzahl von 5000 und 10000 der TEER nach 4 Stunden auf <50% des Startwertes fällt, erreicht er nach 8 Stunden Inkubation mit 1000 Trophozoiten ca. 65% des Startwertes. Interessanterweise zeigt der Vergleich der einzelnen TEER Verläufe keine Unterschiede zwischen der Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> und dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup>. Die schnelle Abnahme des TEER verbunden mit der Schädigung von Zellen durch *E. histolytica* Trophozoiten wurde bereits an einfachen Zellkulturen gezeigt (Martinez-Palomo *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1994; Leroy *et al.*, 2000; Lejeune *et al.*, 2011; Betanzos *et al.*, 2013). Auch hier konnte eine korrelierende Beziehung zwischen der Abnahme des TEER und der eingesetzten Zellzahl der Trophozoiten gezeigt werden. Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Abnahme des TEER Wertes zwischen dem pathogenen Isolat HM-1:IMSS und dem nicht-pathogenen Isolat HK9 gezeigt werden (Martinez-Palomo *et al.*, 1985). Der Vergleich zu anderen intestinalen Parasiten wie *Toxoplasma gondii* und *Giardia duodenalis* zeigt, dass die Trophozoiten von *E. histolytica* viel schneller die Integrität der 2D-Organoidkulturen zerstören (Holthaus *et al.*, 2021). Dabei konnte gezeigt werden, dass *T. gondii* und *G. duodenalis* erst nach 48 Stunden der Co-Inkubation mit den Organoidzellen TEER Werte von <50% zum Startwert erreichten. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Abnahme des TEER keine signifikanten Unterschiede zwischen dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> und dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> aufweist, könnte das Fehlen einer intakten Mukusschicht oberhalb der 2D-Organoidkultur sein. Die Mukusschicht stellt die erste Barriere für die Trophozoiten von *E. histolytica* bei der Gewebeinvasion im Darm dar. Vor allem Cysteinproteasen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau dieser Schicht (Lidell *et al.*, 2006; Thibeaux *et al.*, 2013). Dabei konnte anhand eines humanen Kolon Explantates gezeigt werden, dass Trophozoiten des pathogenen Isolates HM-1:IMSS die Mukusschicht besser durchdringen können, als Trophozoiten des nicht-pathogenen Isolates Rahman (Thibeaux *et al.*, 2013). Weiter konnte für den Klon B2<sup>p</sup> eine signifikant höhere Cysteinproteaseaktivität im Vergleich zum Klon A1<sup>np</sup> nachgewiesen werden (Biller *et al.*, 2009). Eine intakte Mukusschicht könnte aufgrund der höheren Cysteinproteasenaktivität schneller durch Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> zersetzt werden, was eine schnellere Abnahme des TEER Wertes im Vergleich zu A1<sup>np</sup> zur Folge hätte.

Da Cysteinproteasen eine wichtige Rolle bei der Gewebeinvasion spielen, wurden Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> unter Zugabe des Cysteinproteaseninhibitors E64 mit Organoidzellen über 8 Stunden inkubiert und regelmäßig der TEER gemessen. Der Vergleich zu einer Co-Inkubation ohne E64 sollte einen möglichen Einfluss der Cysteinproteasen auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen zeigen (siehe 4.1.1.2). Dabei zeigte sich, dass die Abnahme des TEER bei Co-Inkubation mit dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> unter Zugabe von E64 signifikant geringer ist im Vergleich zu einer Co-Inkubation ohne E64. Interessanterweise zeigen sich bei einer Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> mit und ohne E64 keine signifikanten Unterschiede in der Abnahme des TEER zwischen den beiden Versuchsansätzen. Die geringere Abnahme des TEER deutet auf eine langsamere Zerstörung der 2D-Organoidkulturen durch die Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> hin, wenn die

Cysteinproteasen durch Zugabe von E64 gehemmt werden. Eine solch negativer Einfluss auf die Gewebeerstörung und Invasion durch die Hemmung von Cysteinproteasen konnte schon mehrfach gezeigt werden (Li *et al.*, 1995; Stanley *et al.*, 1995; Bracha *et al.*, 2006; Tillack *et al.*, 2006). Warum ein solcher Effekt bei A1<sup>np</sup> in diesem Versuch nicht gezeigt werden konnte bleibt jedoch fraglich. Da der Klon B2<sup>p</sup> nachweislich eine höhere Cysteinproteaseaktivität aufweist als der Klon A1<sup>np</sup>, könnte eine Hemmung der Cysteinproteasen einen stärkeren negativen Effekt auf die Gewebeerstörung von B2<sup>p</sup> im Vergleich zu A1<sup>np</sup> haben (Biller *et al.*, 2009). Möglicherweise spielen bei dem Klon A1<sup>np</sup> aufgrund seiner geringeren Cysteinproteaseaktivität andere Faktoren eine größere Rolle bei der Gewebeeinvasion und Zerstörung, wodurch die Hemmung der Cysteinproteasen keinen Effekt auf die Zerstörung des Zellrasens zeigt.

Um einen möglichen Einfluss der beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 von *E. histolytica* auf die Zerstörung der 2D-Organoidkulturen zu untersuchen, wurden die *silencer* zusammen mit den Organoidzellen für 8 Stunden co-inkubiert und regelmäßig der TEER gemessen. Der Vergleich zu den Wildtypen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sollte mögliche Unterschiede in der Abnahme des TEER zeigen. Zusätzlich wurden die Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> unter Zugabe des Metalloproteaseinhibitors Phenanthrolin mit Organoidzellen co-inkubiert. Die Ergebnisse zeigen für alle *silencer* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> sowie für den *silencer* des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> eine signifikant geringere Abnahme des TEER im Vergleich zu den Kontrollen (siehe 4.1.1.3). Die Hemmung der Metalloproteasen durch Phenanthrolin bewirkte ebenfalls eine signifikant geringere Abnahme des TEER in beiden Ansätzen. Für Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS in denen das Gen für die EhMP8-1 ausgeschaltet wurde, konnte eine signifikant geringere Zerstörung eines Zellrasens von CHO Zellen gezeigt werden im Vergleich zum Wildtyp (Teixeira *et al.*, 2012). Auch hier konnte durch Zugabe des Inhibitors Phenanthrolin zwar eine geringere Zerstörung gezeigt werden, jedoch war der Effekt ebenfalls geringer als bei dem *silencer*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *silencer* der Metalloproteasen ebenfalls einen signifikant geringeren zytopathischen Effekt auf HepG2 Zellen zeigen im Vergleich zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> (siehe 4.2.3). Für den *silencer* der EhMP8-1 konnte dazu eine signifikant höhere Adhärenz gezeigt werden, was eine mögliche Erklärung für die geringere Zerstörung von Zellen darstellen könnte (Teixeira *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass die erhöhte Adhärenz zu weniger Bewegung der Trophozoiten führt, wodurch sie den Zellrasen langsamer zerstören können. Im Weiteren konnte für die Klone bei dem die Expression der EhMP8-2 gehemmt wurde eine signifikant geringere Cysteinproteaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Dissertation Lender, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Effekt sowohl für die *silencer* der EhMP8-1 als auch für die *silencer* der EhMP8-2 gezeigt werden (siehe 4.2.4). Die geringere Cysteinproteaseaktivität der *silencer* könnte daher ein weiterer Grund für die geringere Abnahme des TEER Wertes im Vergleich zu den Kontrollen sein.

### 5.1.2 Analyse der Transkriptome von Organoidzellen und Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation

Durch die Analyse der Transkriptome der Organoidzellen sowie der Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation konnten Rückschlüsse auf die Genexpression gezogen werden. Der Vergleich zu den Kontrollen sollte so zum einen die Reaktion der Organoidzellen auf die Trophozoiten der beiden Klone zeigen und zum anderen die Reaktion der Trophozoiten beider Klone auf die Organoidzellen.

### 5.1.2.1 Analyse der Transkriptome der Organoidzellen nach Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

Die Analyse der Organoidtranskriptome konnte zwischen den mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen und den Kontrollen eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen zeigen (siehe 4.1.3.1). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte nach 2 Stunden Co-Inkubation von einem humanen, intestinalen 3D-Zellmodell mit Trophozoiten der Linie HM-1:IMSS ebenfalls eine größer Anzahl an differentiell exprimierten Genen in den Humanzellen gezeigt werden (Aguilar-Rojas *et al.*, 2020). Dabei wurde ein dreidimensionales Zellmodell bestehend aus HT29-MTX, Caco-2/TC7 und THP-1 Zellen verwendet. Zusätzlich wurde die extrazelluläre Struktur mit verschiedenen Kollagentypen modelliert und eine intakte Mukusschicht aufgebaut. Das Zellmodell wurde anschließend für 2 und 4 Stunden mit 80.000 Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS co-inkubiert. Danach erfolgte unter anderem eine Analyse der Humantranskriptome.

#### 5.1.2.1.1 Analyse der signifikant hochregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>

Um die Reaktion der Organoidzellen auf die Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> genauer zu untersuchen, wurden die, durch die signifikant hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege und Zellprozesse analysiert. Nach 4 Stunden der Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sind in den Organoidzellen vor allem Zellprozesse aus dem Bereich der Immunantwort und der zellulären Antwort auf Stimuli hochreguliert (siehe 4.1.3.2.1). Interessanterweise sind nach Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> wesentlich mehr Stoffwechselwege aus diesen Bereichen hochreguliert im Vergleich zu der Co-Inkubation mit B2<sup>p</sup>. Prozesse der zellulären Antwort auf Stimuli beinhalten vor allem Stoffwechselwege die als Antwort auf Stress angeschaltet werden und die Homöostase aufrechterhalten. Diese spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei einer Infektion mit intestinalen Parasiten (Galluzzi *et al.*, 2017). Da es als Reaktion auf eine Infektion zu einer erhöhten Produktion von Proteinen kommt, werden Stoffwechselwege aus diesem Bereich angeschaltet, um der erhöhten Anzahl an falsch gefalteten Proteinen entgegenzuwirken (Schröder & Kaufman, 2005). Stoffwechselwege aus diesem Bereich konnten ebenfalls in dem humanen 3D-Zellmodell, nach Co-Inkubation mit Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS, als signifikant hochreguliert in den humanen Zellen gezeigt werden (Aguilar-Rojas *et al.*, 2020). Schaut man sich die am signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege aus dem Bereich der Immunantwort an, zeigen sich nach 4 Stunden Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> vor allem Signalwege von Interleukinen und Zytokinen (siehe 4.1.3.2.1). Während der Interleukin-4 und -13 Stoffwechselweg bei beiden Ansätzen signifikant hochreguliert ist, findet sich bei einer Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> noch zusätzlich der Interleukin-10 Signalweg signifikant hochreguliert. Die Ausschüttung von Zytokinen durch intestinale Epithelzellen als Reaktion auf eine Infektion mit *E. histolytica* ist gut beschrieben (Gay *et al.*, 2007; Bansal *et al.*, 2009; Galván-Moroyoqui *et al.*, 2011). Interleukin-4 und -13 sind antiinflammatorische Zytokine, die eine Typ-2 Immunantwort auslösen (Allen & Maizels, 2011). Eine erhöhte Produktion von Interleukin-4 und -13 von Darmzellen, als Reaktion auf eine Infektion mit *E. histolytica* konnte bereits gezeigt werden (Guo *et al.*, 2008). Dabei scheinen sie eine wichtige Rolle bei der invasiven Form der Amöbiasis zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass eine gehemmte Expression von Interleukin-4 eine Infektion mit *E.*

*histolytica* lindern bzw. klären kann (Guo *et al.*, 2008). Da eine Typ-2 Immunantwort, ausgelöst durch eine Ausschüttung von Interleukin-4 und -13, die invasive Verlaufsform begünstigt, würde man diesen Stoffwechselweg bei einer Co-Inkubation mit dem pathogenen Klon B2<sup>P</sup> hochreguliert erwarten, was den Ergebnissen der Transkriptomanalysen entspricht. Interessant ist dabei, dass dieser ebenfalls bei einer Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>NP</sup> hochreguliert ist. Hier könnte das Fehlen einer intakten Mukusschicht in dem 2D-Organoidmodell eine mögliche Erklärung liefern. Es konnte gezeigt werden, dass Trophozoiten des nicht-pathogenen Isolates Rahman nicht in der Lage waren die Mukusschicht zu durchdringen (Thibeaux *et al.*, 2013). Durch das Vorhandensein einer Mukusschicht könnten Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>NP</sup> möglicherweise nicht durch diese vordringen, womit sie keinen direkten Kontakt zu den Epithelzellen hätten. Dies würde eine Hochregulation der Interleukin-4 und -13 Signalwege möglicherweise verhindern. Der Signalweg des Interleukin-10 findet sich nur in Organoidzellen hochreguliert, die über 4 Stunden mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>NP</sup> co-inkubiert wurden. Interleukin-10 gehört ebenfalls zu den antiinflammatorischen Zytokinen und reduziert die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen von intestinalen Epithelzellen, regt die Mukusbildung an und hat einen anti-apoptotischen Effekt auf die Epithelzellen (Roncarolo *et al.*, 2001; Schwerbrock *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005). Weiter spielt es eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegen die invasive Verlaufsform der Amöbiasis (Hamano *et al.*, 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass Mäuse, in denen der Interleukin-10 Signalweg ausgeschaltet wurde, eine invasive Verlaufsform der Amöbiasis entwickeln. Dies passt zu den hier beschriebenen Ergebnissen. Der Interleukin-10 Signalweg ist nur nach Kontakt mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>NP</sup> hochreguliert, während die Trophozoiten des pathogenen Klons B2<sup>P</sup> eine Ausschüttung von Interleukin-10 scheinbar nicht auslösen. Die stärkere Regulation von Stoffwechselwege des Immunsystems durch die Trophozoiten des Klons A1<sup>NP</sup> könnte eine mögliche Erklärung für den nicht-pathogenen Phänotyp sein. Die Trophozoiten scheinen eine stärkere Immunantwort auszulösen, was eine aggressivere Reaktion des Wirtes auf die Trophozoiten zur Folge haben könnte. Dazu konnte gezeigt werden, dass Trophozoiten der nicht-pathogenen Linie A, sowie der Klon A1<sup>NP</sup> im speziellen, nur sehr kleinen Abszess im Tiermodell auslösen können, die schnell wieder verheilen (Biller *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2016). Auch hier könnte eine stärkere Immunantwort auf die Trophozoiten eine Erklärung für den nicht-pathogenen Phänotyp sein. Nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> zeigt sich zusätzlich noch der Bereich extrazelluläre Matrix-Organisation hochreguliert (siehe 4.1.3.2.3). Hier finden sich vor allem Stoffwechselwege die als Reaktion auf die Zerstörung der extrazellulären Matrix angeschaltet werden. Trophozoiten von *E. histolytica* reagieren auf den Kontakt mit Proteinen der extrazellulären Matrix und fangen an diese zu zerstören (Franco *et al.*, 1997; Talamas-Rohana & Rios, 2000). Während Prozesse der zellulären Antwort auf Stimuli nach 8 Stunden Co-Inkubation mit A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> nicht mehr hochreguliert sind, gehören Prozesse der Immunantwort weiterhin zu den signifikant hochregulierten. Allerdings zeigt sich dabei kein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen in der Menge der regulierten Stoffwechselwege aus diesem Bereich. Somit scheint die stärkere Immunantwort auf die nicht-pathogene Linie A vor allem in der frühen Phase der Infektion eine Rolle zu spielen. Schaut man sich die signifikantesten hochregulierten Stoffwechselwege nach 8 Stunden Co-Inkubation mit A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> an, erkennt man, dass weiterhin Signalwege von Zytokinen, wie der Interleukin-4 und -13 Signalweg dazu zählen (siehe 4.1.3.2.3). Bei 8 Stunden Co-Inkubation mit dem Klon A1<sup>NP</sup> zeigen sich dazu verschiedene Toll-like Rezeptor Kaskaden hochreguliert, während bei Co-Inkubation mit B2<sup>P</sup> nur die Toll-like Rezeptor 7/8 Kaskade hochreguliert ist. Toll-like Rezeptoren spielen eine

wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und der darauf veränderten Genexpression als Reaktion auf diese sowie bei der Regulation der adaptiven Immunantwort (Janeway, 2001; Underhill & Ozinsky, 2002; Caramalho *et al.*, 2003). Für *E. histolytica* konnte gezeigt werden, dass das Lipopeptidophosphoglycan der Trophozoiten durch die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 gebunden wird und zu einer Ausschüttung von Interleukin-10 führt (Maldonado *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2005). Die Toll-like Rezeptor 4 Kaskade findet sich bei 8 Stunden der Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> hochreguliert, jedoch nicht bei Co-Inkubation mit B2<sup>p</sup>. Die Aktivierung der Toll-like Rezeptor 4 Kaskade durch die Trophozoiten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> könnte einen weiteren Grund für den nicht-pathogenen Phänotyp liefern. Die Aktivierung führt zu einer Ausschüttung von Interleukin-10, was durch seine antiinflammatorische Wirkung eine Resistenz gegen die invasive Verlaufsform der Amöbiasis hervorruft (Hamano *et al.*, 2006). Bei Untersuchungen von pathogenen und nicht-pathogenen Klonen des Isolats HM-1:IMSS konnte gezeigt werden, dass das Lipopeptidophosphoglycan Unterschiede zwischen den beiden Klonen zeigt (Isibasi *et al.*, 1990). Möglicherweise besteht auch zwischen den Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> ein Unterschied in der Struktur des Lipopeptidophosphoglycan, was dazu führt, dass die Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> vom Toll-like Rezeptor 4 erkannt werden und es somit zu einer antiinflammatorischen Reaktion kommt, wogegen der B2<sup>p</sup> nicht erkannt wird. In einer weiteren Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Lipopeptidophosphoglycan bei der Aktivierung von natürlichen Killerzellen eine wichtige Rolle spielt und eine reduzierte Abszessbildung im Tiermodell zur Folge hat, wenn die Mäuse vorab mit diesem immunisiert wurden (Lotter *et al.*, 2009).

### **5.1.2.1.2 Analyse der signifikant runterregulierten Stoffwechselwege der Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>**

Im Weiteren wurden die signifikant runterregulierten Zellprozesse und Stoffwechselwege der Organoidzellen betrachtet, wenn diese zusammen mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> Co-Inkubiert wurden. Dabei zeigt sich, dass nach 4 Stunden Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> vor allem Prozesse aus dem Zellstoffwechsel runterreguliert sind (siehe 4.1.3.2.2). Darunter sind Stoffwechselwege zur Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus zusammengefasst. Betrachtet man die signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege, finden sich bei beiden Ansätzen Stoffwechselwege aus dem Bereich der biologischen Oxidation runterreguliert (siehe 4.1.3.2.2). Bei Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> sind zusätzlich noch Stoffwechselwege des Fettsäuremetabolismus am signifikantesten runterreguliert. Der Bereich der biologischen Oxidation beinhaltet eine Reihe von Prozessen, die die Löslichkeit und Ausscheidung von zellfremden Substanzen verbessern (Oesch & Arand, 1999). Eine Folge der Runterregulation wäre daher die Anhäufung von, möglicherweise toxischen, zellfremden Substanzen innerhalb der Zellen, was zum Tod der Zelle führen würde. Ein solch negativer Effekt auf den Zellstoffwechsel von human Zellen durch Trophozoiten von *E. histolytica*, konnte ebenfalls anhand des bereits genannten 3D-Zellmodells gezeigt werden (Aguilar-Rojas *et al.*, 2020). Dabei sind auch die Runterregulation von Prozessen des Fettsäurestoffwechsel, sowie das Fehlen von, dafür relevanten, Proteinen, nach der Co-Inkubation beschrieben. Nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sind neben den Prozessen des Zellstoffwechsels noch Prozesse aus dem RNA-Stoffwechsel, der Proteinbiosynthese, der Zelldifferenzierung und der Antwort auf Stimuli runterreguliert. Dabei ist interessant, dass nach Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> wesentlich mehr Stoffwechselwege dieser Prozesse signifikant runterreguliert sind. Schaut man auf die

signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege, zeigen sich bei beiden Ansätzen vor allem Stoffwechselwege aus dem RNA-Stoffwechsel runterreguliert (siehe 4.1.3.2.4). Es scheint, als würden die Trophozoiten durch die Runterregulation dieser Prozesse und Stoffwechselwege die natürliche Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels der Humanzellen stören, was den Tod der Zellen zur Folge hat. Warum nach 8 Stunden Co-Inkubation mit dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> mehr Stoffwechselwege aus diesen Bereichen runterreguliert sind bleibt jedoch fraglich.

### 5.1.2.2 Analyse der Transkriptome von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit Organoidzellen

Die Analyse der Transkriptome von den Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit den Organoidzellen konnte eine größere Anzahl an, im Vergleich zu den Kontrollen, differentiell exprimierten Genen zeigen (siehe 4.1.3.3). Bei vergleichbaren Transkriptomanalysen anhand von humanen Kolon Explantaten, zeigte sich nach einer Stunde der Co-Inkubation ebenfalls eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen in Trophozoiten der Isolate HM-1:IMSS und Rahman im Vergleich zu normal kultivierten Trophozoiten (Thibeaux *et al.*, 2013). Bei diesem Modell wurde Gewebe von humanen Dickdarmbiopsien isoliert und mit  $1,6 \times 10^5$  Trophozoiten des pathogenen Isolates HM-1:IMSS und des nicht-pathogenen Isolates Rahman jeweils für eine Stunde co-inkubiert. Anschließend erfolgte der Vergleich der Transkriptome zu normal kultivierten Trophozoiten der beiden Isolate.

#### 5.1.2.2.1 Analyse der signifikant hochregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit Organoidzellen

Um möglicher Unterschiede in der Genexpression zwischen dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> und dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> zu analysieren, wenn diese zusammen mit Organoidzellen co-inkubiert wurden, wurden die, durch die signifikant hochregulierten Gene überrepräsentierten Stoffwechselwege genauer betrachtet und miteinander verglichen. Dabei zeigt sich, dass nach 4 Stunden der Co-Inkubation in A1<sup>np</sup> Stoffwechselwege in Verbindung mit Cysteinproteasen und Vakuolen hochreguliert sind, während in B2<sup>p</sup> Stoffwechselwege in Verbindung mit Peroxisomen und des Zellstoffwechsels hochreguliert sind (siehe 4.1.3.4.1). In dieser Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass im Vergleich zu den Kontrollen, in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> nach 4 Stunden der Co-Inkubation mehr Cysteinproteasen signifikant hochreguliert sind als in dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> (siehe 4.1.3.5.1). Die Phagozytose von toten Zellen oder deren Bestandteile durch die Trophozoiten von *E. histolytica* ist bereits gut beschrieben (Huston *et al.*, 2003). Dabei wird angenommen, dass die Trophozoiten so das Level von toxischen und das Immunsystem stimulierenden Substanzen, welche durch die Zerstörung der Wirtszellen freigesetzt werden, senken. Dies würde eine Erklärung für die hochregulierten Stoffwechselwege in Verbindung mit Vakuolen in dem Klon A1<sup>np</sup> liefern, da innerhalb von Vakuolen und Lysosomen diese Stoffe verdaut werden. In dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> sind nach 4 Stunden Co-Inkubation dagegen vor allem Stoffwechselwege in Verbindung mit Peroxisomen und dem Zellstoffwechsel hochreguliert. Bei der Gewebeinvasion von *E. histolytica* spielen Peroxisomen eine wichtige Rolle bei dem Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (Choi *et al.*, 2005). Weiter konnte gezeigt werden, dass Trophozoiten mit gehemmter Peroxidaseaktivität eine geringere Toleranz gegenüber

oxidativem Stress zeigten sowie nicht in der Lage waren Abszesse in einem Tiermodell auslösen (Sen *et al.*, 2007). Durch den Vergleich der Proteome konnte bereits eine erhöhte Menge an Peroxisomen in dem Klon B2<sup>P</sup> im Vergleich zu A1<sup>NP</sup> gezeigt werden (Biller *et al.*, 2009). Daher könnte eine Erklärung für den pathogenen Phänotyp von B2<sup>P</sup> sein, dass die Trophozoiten, durch eine schnellere Regulation von Peroxisomen-bezogenen Stoffwechselwegen besser auf oxidativen Stress reagieren können, was einen Vorteil in der Abwehr der Immunantwort mit sich bringt. Die Hochregulation von Stoffwechselwegen des allgemeinen Stoffwechsels, wie Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel konnte in ähnlichen Versuchen bereits gezeigt werden (Gilchrist *et al.*, 2006; Thibeaux *et al.*, 2013). Die Hochregulation von Stoffwechselwegen des Energiehaushaltes könnte eine Folge des veränderten Nährstoffangebots sein. Durch die Zerstörung der humanen Zellen werden Zucker und Fette frei, die dann von den Trophozoiten aufgenommen werden. Nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen konnten keine signifikant angereicherten Stoffwechselwege in den Trophozoiten von A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> ausgemacht werden. Schaut man sich jedoch alle hochregulierten Zellprozesse an, ergibt sich für die beiden Klone ein ähnliches Bild (siehe 4.1.3.4.3). Bei beiden Klonen können die meisten hochregulierten Gene Prozessen aus dem Zellstoffwechsel zugeordnet werden. Schaut man sich die Stoffwechselwege genauer an, betreffen die meisten wieder den Energiehaushalt, wie Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel (Daten nicht gezeigt). Da nach 8 Stunden der Co-Inkubation viele der humanen Organoidzellen bereits lysiert sind, ist eine große Menge an Nährstoffen freigesetzt worden. Daher sind die Stoffwechselwege des Energiehaushaltes und der Homöostase in den Trophozoiten hochreguliert.

### **5.1.2.2.2 Analyse der signifikant runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten von A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> nach Co-Inkubation mit Organoidzellen**

Betrachtet man die signifikantesten runterregulierten Stoffwechselwege der Trophozoiten von A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup> nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen, betrifft es bei A1<sup>NP</sup> vor allem Prozesse, die in Verbindung mit Ribosomen und ribosomaler RNA (rRNA) stehen, während bei B2<sup>P</sup> nur Stoffwechselwege der Proteinmodulation zu den signifikantesten zählen (siehe 4.1.3.4.2). Nach 8 Stunden der Co-Inkubation sind bei beiden Klonen überwiegend Stoffwechselwege des RNA-Stoffwechsel runterreguliert (siehe 4.1.3.4.4). Neben Prozessen die mit rRNA in Verbindung stehen, sind vor allem auch Prozesse von nicht-codierender RNA (ncRNA) runterreguliert. Somit scheinen bei Co-Inkubation mit Organoidzellen vor allem Stoffwechselwege der Expressionsregulation und der post-translationalen Modifikation von Proteinen runterreguliert zu sein. Zwischen den beiden Klonen ist dabei kein Unterschied zu erkennen. In *E. histolytica* sind eine Reihe von ncRNAs beschrieben, die eine wichtige regulatorische Aufgabe in der Genexpression spielen (Zhang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Morf *et al.*, 2013; Mar-Aguilar *et al.*, 2013). Dabei besteht die große Mehrheit der ncRNAs aus kleinen interferierenden RNAs (siRNA), die am Prozess des *Gene silencing* beteiligt sind (Kaur & Lohia, 2004; Vayssie *et al.*, 2004; Boettner *et al.*, 2008). Die Runterregulation der ncRNAs führt also zu einer erhöhten Produktion von Proteinen, da die Translation nicht mehr durch die jeweiligen ncRNAs gehemmt wird. Durch die Inkubation der Trophozoiten in dem Transwellsystem zusammen mit den Organoidzellen verändern sich eine Reihe von Faktoren, wie Sauerstoff- und Nährstoffgehalt, für die Trophozoiten. Daher müssen bestimmte Stoffwechselwege in den Trophozoiten aktiviert werden, um z.B. mit reaktiven Sauerstoffspezies oder einer bestimmten Art von Kohlenhydraten oder Fetten umzugehen.

Dies könnte ein möglicher Grund für die Runterregulation der RNA- Stoffwechselwege in den Klonen A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit den Organoidzellen sein.

### 5.1.2.2.3 Expression von Pathogenitätsfaktoren nach Co-Inkubation

Neben den bereits erwähnten Cysteinproteasen spielen auch noch *amoebapores* und Gal/GalNac Lektine eine wichtige Rolle bei der Gewebeinvasion von *E. histolytica* (Tannich *et al.*, 1991; Petri & Schnaar, 1995; Leippe, 1997). Daher wurde die Expression dieser Pathogenitätsfaktoren anhand der Transkriptome genauer betrachtet. Dabei zeigte sich, dass nach 4 Stunden der Co-Inkubation mit Organoidzellen in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> fünf Cysteinproteasen und dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> nur eine Cysteinprotease signifikant hochreguliert sind (siehe 4.1.3.5.1). Von den 50 Cysteinproteasen von *E. histolytica* sind unter normalen Kulturbedingungen nur die vier Cysteinproteasen EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A5 und EhCP-A7 im hohen Maß exprimiert und machen rund 90% der Proteaseaktivität aus (Bruchhaus *et al.*, 2003; Tillack *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2007; Irmer *et al.*, 2009; Matthiesen *et al.*, 2013). Die EhCP-A7 ist in beiden Klonen nach 4 Stunden Co-Inkubation signifikant hochreguliert. Nach Co-Inkubation mit einem humanen Kolon Explantat konnte die EhCP-A7 ebenfalls in dem pathogenen Isolat HM-1:IMSS und dem nicht-pathogenen Isolat Rahman als signifikant hochreguliert gezeigt werden (Thibeaux *et al.*, 2013). In A1<sup>np</sup> sind zudem noch die Cysteinproteasen EhCP-A1, EhCP-A2, EhCP-A4 und EhCP-B4 signifikant hochreguliert. Für die hier genannten Cysteinproteasen konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Abszessbildung spielen und in den Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> während der Leberinvasion signifikant hochreguliert sind im Vergleich zu axenisch kultivierten Trophozoiten (Gilchrist *et al.*, 2006; Matthiesen *et al.*, 2013). Interessanterweise sind in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> nach 4 Stunden der Co-Inkubation wesentlich mehr Cysteinproteasen hochreguliert als in dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup>. Nach 8 Stunden der Co-Inkubation sind in beiden Klonen nur noch zwei Cysteinproteasen signifikant hochreguliert, wobei in dem Klon B2<sup>p</sup> ebenfalls drei signifikant runterreguliert sind (siehe 4.1.3.5.2). In A1<sup>np</sup> sind dabei die EhCP-A1 und EhCP-B4 hochreguliert, während in B2<sup>p</sup> ebenfalls die EhCP-B4 und zusätzlich die EhCP-B9 hochreguliert sind. Für die EhCP-B9 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese während der Abszessbildung im Tiermodell in dem Klon B2<sup>p</sup> signifikant hochreguliert ist (Matthiesen *et al.*, 2013) Die drei Cysteinproteasen die in dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> signifikant runterreguliert sind die EhCP-A4, EhCP-A6 und EhCP-A8. Für die EhCP-A6 konnte ein Zusammenhang von gesteigerter Expression und temperaturbedingter Stressantwort gezeigt werden (Weber *et al.*, 2006). Von den vier generell exprimierten Cysteinproteasen von *E. histolytica* spielt die EhCP-A5 die wichtigste Rolle bei der Gewebeinvasion, der Immunantwort und der Abszessbildung (Ankri *et al.* 1999, Tillack *et al.*, 2006; Bansal *et al.*, 2009; Thibeaux *et al.*, 2012). Daher ist es möglich, dass diese bereits im hohen Maße von den Trophozoiten exprimiert wird und somit nicht zu den signifikant hochregulierten Genen zählt.

Die Betrachtung von Genen, die für die Gal/GalNac Lektine codieren konnte zeigen, dass in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>np</sup> nach 4 Stunden der Co-Inkubation 7 signifikant runterreguliert sind, während in dem pathogenen Klon B2<sup>p</sup> 4 signifikant runter- und 2 signifikant hochreguliert sind (siehe 4.1.3.5.1). Nach 8 Stunden der Co-Inkubation sind jeweils 2 Lektinogene in beiden Klonen signifikant runterreguliert (siehe 4.1.3.5.2). Das Gal/GalNac Lektin spielt eine wichtige Rolle bei der Anheftung an die Wirtszellen (Tannich *et al.*, 1991; Petri & Schnaar, 1995). Daher würde man die, für die Lektine codierenden Gene, nach Co-

Inkubation mit den Organoidzellen hochreguliert erwarten. Nach 4 Stunden Co-Inkubation sind in dem pathogenen Klon B2<sup>P</sup> zwei Lektinene, die für die kleine Untereinheit codieren signifikant hochreguliert. Anhand der Inkubation mit einem humanen Kolon Explantat konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach einer Stunde Inkubation in den Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS das Gen für die kleine Untereinheit des Lektins signifikant hochreguliert ist (Thibeaux *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte dies nicht für die Trophozoiten des nicht-pathogenen Isolates Rahman gezeigt werden. In einer weiteren Studie konnte dagegen gezeigt werden, dass in Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS Gene, die für die kleine Untereinheit codieren 1 Tag und 29 Tage nach der Infektion von Mäusen signifikant runterreguliert waren (Gilchrist *et al.*, 2006).

In einem weiteren Ansatz wurden die Transkriptome der Trophozoiten der Klone A1<sup>NP</sup> und B2<sup>P</sup>, die ohne Organoidzellen über 4 Stunden in dem Transwell-System inkubierten mit denen von normal kultivierten Trophozoiten verglichen. Dabei konnte eine Vielzahl von Genen als differentiell exprimiert gezeigt werden (siehe 4.1.3.5). Bei einer Betrachtung der, in den Transwell-inkubierten Trophozoiten, signifikant hochregulierten Gene konnten viele Gene gezeigt werden, die für Cysteinproteasen, Lektine und *amoebapores* codieren. Dabei sind in dem pathogenen Klon B2<sup>P</sup> wesentlich mehr Gene, die für diese drei Proteinfamilien codieren signifikant hochreguliert als in A1<sup>NP</sup>. Unter den Cysteinproteasen findet sich bei beiden Klonen die bereits beschriebene Cysteinprotease EhCP-A5. Die Transkriptome dienten als Kontrolle für die Trophozoiten, die zusammen mit Organoidzellen co-inkubiert wurden. Da diese Gene bereits bei Kultivierung der Trophozoiten in dem Transwell-System stark hochreguliert werden, finden sie sich wahrscheinlich nicht als differentiell exprimiert, wenn man die Transkriptome mit denen von Trophozoiten vergleicht, die zusammen mit Organoidzellen im Transwell-System co-inkubiert wurden. Dabei stellt sich die Frage, warum bereits bei Kultivierung in dem Transwell-System viele der, für die Pathogenitätsfaktoren codierenden Gene hochreguliert werden. Eine mögliche Erklärung könnte das Matrigel sein, was zum Verschluss der Filter der Transwelleinsätze benutzt wurde. Matrigel ist ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix, welches aus Sarkomen von Mäusen extrahiert wird und die extrazelluläre Matrix in verschiedenen Modellen nachstellen soll (Hughes *et al.*, 2010). Es konnte bereits eine Interaktion mit Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS und Matrigel gezeigt werden (Emmanuel *et al.*, 2015; Hasan *et al.*, 2018). Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass das Gal/GalNAc Lektin eine wichtige Rolle bei der Adhäsion an die Proteine des Matrigel spielt (Emmanuel *et al.*, 2015). Weiter ist beschrieben, dass Trophozoiten von *E. histolytica* auf Proteine der extrazellulären Matrix mit der Sekretion von Cysteinproteasen reagieren (Franco *et al.*, 1997; Talamas-Rohana & Rios, 2000). Die Stimulation der Trophozoiten durch das Matrigel würde daher eine Erklärung für die Hochregulation der verschiedenen Cysteinproteasen, Lektine und *amoebapores* liefern. Der pathogene Klon B2<sup>P</sup> scheint dabei eine größere Anzahl dieser Proteine zu exprimieren, was zum pathogenen Phänotyp passt. Interessanterweise ist in dem pathogenen Klon B2<sup>P</sup> die EhMP8-1 signifikant hochreguliert, während in dem nicht-pathogenen Klon A1<sup>NP</sup> die EhMP8-2 signifikant hochreguliert ist im Vergleich zu axenisch, mikroaerophil kultivierten Trophozoiten. Es konnte gezeigt werden, dass Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS die in der Expression der EhMP8-1 gehemmt waren, Proteine der extrazellulären Matrix schlechter aufnehmen konnten (Hasan *et al.*, 2018). Dies könnte eine Erklärung für die Hochregulation der Metalloproteasen bei Kontakt mit dem Matrigel sein.

## 5.2 Die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 von *E. histolytica*

Die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 sind 2 der insgesamt 22 bisher beschriebenen Metalloproteasen von *E. histolytica*. Aufgrund ihres charakteristischen Zink-Bindungsmotivs zählen sie zu der Familie M8 der Metalloproteasen. Sie bestehen beide aus einer extrazellulären Domäne, in der das katalytische Zentrum liegt, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatische Domäne (Tillack *et al.*, 2007). Beide Proteine weisen eine Aminosäuresequenzübereinstimmung von 34% auf und ähneln dem sog. Leishmanolysin, welches ein essentiellen Pathogenitätsfaktor von *Leishmania major* darstellt und zu einem wichtigen Impfstoffkandidaten zählt. Bei *L. major* dient es vor allem der Abwehr der Immunantwort, sowie dem Schutz vor einem lysosomalen Abbau der Parasiten, indem es Zytokine und hydrolytische Enzyme inaktiviert (Kulkarni *et al.*, 2006; Isnard *et al.*, 2012). Für die EhMP8-1 konnte eine Proteaseaktivität gegenüber succinyliertem Casein gezeigt werden (Teixeira *et al.*, 2012).

Aufgrund der Ähnlichkeit zu dem Leishmanolysin und dem bereits beschriebenen negativen Effekt auf die Pathogenität sollten die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 in dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

### 5.2.1 Einfluss der EhMP8-1 und EhMP8-2 auf die Pathogenität

Der Einfluss der beiden Metalloproteasen auf die Pathogenität der Trophozoiten sollte anhand verschiedener phänotypischer Untersuchungen bestimmt werden. Dazu wurde mit den drei *silencern*  $A1^{EhMP8-1 Si}$ ,  $A1^{EhMP8-2 Si}$  und  $A1^{Doppel Si}$  des nicht-pathogenen Klons  $A1^{np}$  und dem *silencer*  $B2^{EhMP8-1 Si}$ , sowie dem Überexprimierer  $B2^{EhMP8-2 UE}$  des pathogenen Klons  $B2^p$  gearbeitet. Die Vergleiche der Ergebnisse zu den beiden Wildtypen  $A1^{np}$  und  $B2^p$  bzw.  $B2^{pNC}$  sollten mögliche Unterschiede zeigen, die dann auf die Metalloproteasen zurückzuführen wären.

Da Cysteinproteasen eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von *E. histolytica* spielen sollte die Aktivität der Cysteinproteasen der unterschiedlichen Transfektanten mit denen der Wildtypen verglichen werden (Tillack *et al.*, 2006; Lidell *et al.*, 2006; Thibeaux *et al.*, 2013) Dabei wurde zum einen die Spaltung des Substrates Z-Arg-Arg-pNA durch Lysate der Trophozoiten über die Zeit bestimmt und zum anderen die Aktivität einzelner Cysteinproteasen mittels eines Substratgels miteinander verglichen. Dabei konnte für alle *silencer* eine signifikant geringere Cysteinproteaseaktivität im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden, während der Überexprimierer eine signifikant höhere Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle aufwies (siehe 4.2.4). Diese Ergebnisse konnten durch die Analyse der Substratgele bestätigt werden (siehe 4.2.5). Generell zeigen die Transfektanten des pathogenen Klons  $B2^p$  eine höhere Cysteinproteaseaktivität als die des nicht-pathogenen Klons  $A1^{np}$ . Dies deckt sich mit den bereits beschriebenen Cysteinproteaseaktivitäten der beiden Klone  $A1^{np}$  und  $B2^p$  (Meyer *et al.*, 2016). Eine signifikant erhöhte Cysteinproteaseaktivität des Überexprimierers  $B2^{EhMP8-2 UE}$ , sowie eine signifikant reduzierte Aktivität des *silencers*  $A1^{EhMP8-2 Si}$  konnte bereits beschrieben werden (Dissertation Lender, 2019). Bisher ist noch kein direkter Zusammenhang von Metalloproteasen und Cysteinproteasen beschrieben. Jedoch konnten gezeigt werden, dass beide Arten von Proteasen durch die Zugabe des Peptids  $\beta$ -Amyloid in Makrophagen aktiviert werden können (Castellano *et al.*, 2014). Bei Kontakt mit Proteinen der extrazellulären Matrix werden das Leishmanolysin und die Cysteinprotease CP-B gleichermaßen von den Amastigoten der

*Leishmania* Arten ausgeschüttet (Kulkarni *et al.*, 2008). Eine gegenseitige Aktivierung von Metalloproteasen durch Spaltung der Proform konnte bereits gezeigt werden (Cui *et al.*, 2017). Eine solche gegenseitige Aktivierung von Cysteinproteasen in *E. histolytica* wurde ebenfalls postuliert (Tillack *et al.*, 2006). Daher ist es denkbar, dass auch die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 die Cysteinproteasen von *E. histolytica* aktivieren können. Die Substratgele zeigen, dass in den *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> vor allem die EhCP-A1 und EhCP-A2 schwächere Aktivität aufweisen, während bei dem *silencer* des pathogenen Klons B2<sup>p</sup> die EhCP-A5 und EhCP-A7 schwächere Aktivität zeigen.

Die Fähigkeit von *E. histolytica* pro- und eukaryotische Zellen zu lysieren ist bereits gut beschrieben, wobei den *amoebapores* eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Zhang *et al.*, 2004). Daher sollte ein möglicher Einfluss der Metalloproteasen auf die Lyse von HepG2 Zellen untersucht werden. Bei HepG2 handelt es sich um eine humane Leber-Krebszelllinie (Aden *et al.*, 1979). Da sich die invasive Verlaufsform in den meisten Fällen in der Leber manifestiert und die Trophozoiten das Lebergewebe lysieren und es zu einer Abszessbildung kommt, wurde diese Zelllinie für die Versuche ausgewählt. Dabei zeigte sich, dass die Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> generell nicht in der Lage waren die Zellen zu lysieren (siehe 4.2.2). Dabei hatte die gehemmte oder verstärkte Expression der Metalloproteasen keinen Einfluss auf die lytische Fähigkeit. Dies konnte ebenfalls für die Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sowie für die Transfektanten anhand von THP1 Zellen gezeigt werden (Dissertation Lender, 2019). Trophozoiten des Isolates G3 in denen die Expression der EhMP8-1 gehemmt wurde zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Fähigkeit T-Jurkat-Zellen zu lysieren im Vergleich zum Wildtyp (Teixeira *et al.*, 2012).

Als letztes sollte der Einfluss der Metalloproteasen auf den zytopathischen Effekt auf HepG2 Zellen untersucht werden. Dabei zeigte sich ein signifikant geringerer zytopathischer Effekt für die *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup>, A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>, sowie für den Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup>, wohingegen der *silencer* A1<sup>Doppel Si</sup> keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle A1<sup>np</sup> zeigte (siehe 4.2.3). Bei der in dieser Arbeit untersuchten Invasion der 2D-Organoidkulturen konnte für alle *silencer* eine signifikant geringere Abnahme des TEER im Vergleich zu den Kontrollen gemessen werden, was darauf schließen lässt, dass diese den Zellrasen langsamer zerstören (siehe 4.1.1.3). Unter Ausschluss des *silencers* A1<sup>Doppel Si</sup> passen diese Ergebnisse zusammen. Ebenso konnte eine geringere Cysteinproteaseaktivität für die *silencer* festgestellt werden, was zu einem geringeren zytopathischen Effekt führen würde (siehe 4.2.4). Jedoch konnte für den Überexprimierer dabei eine signifikant höhere Proteaseaktivität festgestellt werden, was nicht mit den Messungen des zytopathischen Effektes auf HepG2 Zellen zusammenpasst. Für Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS bei denen die Expression der EhMP8-1 gehemmt wurde, konnte ebenfalls ein signifikant geringerer zytopathischer Effekt auf CHO Zellen im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Teixeira *et al.*, 2012). Weiter konnte gezeigt werden, dass die *silencer* der EhMP8-2 und EhMP8-1 des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> eine signifikant geringere hämolytische Aktivität aufwiesen, als der WT A1<sup>np</sup> (Dissertation Lender, 2019). Dabei konnte für den Überexprimierer B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup> dagegen eine signifikant gesteigerte hämolytische Aktivität gezeigt werden. Unter Betrachtung der hier gesammelten Ergebnisse sowie dem Einbezug der Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten, scheinen die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 von *E. histolytica* einen negativen Effekt auf viele Merkmale zu haben, die mit der Pathogenität assoziiert werden. Das *silencing* der Metalloproteasen in den Trophozoiten führt zu einer Reduktion der Cysteinproteaseaktivität, der hämolytischen Aktivität und der zytopathischen Aktivität auf verschiedene Zelltypen. Dagegen konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass das *silencing* der EhMP8-2 zu einer signifikanten Steigerung der Pathogenität führte (Meyer *et al.*, 2016). Die Bildung von ALAs ist

ein komplexer Vorgang, bei dem auch der Wirt und die wirtsspezifische Immunantwort eine große Rolle spielen. Durch die Reduktion von Cysteinproteaseaktivität sowie der zytophatischen Aktivität, ausgelöst durch eine gehemmte Expression der Metalloproteasen, kommt es möglicherweise zu weniger Schäden des Wirtsgewebes. Dadurch werden die Trophozoiten nicht so schnell vom Immunsystem des Wirtes erkannt, was zu einer ungehinderten Ausbreitung im Wirtsgewebe führt. Im Weiteren handelt es sich bei dem verwendeten artifiziiellen Tiermodell und den *in vitro* Assays um Modelle, die nur bedingt die Situation *in vivo* nachstellen können.

### 5.2.2 Analyse der Transkriptome von *silencern* der Metalloproteasen

Aufgrund der Unterschiede bei den untersuchten phänotypischen Pathogenitätsmerkmalen der *silencer* wurden die Transkriptome dieser mit denen von A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> verglichen. Dabei sollten mögliche Einflüsse des *silencings* der Metalloproteasen auf die Expression anderer Gene ausgemacht werden, was wiederum eine mögliche Erklärung für die Unterschiede der phänotypischen Untersuchungen liefern sollte. Das Ausschalten der Expression von Genen in den Trophozoiten von *E. histolytica* ruht auf dem RNAi-basierten Verfahren (Bracha *et al.*, 2003). Dabei wird ein Vektor, der die Zielsequenz und eine bestimmte vorgeschaltete Trigger-Sequenz enthält in die Trophozoiten transfiziert. Die Trigger-Sequenz ist eine Gensequenz zu der die Trophozoiten natürlicherweise eine große Anzahl an kleinen gegenläufigen RNAs (asRNA) bilden, was die Unterdrückung der Expression dieses Gens zur Folge hat. Interessanterweise führt dies ebenso zur Unterdrückung der Expression der nachgeschalteten Zielsequenz. Der chromosomale Locus des Zielgens bildet auch nach Verlust des Plasmids weiterhin asRNAs, was zu einem stabilen *silencings* des Gens führt. In *E. histolytica* basiert ein Großteil der natürlichen Genregulation auf der Bildung von asRNAs (Morf *et al.*, 2013; Suresh *et al.*, 2016). Somit ist es denkbar, dass das artifiziielle Ausschalten der für die EhMP8-1 und EhMP8-2 codierenden Gene zu einer veränderten Regulation weiterer Gene führt. Solche *Off-target* Effekte durch das RNAi-basierte *silencing* sind bereits beschrieben (Putzbach *et al.*, 2018). Bei dem *silencer* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> konnte darüber hinaus schon eine reduzierte Expression der EhMP8-2 nachgewiesen werden, jedoch konnte kein Einfluss auf die Expression der EhMP8-1 in dem *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> gezeigt werden (Dissertation Lender, 2019). In dieser Arbeit konnten in den beiden *silencern* A1<sup>EhMP8-1 Si</sup> und A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen im Vergleich zu A1<sup>np</sup> gezeigt werden (siehe 4.2.6). Dabei sind die meisten der Gene signifikant runterreguliert, was für die vorher genannten Problematik der *Off-target* Effekte beim RNAi-basiertem *silencing* spricht. In den *silencern* A1<sup>Doppel Si</sup> und B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> sind dagegen nur wenige Gene differentiell exprimiert im Vergleich zu den Wildtypen, wobei die Mehrzahl an Genen ebenfalls signifikant runterreguliert sind. Beim Vergleich der differentiell exprimierten Gene der *silencer* von A1<sup>np</sup> zeigt sich, dass erstaunlicherweise nur wenige Gene in allen drei gleichzeitig runterreguliert sind und keine gleichzeitig hochreguliert sind. Der oben genannte Einfluss des *silencings* der EhMP8-1 auf die Expression der EhMP8-2 konnte nicht bestätigt werden. Unter den signifikant runterregulierten Genen finden sich viele Gene die für Proteine aus der AIG1 Familie codieren. Rund die Hälfte der runterregulierten Gene in A1<sup>Doppel Si</sup> codieren für AIG1 Proteine. Erstmals beschrieben wurden AIG1 Proteine in Zusammenhang mit der Immunabwehr von Pflanzen (Reuber *et al.*, 1996). In *E. histolytica* konnte für Proteine aus dieser Familie eine Verbindung mit der Antwort auf Stress gezeigt werden (Ehrenkaufner *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2009; Penuliar *et al.*, 2015). Darüber hinaus sind für einige Proteine aus der Familie auch ein Zusammenhang mit der Pathogenität

festgestellt worden (Nakada-Tsukui *et al.*, 2018). Dabei konnte eine gesteigerte Adhärenz von Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS an HRBC gezeigt werden, wenn ein *AIG1* Gen überexprimiert wurde. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den signifikant geringeren zytopathischen Effekt auf HepG2 Zellen und die signifikant geringere Abnahme des TEER der *silencer* liefern. Die Runterregulation der *AIG1* Gene in den *silencern* könnte eine verringerte Adhärenz mit sich bringen, was eine schlechtere Kontaktaufnahme an die Organoid- und HepG2 Zellen zur Folge hätte. Dadurch würden diese die Zellen langsamer lösen bzw. zerstören. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass in den *silencern* der Metalloproteasen Gene, die für Cysteinproteasen codieren signifikant runterreguliert sind (siehe 4.2.6). Dabei ist in dem *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup> die EhCP-A7 signifikant runterreguliert im Vergleich zu B2<sup>P</sup>. Dies ließ sich durch die Substratgele bestätigen (siehe 4.2.5). Die EhCP-A1 und EhCP-A2 zeigen zwar in dem Substratgel eine verringerte Aktivität für die *silencer* A1<sup>EhMP8-2 Si</sup> und A1<sup>Doppel Si</sup>, sind jedoch nicht signifikant runterreguliert im Vergleich zu A1<sup>NP</sup>. Gleiches gilt für die EhCP-A5 für den *silencer* B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass das mRNA Level und die Aktivität von Cysteinproteasen von *E. histolytica* Trophozoiten nicht miteinander korrelieren (Matthiesen *et al.*, 2013). Unter den signifikant runterregulierten Genen finden sich bei den *silencern* des nicht-pathogenen Klons A1<sup>NP</sup> eine Reihe von Genen, die für die Untereinheiten des Gal/GalNAc Lektin codieren (siehe 4.2.5). Die Lektine spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenität, da sie das Anheften der Trophozoiten an die Wirtszellen ermöglichen (Tannich *et al.*, 1991; Petri & Schnaar, 1995). Eine verringerte Expression dieser Gene führt zu einer geringeren Adhärenz, was wiederum, wie bereits für die *aig1* Gene beschrieben, die Ergebnisse der TEER Messungen und des zytopathischen Effektes erklären würde. Ob es sich dabei um einen direkten Effekt des *silencings* der Metalloproteasengene handelt, oder ob durch die bereits beschriebene Problematik der *Off-target* Effekte, nur ein zufälliges *silencing* dieser Gene auftritt, bleibt dabei fraglich.

### 5.2.3 Lokalisation der EhMP8-1 und EhMP8-2 mittels Myc-tag

Durch die Lokalisation der beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 in den Trophozoiten von *E. histolytica* sollten mögliche Rückschlüsse auf die Funktion gezogen werden. Dabei wurden die Metalloproteasen artifiziell in den Trophozoiten überexprimiert, wobei zusätzlich ein Myc-tag an diese fusioniert wurde. Mit Hilfe von spezifischen anti-Myc Antikörpern konnten die beiden Proteasen dann lokalisiert werden. Dabei konnten beide Metalloproteasen nur im Zytoplasma lokalisiert werden, nicht aber an der Oberfläche der Trophozoiten (siehe 4.2.7). Dieses widerspricht den Ergebnissen von Teixeira *et al.*, welche die EhMP8-1 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, generiert durch die Immunisierung von Kaninchen durch rekombinantes EhMP8-1, auf der Oberfläche, sowie im Zytoplasma der Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS lokalisieren konnten (Teixeira *et al.*, 2012). Dabei konnte sie allerdings nur bei einer geringen Anzahl an Trophozoiten auf der Oberfläche lokalisiert werden. Im Zytoplasma zeigte sich dabei eine spezifische, punktuelle Lokalisation, wobei bestimmte Bereiche, wie Vakuolen, nicht gefärbt waren. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden und ebenso für die EhMP8-2 gezeigt werden. Es scheint, als würden die Metalloproteasen in Vesikeln im Zytoplasma lokalisiert sein. Bei *Leishmania major* findet sich das Leishmanolysin auf der Oberfläche der Promastigoten (Bouvier, 2004). Auch bei der Untersuchung des Oberflächenproteoms von Trophozoiten des Isolates HM-1:IMSS konnte die EhMP8-1 gefunden werden (Biller *et al.*, 2004). Allerdings sind in *E. histolytica* einige der Cysteinproteasen innerhalb von Vesikeln lokalisiert worden (Jacobs *et al.*, 1998). Daher wäre

es denkbar, dass auch die Metalloproteasen sich in Vesikeln der Trophozoiten befinden. Kürzlich konnten darüber hinaus in unserer Arbeitsgruppe die beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 in dem Proteom von extrazellulären Vesikeln der Trophozoiten nachgewiesen werden (unveröffentlicht). Warum die EhMP8-1 jedoch nicht auf der Oberfläche lokalisiert werden konnte bleibt fraglich. Es wäre denkbar, dass die beiden Proteine aufgrund der artifiziellen Überexpression mit dem Myc-*taq* von den Trophozoiten als zellfremd erkannt werden und daher für den Abbau in Vesikel angereichert werden.

## 6 Ausblick

Viele der Mechanismen und Gründe einer invasiven Verlaufsform der Amöbiasis sind weiterhin ungeklärt und Thema der aktuellen Forschung von *E. histolytica*. Die Entdeckung und Charakterisierung neuer Pathogenitätsfaktoren spielt dabei eine wichtige Rolle. Aber auch die Entwicklung und Anwendung guter *in vitro* Zellmodelle zur Erforschung des Prozesses der Gewebeinvasion stellt ein wichtiges Hilfsmittel dabei.

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der Gewebeinvasion von *E. histolytica* mit einem humanen, intestinalen 2D-Organoidmodell gearbeitet. Dabei wurden zwei Klone desselben Isolates verwendet, die sich in ihrer Pathogenität unterscheiden. Es konnten durch Transkriptomanalysen deutliche Unterschiede in der Reaktion der humanen Organoidzellen auf die beiden Klone gezeigt werden. Aber auch in der Genexpression der beiden Klone, wenn diese mit Organoidzellen zusammen inkubiert wurden, zeigten sich deutliche Unterschiede. Interessanterweise ergab sich dabei kein Unterschied in der Zerstörung der 2D-Organoidkulturen zwischen den Klonen. Auch wenn dieses Modell die *in vivo* Situation schon recht gut abdeckt, kann noch vieles verändert und sich der Situation *in vivo* weiter genähert werden. Ein großes Defizit dieses Modells besteht in der fehlenden oder kaum vorhandenen Mukusschicht. Diese stellt jedoch *in vivo* die erste Barriere für die Trophozoiten von *E. histolytica* dar und spielt eine wichtige Rolle bei dem Schutz gegen eine invasive Verlaufsform. Daher wäre ein guter Ansatzpunkt für die Verbesserung des Organoidmodells die Etablierung einer intakten Mukusschicht. Weiter spielen auch Immunzellen, wie Granulozyten eine wichtige Rolle bei der invasiven Verlaufsform. Es sind bereits einige Organoid- und Zellmodelle beschrieben bei denen zusätzlich verschiedene Immunzellen eingebracht werden konnten. Da auch das Mikrobiom im Darm einen wichtigen Faktor bei diesen Prozessen darstellt, wäre das Einbringen von typischen Bakterien des Darmes ein guter Ansatz zur Verbesserung des Modells. Die Arbeit mit Transfektanten, die eine gesteigerte oder gehemmte Expression von bekannten Pathogenitätsfaktoren aufweisen, könnten anhand dieses Modells genauere Einblicke in die Funktion der Proteine bei der Invasion zeigen. Auch der Einfluss von bisher unbekannt Proteinen auf die Pathogenität könnte in einem solchen Modell einfach getestet werden.

Die Charakterisierung der beiden Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 wurde mit Hilfe unterschiedlicher Transfektanten durchgeführt. Dabei wurden die Expression der Gene mittels RNAi-basiertem *silencing* gehemmt. Da dieses Verfahren durch *Off-target* Effekte oft auch weitere Gene beeinflusst, wäre die Etablierung eines spezifischen *Gensilencings*, wie dem CRISPR/Cas-System, in *E. histolytica* ein guter Ansatz. Für die Transfektanten konnte eine Reihe signifikanter Unterschiede im zytopathischen Effekt auf HepG2 sowie der Organoidzellen und in der Cysteinproteaseaktivität gezeigt werden. Die Untersuchung der Transkriptomte konnte eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen im Vergleich zu den

Wildtypen zeigen. Diese könnten mögliche Erklärungen für die Unterschiede in den phänotypischen Merkmalen liefern. Jedoch bleibt die Frage, ob es sich bei der veränderten Expression anderer Gene um *Off-target* Effekte handelt, oder ob es ein direkter Effekt der gehemmten Expression der Metalloproteasen ist. Durch ein spezifischen *silencing* könnte dies geklärt werden. Die Lokalisation mittels *Myc-tag* zeigte eine Ansammlung der beiden Metalloproteasen in Vesikeln des Zytoplasmas. Zwar konnte eine Analyse des Proteoms von Vesikeln dies bestätigen, jedoch konnte die EhMP8-1, sowie das verwandte Leishmanolysin auf der Oberfläche der jeweiligen Parasiten lokalisiert werden. Um eine Klarheit zu bekommen, ob die hier gefundenen Ergebnisse der Wirklichkeit entsprechen und keine Fehllokalisation durch die artifizielle Expression entsteht, könnte ein Ansatz darin bestehen, spezifische Antikörper mit Hilfe von rekombinant exprimierten Metalloproteasen zu generieren

## Literaturverzeichnis

Aden, David P., et al. "Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line." *Nature* 282.5739 (1979): 615-616.

Adl, Sina M., et al. "The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52.5 (2005): 399-451.

Aguilar-Rojas, Arturo, et al. "Insights into amebiasis using a human 3D-intestinal model." *Cellular Microbiology* 22.8 (2020): e13203.

Ahn, Chun-Seob, et al. "Comparison of Secretome Profile of Pathogenic and Non-Pathogenic *Entamoeba histolytica*." *Proteomics* 18.7 (2018): 1700341.

Ali, Ibne Karim M., Mehreen Zaki, and C. Graham Clark. "Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*." *Journal of clinical microbiology* 43.12 (2005): 5842-5847.

Allen, Judith E., and Rick M. Maizels. "Diversity and dialogue in immunity to helminths." *Nature Reviews Immunology* 11.6 (2011): 375-388.

Andrä, Jörg, Otto Berninghausen, and Matthias Leippe. "Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins." *FEBS letters* 564.1-2 (2004): 109-115.

Aurrecoechea, Cristina, et al. "AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species." *Nucleic acids research* 39. suppl\_1 (2010): D612-D619.

Bansal, Devendra, et al. "An ex-vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis." *PLoS neglected tropical diseases* 3.11 (2009): e551.

Betanzos, Abigail, et al. "The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage." *PLoS One* 8.6 (2013): e65100.

Biller, Laura, et al. "Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties." *Proteomics* 9.17 (2009): 4107-4120.

Biller, Laura, 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* 11.1 (2010): 1-11.

Biller, Laura, et al. "The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*." *Molecular & Cellular Proteomics* 13.1 (2014): 132-144.

Blessmann, Joerg, et al. "Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples." *Journal of clinical microbiology* 40.12 (2002): 4413-4417.

Blessmann, Joerg, et al. "Longitudinal study of intestinal *Entamoeba histolytica* infections in asymptomatic adult carriers." *Journal of clinical microbiology* 41.10 (2003): 4745-4750.

Boettner, Douglas R., et al. "Entamoeba histolytica phagocytosis of human erythrocytes involves PATMK, a member of the transmembrane kinase family." *PLoS pathogens* 4.1 (2008): e8.

Bouvier, Jacques. "Leishmanolysin." *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, 2004. 764-769.

Bracha, Rivka, et al. "Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence." *Molecular microbiology* 34.3 (1999): 463-472.

Bracha, Rivka, Yael Nuchamowitz, and David Mirelman. "Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: molecular analysis and effect on pathogenicity." *Eukaryotic cell* 2.2 (2003): 295-305.

Bredeston, Luis M., et al. "Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*." *Journal of Biological Chemistry* 280.37 (2005): 32168-32176.

Brittingham, Andrew, et al. "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." *The Journal of Immunology* 155.6 (1995): 3102-3111.

Bruchhaus, Iris, 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." *Eukaryotic cell* 2.3 (2003): 501-509.

Burchard, G. und E Tannich „Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der Amö- biasis“. *Deutsches Ärzteblatt* 101.45 (2004): 2448.

Caramalho, Iris, et al. "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide." *The Journal of experimental medicine* 197.4 (2003): 403-411.  
Castellano, José, Lina Badimon, and Vicenta Llorente-Cortés. "Amyloid- $\beta$  increases metallo- and cysteine protease activities in human macrophages." *Journal of vascular research* 51.1 (2014): 58-67.

Choi, Min-Ho, et al. "An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack." *Molecular and Biochemical Parasitology* 143.1 (2005): 80-89.

Clark, C. Graham, et al. "Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome." *Advances in parasitology* 65 (2007): 51-190.

Co, Julia Y., et al. "Controlling the polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and infectious diseases." *Nature protocols* 16.11 (2021): 5171-5192.

Collaborators GBDDD "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.* 18 (2018): 1211–1228.

Cui, Ning, Min Hu, and Raouf A. Khalil. "Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases." *Progress in molecular biology and translational science* 147 (2017): 1-73.

Davis, Paul H., Jochen Schulze, and Samuel L. Stanley Jr. "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." *Molecular and biochemical parasitology* 151.1 (2007): 118-128.

Dekkers, Johanna F., et al. "Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids." *European Respiratory Journal* 48.2 (2016): 451-458.

Derricott, Hayley, et al. "Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species." *Cell and tissue research* 375.2 (2019): 409-424.

de Souza, Natalie. "Organoids." *Nature Methods* 15.1 (2018): 23-23.

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

Diamond, Louis S., Dan R. Harlow, and Carol C. Cunnick. "A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 72.4 (1978): 431-432.

Djossou, F., et al. "Abcès amibien du foie. Analyse de 20 observations et proposition d'un algorithme thérapeutique." *La revue de médecine interne* 24.2 (2003): 97-106.

Dutta, Devanjali, and Hans Clevers. "Organoid culture systems to study host–pathogen interactions." *Current opinion in immunology* 48 (2017): 15-22.

Dutton, Johanna S., et al. "Primary cell-derived intestinal models: recapitulating physiology." *Trends in biotechnology* 37.7 (2019): 744-760.

Ehrenkauf, Gretchen M., et al. "Identification of developmentally regulated genes in *Entamoeba histolytica*: insights into mechanisms of stage conversion in a protozoan parasite." *Cellular microbiology* 9.6 (2007): 1426-1444.

El-Sayed, Najib MA, and John E. Donelson. "African trypanosomes have differentially expressed genes encoding homologues of the *Leishmania* GP63 surface protease." *Journal of Biological Chemistry* 272.42 (1997): 26742-26748.

Emmanuel, Merlyn, et al. "Small GTPase Rab21 mediates fibronectin induced actin reorganization in *Entamoeba histolytica*: implications in pathogen invasion." *PLoS pathogens* 11.3 (2015): e1004666.

Franco, Elizabeth, José Vázquez Prado, and Isaura Meza. "Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and chemotaxis of *Entamoeba histolytica* trophozoites." *Journal of Infectious Diseases* 176.6 (1997): 1597-1602.

Galluzzi, Luca, Aurora Diotallevi, and Mauro Magnani. "Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in infection by intracellular parasites." *Future science OA* 3.3 (2017): FSO198.

Galván-Moroyoqui, José Manuel, M. Del Carmen Domínguez-Robles, and Isaura Meza. "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*." *International journal for parasitology* 41.10 (2011): 1101-1112.

Gay, Nicholas J., and Monique Gangloff. "Structure and function of Toll receptors and their ligands." *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007): 141-165.

Ge, Steven Xijin, Dongmin Jung, and Runan Yao. "ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants." *Bioinformatics* 36.8 (2020): 2628-2629.

Gilchrist, Carol A., et al. "Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome." *Molecular and biochemical parasitology* 147.2 (2006): 163-176.

Gilchrist, Carol A., and William A. Petri Jr. "Using differential gene expression to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis." *Trends in parasitology* 25.3 (2009): 124-131.

Gillespie, Marc, et al. "The reactome pathway knowledgebase 2022." *Nucleic acids research* 50.D1 (2022): D687-D692.

Grandgenett, P. M., et al. "Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and biochemical parasitology* 110.2 (2000): 409-415.

Guo, X., S. E. Stroup, and E. R. Houpt. "Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- $\gamma$ ." *Mucosal immunology* 1.2 (2008): 139-146.

Hamano, Shinjiro, et al. "Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production." *The Journal of Immunology* 177.2 (2006): 1208-1213.

Hasan, Muhammad M., Jose E. Teixeira, and Christopher D. Huston. "Invadosome-mediated human extracellular matrix degradation by *Entamoeba histolytica*." *Infection and immunity* 86.9 (2018): e00287-18.

Hausmann, K., Hülsmann, N., Radek, R.(2003). *Protistology*, 3. Aufl., Schweizerbart. S. 23.

## Literaturverzeichnis

Heo, Inha, et al. "Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids." *Nature microbiology* 3.7 (2018): 814-823.

Hill, David R., et al. "Real-time measurement of epithelial barrier permeability in human intestinal organoids." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 130 (2017): e56960.

Hill, David R., and Jason R. Spence. "Gastrointestinal organoids: understanding the molecular basis of the host–microbe interface." *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 3.2 (2017): 138-149.

Hjort, Karin, et al. "Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365.1541 (2010): 713-727.

Holthaus, David, et al. "Harmonization of protocols for multi-species organoid platforms to study the intestinal biology of *Toxoplasma gondii* and other protozoan infections." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2021): 935.

Holthaus, David, et al. "Dissection of barrier dysfunction in organoid-derived human intestinal epithelia induced by *Giardia duodenalis*." *Gastroenterology* (2021).

Hooper, Nigel M., ed. *Zinc metalloproteases in health and disease*. CRC Press, 1996.

Huang, Zhen, et al. "A 3-D artificial colon tissue mimic for the evaluation of nanoparticle–based drug delivery system." *Molecular pharmaceutics* 11.7 (2014): 2051-2061.

Hughes, Chris S., Lynne M. Postovit, and Gilles A. Lajoie. "Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture." *Proteomics* 10.9 (2010): 1886-1890.

Huston, Christopher D., et al. "Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*." *Infection and immunity* 71.2 (2003): 964-972.

Irmer, Henriette, et al. "Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity." *Molecular microbiology* 72.3 (2009): 658-667.

Isibasi, A., et al. "Immunochemical differences in the surface polysaccharides obtained from *Entamoeba histolytica* strain HM1: IMSS and its virulent (CA) and non-virulent (L-6) clones." *Archivos de Investigacion Medica* 21 (1990): 175-181.

Isnard, Amandine, Marina Tiemi Shio, and Martin Olivier. "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2 (2012): 72.

Jacobs, Thomas, et al. "Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*." *Molecular microbiology* 27.2 (1998): 269-276.

## Literaturverzeichnis

Jalili-Firoozinezhad, Sasan, et al. "A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip." *Nature biomedical engineering* 3.7 (2019): 520-531.

Janeway, Charles A. "How the immune system works to protect the host from infection: a personal view." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.13 (2001): 7461-7468.  
Kaur, Gursharan, and Anuradha Lohia. "Inhibition of gene expression with double strand RNA interference in *Entamoeba histolytica*." *Biochemical and biophysical research communications* 320.4 (2004): 1118-1122.

Kim, Hyun Jung, et al. "Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.1 (2016): E7-E15.

Knobloch, Jürgen, and Erich Mannweiler. "Development and persistence of antibodies to *Entamoeba histolytica* in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 32.4 (1983): 727-732.

König, Constantin, et al. "Taxon-specific proteins of the pathogenic entamoeba species *E. histolytica* and *E. nuttalli*." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11 (2021): 226.

Kraft, Martin, et al. "Dissection of barrier dysfunction in organoid-derived human intestinal epithelia induced by *Giardia duodenalis*." *bioRxiv* (2020).

Kulkarni, Manjusha M., et al. "The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing." *Molecular microbiology* 62.5 (2006): 1484-1497.

Kulkarni, Manjusha M., et al. "Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation." *Infection and immunity* 76.4 (2008): 1738-1747.

LaCount, Douglas J., et al. "Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes." *Journal of Biological Chemistry* 278.27 (2003): 24658-24664.

Laemmli, Ulrich Karl. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *nature* 227.5259 (1970): 680-685.

Leippe, Matthias, et al. "Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore bacterial cytoplasmic membranes." *Molecular microbiology* 14.5 (1994): 895-904.

Leippe, M. "Amoebapores." *Parasitology Today* 13.5 (1997): 178-183.

Lejeune, Manigandan, France Moreau, and Kris Chadee. "Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions." *The American journal of pathology* 179.2 (2011): 807-818.

## Literaturverzeichnis

Lender, Sarah Corinna. „Genetische Manipulation des protozoischen Parasiten *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) zur Charakterisierung putativer Pathogenitätsfaktoren.“ Dissertation (2019) Universität Hamburg.

Leroy, Ancy, et al. "Entamoeba histolytica disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers." *The FASEB Journal* 14.9 (2000): 1139-1146.

Li, Ellen, et al. "Entamoeba histolytica interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells." *Infection and Immunity* 62.11 (1994): 5112-5119.

Li, Ellen, et al. "Interaction of laminin with Entamoeba histolytica cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis." *Infection and immunity* 63.10 (1995): 4150-4153.

Lidell, Martin E., et al. "Entamoeba histolytica cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.24 (2006): 9298-9303.

Loftus, Brendan, et al. "The genome of the protist parasite Entamoeba histolytica." *Nature* 433.7028 (2005): 865-868.

Lotter, Hannelore, et al. "Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from Entamoeba histolytica are critically important to control amebic liver abscess." *PLoS pathogens* 5.5 (2009): e1000434.

Lösch, F. "Massenhafte entwicklung von amöben im dickdarm." *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 65.2 (1875): 196-211.

Lucius, Richard, and Brigitte Loos-Frank. *Allgemeine Aspekte der Biologie von Parasiten*. Springer Berlin Heidelberg, 2008.

Luu, Lisa, et al. "An open-format enteroid culture system for interrogation of interactions between Toxoplasma gondii and the intestinal epithelium." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (2019): 300.

Mahe, Maxime M., et al. "Establishment of human epithelial enteroids and colonoids from whole tissue and biopsy." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 97 (2015): e52483.

Mansfeld, Johanna. "Metalloproteases." *Industrial enzymes*. Springer, Dordrecht, 2007. 221-242.

Maldonado-Bernal, C., et al. "The innate immune response to Entamoeba histolytica lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4." *Parasite immunology* 27.4 (2005): 127-137.

Maldonado, Carmen, et al. "Lipophosphopeptidoglycan of Entamoeba histolytica induces an antiinflammatory innate immune response and downregulation of toll-like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes." *Archives of Medical Research* 4.31 (2000): S71-S73.

Mar-Aguilar, Fermín, et al. "Identification and characterization of microRNAs from *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS." *PLoS One* 8.7 (2013): e68202.

Martínez-Castillo, Moisés, et al. "Flavonoids as a natural treatment against *Entamoeba histolytica*." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8 (2018): 209.

Martinez-Palomo, Adolfo, et al. "Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica* 1." *The Journal of protozoology* 32.1 (1985): 166-175.

Martorelli Di Genova, Bruno, et al. "Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction." *PLoS biology* 17.8 (2019): e3000364.

Matthiesen, Jenny. „Charakterisierung des pathogenen Phänotyps von *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903).“ Dissertation (2012) Universität Hamburg.

Matthiesen, Jenny, et al. "Overexpression of specific cysteine peptidases confers pathogenicity to a nonpathogenic *Entamoeba histolytica* clone." *MBio* 4.2 (2013): e00072-13.

Matthiesen, Jenny, et al. "Trigger-induced RNAi gene silencing to identify pathogenicity factors of *Entamoeba histolytica*." *The FASEB Journal* 33.2 (2019): 1658-1668.

McCauley, Heather A., and James M. Wells. "Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish." *Development* 144.6 (2017): 958-962.

Mehlhorn, Heinz. *Die Parasiten des Menschen: Erkrankungen erkennen, bekämpfen und vorbeugen*. Springer-Verlag, 2012.

Meyer, Martin, 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 pathogens* 12.8 (2016): e1005853.

Mi, Huaiyu, et al. "PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API." *Nucleic acids research* 49.D1 (2021): D394-D403.

Mi-Ichi, Fumika, Hiroki Yoshida, and Shinjiro Hamano. "*Entamoeba* encystation: new targets to prevent the transmission of amebiasis." *PLoS pathogens* 12.10 (2016): e1005845.

Moon, Clara, et al. "Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis." *Mucosal immunology* 7.4 (2014): 818-828.

Morf, Laura, et al. "Robust gene silencing mediated by antisense small RNAs in the pathogenic protist *Entamoeba histolytica*." *Nucleic acids research* 41.20 (2013): 9424-9437.

Moss, Joseph Anthony. "Waterborne pathogens: The protozoans." *Radiologic Technology* 88.1 (2016): 27-48.

Mosser, D. M., and A. Brittingham. "Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation." *Parasitology* 115.7 (1997): 9-23.

Nagase, Hideaki. "Metalloproteases." *Current protocols in protein science* 24.1 (2001): 21-4.

Nakada-Tsukui, Kumiko, and Tomoyoshi Nozaki. "AGC family kinase 1 participates in trogocytosis but not in phagocytosis in *Entamoeba histolytica*." *Nature communications* 8.1 (2017): 1-12.

Nakada-Tsukui, Kumiko, et al. "AIG1 affects in vitro and in vivo virulence in clinical isolates of *Entamoeba histolytica*." *PLoS pathogens* 14.3 (2018): e1006882.

Nozaki, Tomoyoshi, and Alok Bhattacharya, eds. *Amebiasis: biology and pathogenesis of Entamoeba*. Springer, 2014.

Nurkanto, Arif, et al. "Characterization and validation of *Entamoeba histolytica* pantothenate kinase as a novel anti-amebic drug target." *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 8.1 (2018): 125-136.

Oesch, Franz, and Michael Arand. "Xenobiotic metabolism." *Toxicology*. Academic Press, 1999. 83-109.

Pageot, Louis-Philippe, et al. "Human cell models to study small intestinal functions: Recapitulation of the crypt-villus axis." *Microscopy research and technique* 49.4 (2000): 394-406.

Pawlowski, Jan, et al. "CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms." *PLoS biology* 10.11 (2012): e1001419.

Penuliar, Gil M., Kumiko Nakada-Tsukui, and Tomoyoshi Nozaki. "Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance." *Frontiers in microbiology* 6 (2015): 354.

Petri, W. A., et al. "Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*." *Journal of Biological Chemistry* 264.5 (1989): 3007-3012.

Petri Jr, William A., and Ronald L. Schnaar. "[9] Purification and characterization of galactose- and N-acetylgalactosamine-specific adhesin lectin of *Entamoeba histolytica*." *Methods in enzymology*. Vol. 253. Academic Press, 1995. 98-104.

Petri Jr, William A., Rashidul Haque, and Barbara J. Mann. "The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*." *Annual Reviews in Microbiology* 56.1 (2002): 39-64.

Powell, S. J., et al. "Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess." *The Lancet* 288.7477 (1966): 1329-1331.

Putzbach, William, et al. "DISE: A seed-dependent RNAi off-target effect that kills cancer cells." *Trends in cancer* 4.1 (2018): 10-19.

Quincke, H., and Ernst Roos. "Ueber amoeben-enteritis." *Wien Med Wchnschr* 30 (1893): 1089-1094.

Ralston, Katherine S., and William A. Petri Jr. "Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*." *Trends in parasitology* 27.6 (2011): 254-263.

Ralston, Katherine S., et al. "Trogocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion." *Nature* 508.7497 (2014): 526-530.

Ralston, Katherine S. "Chew on this: amoebic trogocytosis and host cell killing by *Entamoeba histolytica*." *Trends in parasitology* 31.9 (2015): 442-452.

Ravdin, JONATHAN I., et al. "Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*." *Infection and immunity* 56.6 (1988): 1505-1512.

Rawlings, Neil D., and Alan J. Barrett. "Evolutionary families of peptidases." *Biochemical Journal* 290.1 (1993): 205-218.

Rawlings, Neil D., et al. "The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database." *Nucleic acids research* 46.D1 (2018): D624-D632.

Reuber, T. Lynne, and Frederick M. Ausubel. "Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes." *The Plant Cell* 8.2 (1996): 241-249.

Roncarolo, Maria Grazia, et al. "Type 1 T regulatory cells." *Immunological reviews* 182.1 (2001): 68-79.

Ruiz, Pedro A., et al. "IL-10 gene-deficient mice lack TGF- $\beta$ /Smad signaling and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells after the colonization with colitogenic *Enterococcus faecalis*." *The Journal of Immunology* 174.5 (2005): 2990-2999.

Salles, José Maria, Luis Alberto Moraes, and Mauro Costa Salles. "Hepatic amebiasis." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7.2 (2003): 96-110.

Sato, Toshiro, et al. "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche." *Nature* 459.7244 (2009): 262-265.

Sato, Toshiro, et al. "Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts." *Nature* 469.7330 (2011): 415-418.

Sato, Toshiro, et al. "Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium." *Gastroenterology* 141.5 (2011): 1762-1772.

Schaudinn, Fritz. "Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden.(Vorläufige Mittheilung)." *Arb. Kaiserlichen Gesundheitsamte* 19 (1903): 547-576.

Scholze, Henning, and Egbert Tannich. "[35] Cysteine endopeptidases of *Entamoeba histolytica*." *Methods in enzymology*. Vol. 244. Academic Press, 1994. 512-523.

Schröder, Martin, and Randal J. Kaufman. "The mammalian unfolded protein response." *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005): 739-789.

Schwerbrock, Nicole MJ, et al. "Interleukin 10-deficient mice exhibit defective colonic Muc2 synthesis before and after induction of colitis by commensal bacteria." *Inflammatory bowel diseases* 10.6 (2004): 811-823.

Sen, Abhik, et al. "The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of *Entamoeba histolytica* is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress." *Eukaryotic Cell* 6.4 (2007): 664-673.

Seydel, Karl B., et al. "Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine." *Gastroenterology* 115.6 (1998): 1446-1453.

Shin, Woojung, and Hyun Jung Kim. "Pathomimetic modeling of human intestinal diseases and underlying host-gut microbiome interactions in a gut-on-a-chip." *Methods in Cell Biology*. Vol. 146. Academic Press, 2018. 135-148.

Shirley, Debbie-Ann T., Koji Watanabe, and Shannon Moonah. "Significance of amebiasis: 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut." *PLoS neglected tropical diseases* 13.11 (2019): e0007744.

Simian, Marina, and Mina J. Bissell. "Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions." *Journal of Cell Biology* 216.1 (2017): 31-40.

Singleton, P. (2006). *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 3rd Edition, revised. John Wiley & Sons S. 32.

Stanley Jr, Samuel L., et al. "Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice." *Infection and Immunity* 63.4 (1995): 1587-1590.

Stanley Jr, Samuel L. "Amoebiasis." *The lancet* 361.9362 (2003): 1025-1034.

Suresh, Susmitha, et al. "Development of RNA interference trigger-mediated gene silencing in *Entamoeba invadens*." *Infection and Immunity* 84.4 (2016): 964-975.

Talamás-Rohana, Patricia, and Amelia Ríos. "Actin stress fibers in *Entamoeba histolytica* induced by fibronectin." *Archives of Medical Research* 31.4 (2000): S131.

Tannich, Egbert, Frank Ebert, and Rolf D. Horstmann. "Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.5 (1991): 1849-1853.

Teixeira, Jose E., et al. "Control of *Entamoeba histolytica* adherence involves metalloproteinase 1, an M8 family surface metalloproteinase with homology to leishmanolysin." *Infection and immunity* 80.6 (2012): 2165-2176.

Thibeaux, Roman, et al. "Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon." *PLoS Pathogens* 9.12 (2013): e1003824.

Tillack, Manuela, 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*." *Molecular and biochemical parasitology* 149.1 (2006): 58-64.

Tillack, Manuela, et al. "The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes." *BMC genomics* 8.1 (2007): 1-15.

Tovar, Jorge, Anke Fischer, and C. Graham Clark. "The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*." *Molecular microbiology* 32.5 (1999): 1013-1021.

Underhill, David M., and Adrian Ozinsky. "Toll-like receptors: key mediators of microbe detection." *Current opinion in immunology* 14.1 (2002): 103-110.

VanDussen, Kelli L., et al. "Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays." *Gut* 64.6 (2015): 911-920.

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

Vayssié, Laurence, et al. "Double-stranded RNA mediates homology-dependant gene silencing of  $\gamma$ -tubulin in the human parasite *Entamoeba histolytica*." *Molecular and biochemical parasitology* 138.1 (2004): 21-28.

Verner, Zdeněk, et al. "Anaerobic peroxisomes in *Entamoeba histolytica* metabolize myo-inositol." *PLoS pathogens* 17.11 (2021): e1010041.

Vicente, João B., et al. "*Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis." *Cellular microbiology* 11.1 (2009): 51-69.

Wang, Yuli, et al. "Formation of human colonic crypt array by application of chemical gradients across a shaped epithelial monolayer." *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 5.2 (2018): 113-130.

Warschkau, David, et al. "From 3D to 2D: Harmonization of Protocols for Two-dimensional Cultures on Cell Culture Inserts of Intestinal Organoids from Various Species." *Bio-protocol* 12.2 (2022): e4295-e4295.

Weber, Christian, et al. "Stress by heat shock induces massive down regulation of genes and allows differential allelic expression of the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*." *Eukaryotic Cell* 5.5 (2006): 871-875.

Weedall, Gareth D., and Neil Hall. "Evolutionary genomics of *Entamoeba*." *Research in Microbiology* 162.6 (2011): 637-645.

Wertheim, Heiman FL, Peter Horby, and John P. Woodall, eds. *Atlas of human infectious diseases*. John Wiley & Sons, 2012.

Wilke, Georgia, et al. "A stem-cell-derived platform enables complete *Cryptosporidium* development in vitro and genetic tractability." *Cell host & microbe* 26.1 (2019): 123-134.

Williamson, Ian A., et al. "A high-throughput organoid microinjection platform to study gastrointestinal microbiota and luminal physiology." *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 6.3 (2018): 301-319.

Wuerz, Terry, et al. "A review of amoebic liver abscess for clinicians in a nonendemic setting." *Canadian Journal of Gastroenterology* 26.10 (2012): 729-733.

Yao, Chaoqun, John E. Donelson, and Mary E. Wilson. "The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function." *Molecular and biochemical parasitology* 132.1 (2003): 1-16.

Zhang, Hanbang, et al. "Small RNAs with 5'-polyphosphate termini associate with a Piwi-related protein and regulate gene expression in the single-celled eukaryote *Entamoeba histolytica*." *PLoS pathogens* 4.11 (2008): e1000219.

Zhang, Hanbang, Justine M. Pompey, and Upinder Singh. "RNA interference in *Entamoeba histolytica*: implications for parasite biology and gene silencing." *Future microbiology* 6.1 (2011): 103-117.

Zhang, Xiaochun, et al. "Expression of amoebapores is required for full expression of *Entamoeba histolytica* virulence in amebic liver abscess but is not necessary for the induction of inflammation or tissue damage in amebic colitis." *Infection and immunity* 72.2 (2004): 678-683.

Zhang, Zhi, 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." *Infection and immunity* 71.9 (2003): 5355-5359.

Zhou, Pengfei, et al. "IL-10 modulates intestinal damage and epithelial cell apoptosis in T cell-mediated enteropathy." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287.3 (2004): G599-G604.

## Publikationen

**König, C.**, Meyer, M., Lender, C., Nehls, S., Wallaschkowski, T., Holm, T., Matthies, T., Lercher, D., Matthiesen, J., Fehling, H., Roeder, T., Reindl, S., Rosenthal, M., Metwally, N. G., Lotter, H. & Bruchhaus, I. (2020). An Alcohol Dehydrogenase 3 (ADH3) from *Entamoeba histolytica* Is Involved in the Detoxification of Toxic Aldehydes. *Microorganisms*, *8*(10), 1608.

**König, C.**, & Bruchhaus, I. (2020). Gene Silencing and Overexpression to Study Pathogenicity Factors of *Entamoeba histolytica*. In *Eukaryome Impact on Human Intestine Homeostasis and Mucosal Immunology* (pp. 311-325). Springer, Cham.

**König, C.**, Honecker, B., Wilson, I. W., Weedall, G. D., Hall, N., Roeder, T., Metwally, N. G. & Bruchhaus, I. (2021). Taxon-specific proteins of the pathogenic entamoeba species *E. histolytica* and *E. nuttalli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 226.

Verner, Z., Žárský, V., Le, T., Narayanasamy, R. K., Rada, P., Rozbeský, D., Makki, A., Beliřová, D., Hrdý, I., Vancová, M., Lender, C., **König, C.**, Bruchhaus, I. & Tachezy, J. (2021). Anaerobic peroxisomes in *Entamoeba histolytica* metabolize myo-inositol. *PLoS pathogens*, *17*(11), e1010041.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Der Lebenszyklus von <i>E. histolytica</i>.</b>	3
<b>Abbildung 2: Übersicht der verwendeten <i>E. histolytica</i> Klone und deren Ursprung.</b>	5
<b>Abbildung 3: Übersicht der differentiell exprimierten Gene zwischen dem Klon A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> sowie Analyse der ALA-Formation des B2<sup>p</sup> EhMP8-2 Transfektanten.</b>	8
<b>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gene <i>ehi_200230</i> und <i>ehi_042870</i>, die jeweils für die Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 codieren.</b>	10
<b>Abbildung 5: Generierung eines intestinalen 2D-Organoidmodells.</b>	12
<b>Abbildung 6: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</b>	42
<b>Abbildung 7: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> mit und ohne E-64.</b>	43
<b>Abbildung 8: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten der Metalloprotease-Transfektanten des Klons A1<sup>np</sup> und Trophozoiten des Klons A1<sup>np</sup> mit Phenanthrolin.</b>	45
<b>Abbildung 9: TEER-Messungen der Co-Inkubation der 2D-Organoidkulturen mit Trophozoiten des Klons B2<sup>p</sup> mit Phenanthrolin und Trophozoiten des silencer B2<sup>EhMP8-1 Si</sup>.</b>	46
<b>Abbildung 10: IFA Aufnahmen der 2D-Organoidkulturen nach 8 Stunden der Co-Inkubation mit Trophozoiten der beiden Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</b>	47
<b>Abbildung 11: Darstellung der, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	50
<b>Abbildung 12: GO-Netzwerke der zehn am signifikantesten, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	51
<b>Abbildung 13: Darstellung der, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	52
<b>Abbildung 14: GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	53
<b>Abbildung 15: Darstellung der, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	54
<b>Abbildung 16: GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	55
<b>Abbildung 17: Darstellung der, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten Zellprozesse der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	57
<b>Abbildung 18: GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 8 Stunden mit Trophozoiten inkubierten Organoidzellen.</b>	58
<b>Abbildung 19: GO-Netzwerke der 10 (A1<sup>np</sup>=9) am signifikantesten, durch die hochregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubierten Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</b>	60
<b>Abbildung 20: GO-Netzwerke der 10 (B2<sup>p</sup>=6) am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 4 Stunden mit Organoidzellen inkubierten Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</b>	61
<b>Abbildung 21: Kreisdiagramme der durch die signifikant hochregulierten Gene repräsentierten Stoffwechselwege der Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.</b>	62
<b>Abbildung 22 GO-Netzwerke der 10 am signifikantesten, durch die runterregulierten Gene überrepräsentierten, Stoffwechselwege der über 8 Stunden mit Organoidzellen inkubierten Trophozoiten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</b>	63
<b>Abbildung 23: Vergleiche der mRNA reads von signifikant hochregulierten Cysteinproteasengenen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.</b>	64
<b>Abbildung 24: Vergleiche der mRNA reads von signifikant hoch- und runterregulierten Lektinengen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 4 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.</b>	65
<b>Abbildung 25: Vergleiche der mRNA reads von signifikant hoch- und runterregulierten Cysteinproteasengenen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.</b>	66
<b>Abbildung 26: Vergleiche der mRNA reads von signifikant runterregulierten Lektinengen der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> nach 8 Stunden Co-Inkubation mit Organoidzellen.</b>	67
<b>Abbildung 27: Relative mRNA Konzentration des Genes <i>ehi_042870</i> in dem Transfektanten B2<sup>EhMP8-2 ÜE</sup>.</b>	70

<i>Abbildung 28: Anzahl der mRNA reads der beiden Gene ehi_200230 und ehi_042870 in den Metalloprotease-Transfektanten und Kontrollen.</i>	71
<i>Abbildung 29: Lytische Aktivität der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> gegenüber HepG2 Zellen.</i>	72
<i>Abbildung 30: Zytopathischer Effekt der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> auf HepG2 Zellen.</i>	73
<i>Abbildung 31: Cysteinproteaseaktivität der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup> in mU/mg.</i>	74
<i>Abbildung 32: Substratgele der Lysate der Metalloprotease-Transfektanten der Klone A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</i>	75
<i>Abbildung 33: Anzahl an differentiell exprimierten Genen in den Metalloprotease silencern im Vergleich zu den Wildtypen (WT) A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</i>	76
<i>Abbildung 34: Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene in den Metalloprotease silencern des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup>.</i>	77
<i>Abbildung 35: Vergleich der mRNA reads von signifikant runterregulierten Cysteinproteasengenegenen der Metalloproteasen silencer im Vergleich zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</i>	78
<i>Abbildung 36: Vergleich der mRNA reads von signifikant runterregulierten Gal/GalNAc-Lektin Untereinheiten der Metalloproteasensilencer im Vergleich zu A1<sup>np</sup> und B2<sup>p</sup>.</i>	78
<i>Abbildung 37: Mikroskopische Analyse von Trophozoiten der Myc-Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 mittels anti-Myc Antikörper.</i>	79
<i>Abbildung 38: Mikroskopische Analyse von Trophozoiten der Myc-Transfektanten des nicht-pathogenen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloproteasen EhMP8-1 und EhMP8-2 mittels anti-Myc Antikörper.</i>	80
<i>Abbildung 39: Einzelbilder der konfokalen Mikroskopaufnahmen eines Trophozoiten des Myc-Transfektanten des nicht-pathogen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloprotease EhMP8-1 mittels anti-Myc Antikörper.</i>	82
<i>Abbildung 40: Einzelbilder der konfokalen Mikroskopaufnahmen eines Trophozoiten des Myc-Transfektanten des nicht-pathogen Klons A1<sup>np</sup> zur Lokalisation der Metalloprotease EhMP8-2 mittels anti-Myc Antikörper.</i>	83

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Herstellern _____	14
<b>Tabelle 2:</b> Auflistung der verwendeten Enzyme und Reaktionspuffer mit Herstellern _____	15
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung der verwendeten Antikörper mit Herstellern und Verwendung _____	16
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung der verwendeten Reaktionskits mit Herstellern _____	16
<b>Tabelle 5:</b> Auflistung der verwendeten Geräte mit Herstellern _____	17
<b>Tabelle 6:</b> Auflistung der verwendeten Software mit Herstellern _____	18
<b>Tabelle 7:</b> Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellern _____	18
<b>Tabelle 8:</b> Auflistung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit Herstellern _____	19
<b>Tabelle 9:</b> Auflistung der verwendeten Marker und Ladepuffer mit Herstellern _____	19
<b>Tabelle 10:</b> Auflistung der verwendeten Plasmide mit Referenzen _____	19
<b>Tabelle 11:</b> Auflistung der verwendeten Oligonukleotide _____	20
<b>Tabelle 12:</b> Auflistung der verwendeten Transfektanten _____	24
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für ein 10%iges Polyacrylamidgel _____	28
<b>Tabelle 14:</b> Anzahl an differentiell exprimierten Genen der 2D-Organoidzellen nach Co-Inkubation mit Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> ( $p_{adj} < 0,05$ , $foldchange > 1,8$ ). _____	48
<b>Tabelle 15:</b> Anzahl an differentiell exprimierten Genen der Trophozoiten von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> nach Co-Inkubation mit den 2D-Organoidkulturen ( $p_{adj} < 0,05$ , $foldchange > 1,8$ ). _____	59
<b>Tabelle 16:</b> Anzahl an differentiell exprimierten Genen der im Transwell-System inkubierten Trophozoiten von A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> im Vergleich zum WT ( $p_{adj} < 0,05$ , $foldchange > 1,8$ ). _____	67
<b>Tabelle 17:</b> Signifikant hochregulierte Gene der klassischen Pathogenitätsfaktoren in den Trophozoiten der Klone A1 <sup>np</sup> und B2 <sup>p</sup> nach 4 Stunden Inkubation im Transwell-System _____	68

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Iris Bruchhaus dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen.

Liebe Iris, vielen Dank für das Vertrauen in mich, die großartige und umfangreiche Betreuung sowie die konstruktive Kritik und Unterstützung. Ich konnte vieles lernen und meinen wissenschaftlichen Horizont erweitern.

Prof. Dr. Esther Schnettler danke ich für Übernahme der Rolle meiner Zweitgutachterin.

Prof Dr. Tim-Wolf Gilberger und Prof Dr. Hanna Lotter danke ich für den Beisitz in meiner Prüfungskommission.

Dr. Anton Aebischer vom Robert Koch-Institut in Berlin danke ich für die Möglichkeit, meine spannende Arbeit mit den Organoiden in dem Kreis seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Christian Klotz und Dr. David Holthaus.

Lieber Christian, vielen Dank für nette Betreuung während meiner Aufenthalte in Berlin. Ich habe mich sehr wohl in eurer Arbeitsgruppe gefühlt und konnte neben tollen und spannenden Ergebnissen vieles für mich mitnehmen.

Lieber David, vielen Dank für die großartige Unterstützung bei meinen Experimenten. Ohne dein Wissen über die Orgis und dein Engagement, hätte ich nicht so super Ergebnisse erzielen können.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, der AG Bruchhaus für den freundlichen Umgang, die Hilfsbereitschaft und viele unvergessliche Momente bedanken. Ihr habt es einem immer leicht gemacht, gerne zur Arbeit zu kommen.

Besonderer Dank gilt dabei Susann und Jana für die wunderbare Zeit in Labor 5. Ob fachliche Diskussionen, experimentelle Unterstützung oder reger Austausch über private Probleme und Freuden, es war immer schön mit euch. Danke für das zweite Zuhause in Labor 5.

Ich danke außerdem meiner Masterstudentin Sarah, meinem Bachelorstudent Arne sowie meinen beiden Praktikanten Anuja und Maxi. Eure Arbeiten und Projekte haben meine Doktorarbeit wesentlich unterstützt.

Der wohl größte Dank gilt meinen Eltern Regina und Roland Köbrig, die mir meine Promotion ermöglicht haben und mich auf meinem gesamten Lebensweg immer unterstützt haben. Eure Liebe und Glaube in mich hat das alles erst möglich gemacht. Danke Mama und Papa.

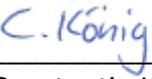
Meine Jasmin, Dir danke ich dafür, dass Du immer für mich da warst und mich, vor allem in der Endphase, immer ertragen und liebevoll unterstützt hast. Ohne Dich und Deine Liebe wäre das alles viel schwerer gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 03. März 2022

  
\_\_\_\_\_  
Constantin König