

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Monika Novotná**

**Virulenční faktory *Entamoeba histolytica***

Virulence factors of *Entamoeba histolytica*

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Zdeněk Verner, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 16. 8. 2019

Monika Novotná

Podpis:

**Abstrakt:**

Parazitický prvok *Entamoeba histolytica* způsobuje střevní onemocnění nazývané měňavková úplavice neboli améboza, které patří mezi nejzávažnější celosvětová parazitární onemocnění vyskytující se převážně v rozvojových zemích. Cílem této bakalářské práce je shrnutí dosavadních poznatků o jednotlivých virulenčních faktorech *E. histolytica*. Jedná se především o adhezivní lektin Gal/GalNAc degradující cysteinové proteázy, fagocytózu apoptických buněk, amebapory tvořící póry v membránách cílových buněk a trogocytózu.

**Klíčová slova:** virulenční faktory, *Entamoeba histolytica*, parazit, prvok, améboza, lektin Gal/GalNAc, cysteinové proteázy, fagocytóza, trogocytóza, amebapor

**Abstract:**

The parasitic protist *Entamoeba histolytica* causes intestinal disease called amoebiasis (amoebic dysentery), which is one of the most significant diseases worldwide, mainly in developing countries. The goal of this bachelor thesis is to summarize current knowledge about virulence factors of *E. histolytica*. It is primarily focused on adhesive lectin Gal/GalNAc, cysteine proteases, phagocytosis of apoptotic cells, amoebapore forming pores in the membranes of the target cells and trogocytosis.

**Keywords:** virulence factors, *Entamoeba histolytica*, parasite, protist, amoebiasis, lectin Gal/GalNAc, cysteine proteinase, phagocytosis, trogocytosis, amoebapore

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Virulenční faktory <i>Entamoeba histolytica</i> .....	4
2.1	Lektin Gal/GalNAc.....	4
2.2	Fagocytóza.....	7
2.3	Migrace v hostiteli .....	9
2.4	Cysteinové proteázy .....	10
2.5	Železo .....	12
2.6	Amebapory .....	14
2.7	Trogocytóza .....	15
3	Závěr .....	19
4	Použitá literatura .....	20

## Seznam použitých zkratek:

AP – amoebapore (amebapor)

Con-A – concanavalin A (konkanavalin A)

CP – cysteine proteinase (cysteinová proteáza)

DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

ECM – extracellular matrix (extracelulární matrix)

Ehhmbp26 - *E. histolytica* hemoglobin-binding protein 26 (protein vázající hemoglobin 26)

Ehhmbp45 – *E. histolytica* hemoglobin-binding protein 45 (protein vázající hemoglobin 45)

Gal/GalNAc – galaktose/N-acetylgalactosamine (galaktóza/N-acetylgalaktosamin)

GPI – glycosylphosphatidylinositol (glykosylfosfatidylinositol)

Hgl – heavy subunit lectin (těžká podjednotka lektinu)

IgA – immunoglobulin A (Imunoglobulin A)

IgG – immunoglobulin G (Imunoglobulin G)

Igl – intermediate subunit lectin (intermediální podjednotka lektinu)

IL – interleukin

Lfbp – lactoferrin binding proteins (protein vázající laktoferin)

Lgl – light subunit lectin (lehká podjednotka lektinu)

MAC – membrane attack complex (komplex membránového útoku)

MIF – macrophage migration inhibitory factor (faktor inhibující migraci makrofágů)

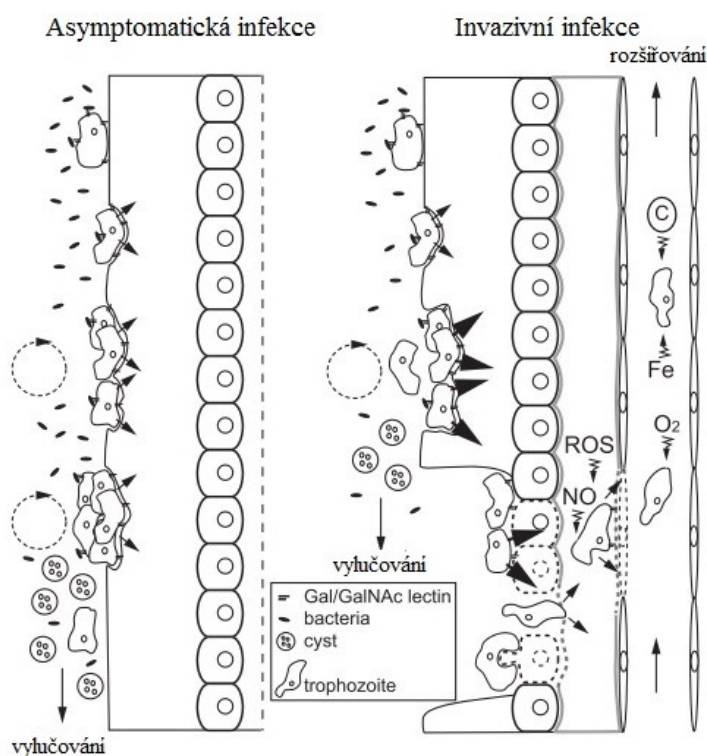
MMP – matrix metalloproteinase (matrixové metaloproteináza)

ROM – rhomboid protease (rhomboidní proteáza)

TNF – tumor necrosis factor (faktor nádorové nekrózy)

# 1 Úvod

*Entamoeba histolytica* je parazitický prvok, který patří do říše Amoebozoa. Je to anaerobní parazit v tlustém střevě člověka, který způsobuje měňavkovou úplavici (dysentérii) neboli amébozu. Při střevní infekci se příznaky objevují přibližně u 10 % nakažených lidí, zbytek bývá asymptomatický (Walsh, 1986). Při invazivní infekci napadají améby mukózu a submukózu a mohou se rozšířit ze střeva i do dalších orgánů (viz obr. 1.). Extraintestinální améboza nejčastěji postihuje játra, kde vytváří amébové abscesy, které bývají bez lékařské pomoci fatální. V dalších případech může zasáhnout plíce nebo mozek (Reed, 1992).

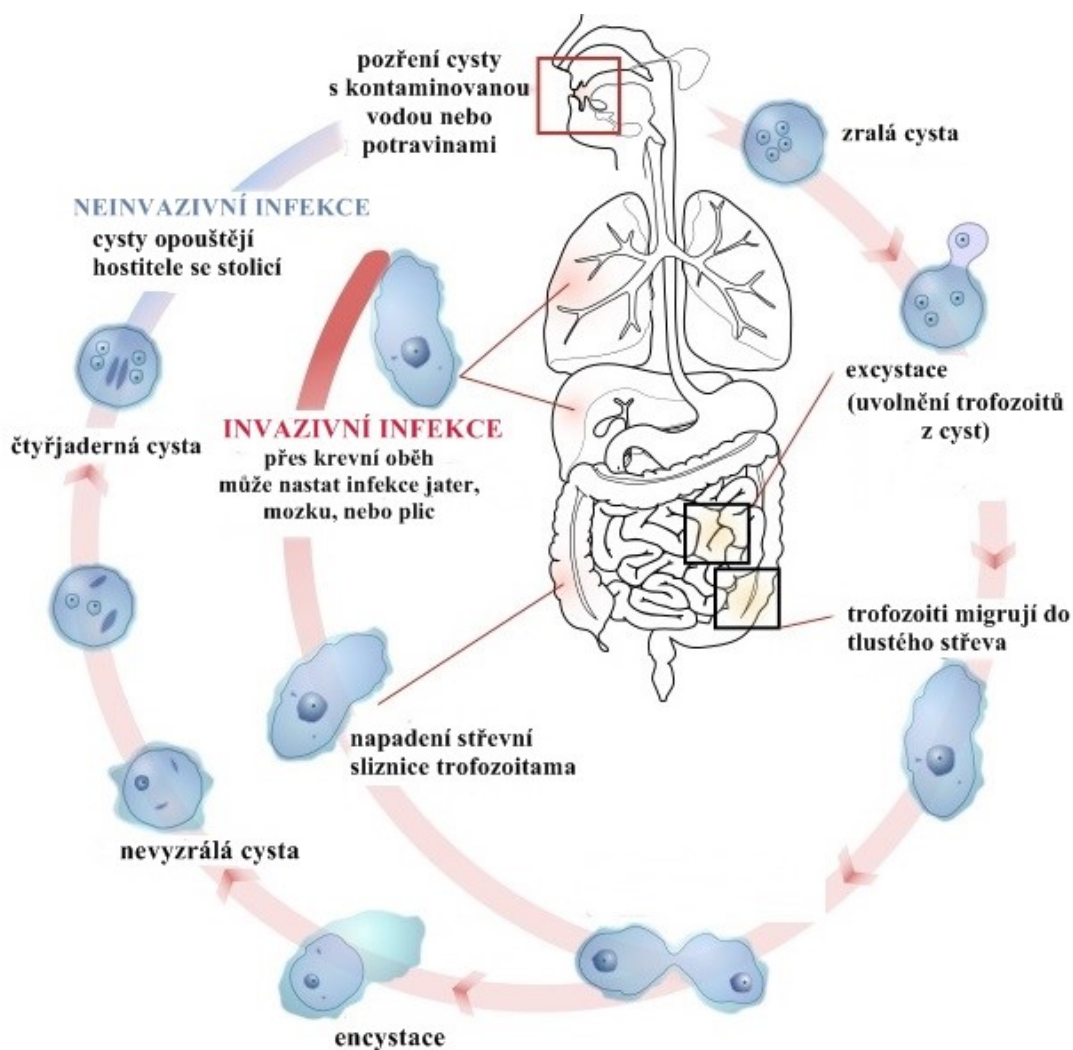


Obr. 1. Asymptomatická a invazivní infekce *E. histolytica* (Faust and Guillen, 2012)

Odhaduje se 500 milionů infikovaných jedinců a více než 100 tisíc úmrtí ročně (Walsh, 1986; WHO, 1997). S těmito údaji zaujímá améboza třetí místo v nejčastějších onemocněních způsobených parazity hned po malárii a schistosomóze (Walsh, 1986). *E. histolytica* se nejvíce vyskytuje v rozvojových zemích (Mexiko, Vietnam, Indie, Egypt), v hyperendemických oblastech, kde převládá nižší hygienický standart a vlhké, teplé klima (Ximénez et al., 2009).

Do rodu *Entamoeba* vyskytujícího se u člověka řadíme 7 druhů: *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. bangladeshi*, *E. coli*, *E. hartmanni* a *E. polecki*, které žijí v lidském střevě (Nguí et al., 2012; Royer et al., 2012). I když byly hlášeny případy lidské infekce *E. moshkovskii*, je tato améba primárně považována za volně žijící (Clark and Diamond, 1991). *E. dispar* je neinvazivní parazit, který je ve střevě člověka považován za komenzála (Diamond and Clark, 1993). *E. bangladeshi* je nově popsáný druh a jeho název odpovídá geografickému nálezu prvního pacienta, ze kterého byl izolován (Royer et al., 2012). Améba vyvolávající lidskou invazivní amébozu je pouze *E. histolytica*. Druhy *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* a *E. bangladeshi* mají morfologicky totožné formy trofozoitů a cyst (Ali et al., 2003; Clark and Diamond, 1991; Hamzah et al., 2006; Royer et al., 2012). Pomocí mikroskopu jsou nerozeznatelné, liší se až na molekulární úrovni. Pro jejich přesné rozlišení se používá polymerázová řetězová reakce (Khairnar and Parija, 2007). Většina studií, včetně sekvenace genomu, byla prováděna na kmeni HM1:IMSS, jehož kultivace probíhá od roku 1971, kdy byl tento kmen izolován z mexického pacienta, který měl střevní amébozu (de la Torre et al., 1971).

*E. histolytica* má pouze jednoho hostitele a tím je člověk. Životní cyklus je jednoduchý a skládá se ze dvou fází: z odolné cysty a pohyblivého trofozoita (viz obr. 2.). Trofozoiti jsou vegetativní formou, která se živí bakteriemi a dělí se. Hlavní způsob infekce je požití cysty, nejčastěji z kontaminované vody nebo potravin. V tenkém střevě dochází k její excystaci a následnému uvolnění trofozoitů do tlustého střeva. Trofozoiti se přichytí na mucin, který je produkován epitelíálními buňkami střeva. Zde se živí střevními bakteriemi, dělí se a vytváří cysty, které s výkaly opustí střevo člověka pro případnou infekci dalšího hostitele. Za určitých podmínek pronikají améby přes mukos a invadují mukózu a submukózu. Invaze zahrnuje lytické schopnosti parazita a zánětlivou reakci hostitele. Poté může améba vstoupit do krevního řečiště a proniknout přes endotel do jater, případně dalších orgánů (Santi-Rocca et al., 2009).



Obr. 2. Životní cyklus *E. histolytica* (Villarreal, 2008)

Virulence je vlastnost určitého patogena, která udává ve srovnání s ostatními stupeň patogenity, což je schopnost organismu vyvolat onemocnění. Jednotlivé kmeny jsou tedy různě virulentní. Důležitými faktory patogenity *E. histolytica* jsou adherence, cytotoxicita a celkové narušování tkání. Ve zmíněných procesech mají úlohu proteiny parazita, jako jsou lektiny, cysteinové proteázy a amebapory.

Cílem této bakalářské práce je přehledně shrnout doposud známé informace o virulenčních faktorech *E. histolytica*.



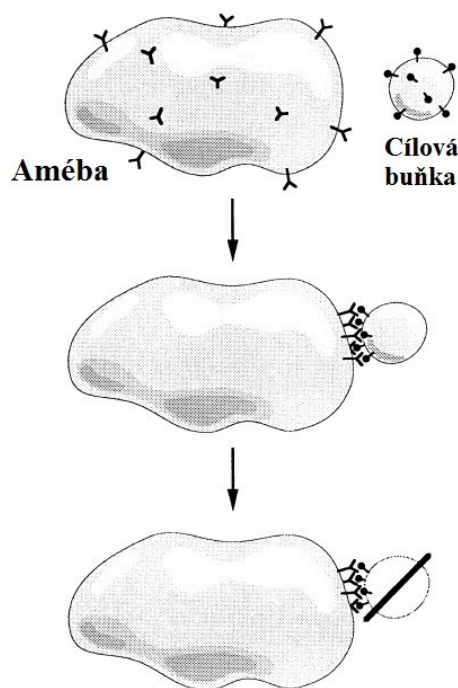
## 2 Virulenční faktory *Entamoeba histolytica*

### 2.1 Lektin Gal/GalNAc

Lektin Gal/GalNAc je multifunkční virulenční faktor vyskytující se na povrchu membrány améby. Hlavní funkcí je adherence. Podílí se také na cytolýze, invazi do buňky a encystaci. Heterodimerní glykoprotein Gal/GalNAc se skládá z těžké (Hgl) 170 kDa podjednotky spojené kovalentně disulfidickými vazbami s lehkou (Lgl) 35/31 kDa podjednotkou (McCoy et al., 1993; Petri et al., 1989; Tannich et al., 1991) a nekovalentně asociovanou intermediální podjednotkou (Igl) 150 kDa (Cheng et al., 2001).

Těžká podjednotka zajišťuje rozpoznávání sacharidů a s membránou améby je asociována pomocí transmembránové domény (McCoy et al., 1994a). Oproti tomu lehká a střední podjednotka se asociují s membránou pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI) (Cheng et al., 2001; McCoy et al., 1994a).

Trofozoiti *E. histolytica* zabíjejí hostitelské buňky při přímém kontaktu. K interakci dochází pomocí lektinu Gal/GalNAc, který je nazývaný inhibitorem hostitelských buněk. K inhibici dochází po rozeznání a navázání se na koncové zbytky oligosacharidů (galaktosa/N-acetyl-D-galaktosamin), ke kterým má lektin vysokou afinitu a které se nachází na glykoproteinech cílových buněk (viz obr. 3.). Po interakci způsobí améba změnu toku vápníku uvnitř cílové buňky, přičemž dojde ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku v cílové buňce (Ravdin et al., 1988). Tok vápníku může vést k aktivaci kalpainu a kaspázy 3 (Boettner and Petri, 2005; Ralston and Petri, 2011). Dále byla pozorována fragmentace DNA v cílových buňkách (Ragland et al., 1994). Nastávají i morfologické změny, ztráta cytoplazmatických granulí a celkové narušení membránové integrity (viz obr. 3.), které ukazují na spuštění kaspáza 3-závislé apoptózy, nastávající po 5-15 minutách od počáteční interakce (Mann, 2002).



Obr. 3. Inhibice cílových buněk závislá na interakci (McCoy et al., 1994b)

Při apoptóze nastává charakteristická povrchová změna cílové buňky, konkrétně jde o přemístění fosfatidylserinu (Fadok et al., 1992, 2001a). Fosfatidylserin je fosfolipid, který se za normálních podmínek vyskytuje pouze na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a při apoptóze se přesune na stranu vnější. Tím se spustí a usnadní rozpoznání a fagocytování amébou. Receptor entamoeby, který rozpoznává fosfatidylserin, má vysokou specifitu pro náboj a vyžaduje přítomnost polární části fosfatidylserinu (Huston et al., 2003).

Gal/GalNAc lektin je imunologicky významný protein, který působí jako receptor pro komplement. Blokuje jeho aktivitu, přesněji komplexu C5–C9, což je komplex, který formuje póry v cílových membránách (Lachmann, 1991; Rollins et al., 1991). Kromě toho lektin Gal/GalNAc sdílí sekvenční homology a aktivitu s glykoproteinem CD59. CD59 je inhibitor komplementu, který se vyskytuje navázaný na membráně lidských červených krvinek, které tak chrání před komplementem a případnou lyzí (Braga et al., 1992).

Těžká podjednotka lektinu je vysoce imunogenní, k jejímu uvolňování z plazmatické membrány dochází pomocí serinové rhomboidní proteázy *E. histolytica* (EhROM1), která těžkou podjednotku lektinu Gal/GalNAc v transmembránové doméně štěpí. Uvolnění těžké podjednotky Gal/GalNAc lektinu může interferovat s imunitní odpovědí hostitele namířenou proti amébám (Baxt et al., 2008).

*E. histolytica* má mechanismus zvaný „capping“, který využívá k neutralizaci některých faktorů imunitní odpovědi hostitele navázaných na svém povrchu. „Capping“ znamená počáteční shlukování a vázání povrchových receptorů do malých domén, zakrytí povrchových receptorů, likvidaci povrchových molekul, které již byly rozpoznány imunitním systémem, a přemístění těchto molekul do zadní části buňky, kde se posléze hromadí (Calderón et al., 1980). Tato polarizovaná zadní část améby se nazývá uroid. Capping může být indukován konkanalinem A (Con-A) nebo polyklonálními protilátkami (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo, 1994). V oblasti uroidu jsou obsazené povrchové receptory uvolňovány do extracelulárního prostoru. Lektin Gal/GalNAc je jednou z povrchových molekul, které se koncentrují v uroidní oblasti améby při působení Con-A (Arhets et al., 1995).

V tlustém střevě dochází pomocí lektinu k adhezi na mucin, který se nachází na střevním epitelu. Mucin tvoří fyzickou bariéru mezi střevním obsahem a podkladovými buňkami epitelu. Nejtlustší vrstva hlenu se nachází v tlustém střevě. Mucin působí jako síto a past pro mikroorganismy, a tím brání jejich přístupu k epitelu (Atuma et al., 2001). Ochranná funkce spočívá v opakované tvorbě a obnově hlenu z epiteliálních buněk a následnému posouvání dál do střeva, až dojde k jeho vyloučení při defekaci, čímž zachycuje komenzální i patogenní mikroorganismy, které s sebou odnáší ven z těla (Belley et al., 1999).

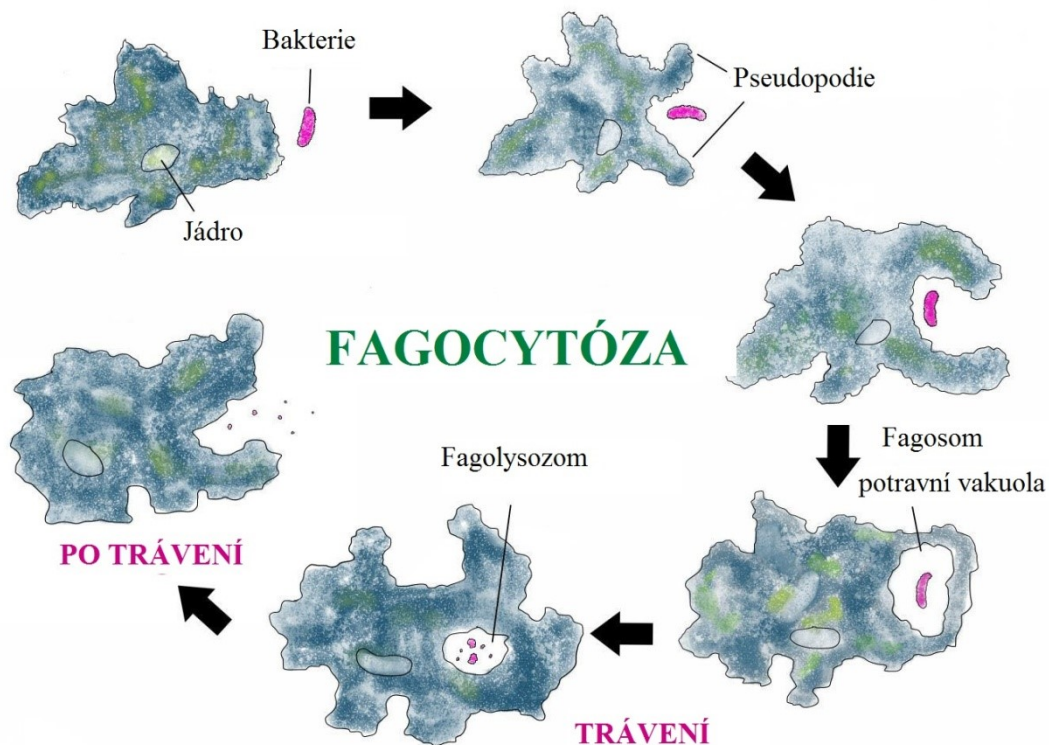
Mucin je souhrnný název pro glykoproteiny produkované střevními epiteliálními buňkami a jeho hlavní funkcí je ochrana trávicí sliznice. Glykoprotein MUC2 je bohatě glykosylovaný O-vázanými GalNAc zbytky a je hlavním glykoproteinem střevní sliznice (Gum et al., 1994; Herrmann et al., 2002). Kromě adherence trofozoitů k mucinu a epitelovým buňkám střeva dochází i k adhezi na leukocyty (makrofágy, neutrofilny), erytrocyty a buňky jater. Vše je závislé na interakci mezi hostitelskou buňkou a amébou. Jedná se o aktivní proces, při kterém dochází také k přenosu lektinu na hostitelskou buňku. Po pěti minutách od začátku kontaktu buněk je již zjištělná přítomnost lektinu na epiteliálních buňkách střeva (Petri et al., 2002).

## 2.2 Fagocytóza

*E. histolytica* je schopná fagocytovat bakterie, červené krvinky (erytrofagocytóza), buněčné zbytky a usmrcené buňky. Po rozeznání a navázání se na hostitelskou buňku a indukci apoptózy dochází k fagocytóze usmrcené hostitelské buňky a využití nebo degradaci pozřené materiálu. Fagocytóza hostitelských buněk je důležitým faktorem při invazi do hostitelských tkání. Pozorování zcela pozřených hostitelských buněk je ve světelném mikroskopu jediná charakteristická odlišnost mezi *E. histolytica* a nepatogenní *E. dispar* (González-Ruiz et al., 1994).

V apoptotické dráze u mnohobuněčných organismů je posledním krokem fagocytóza, která slouží k omezení zánětu tím, že zabrání úniku toxického intracelulárního materiálu z usmrcených buněk do extracelulárního prostředí organismu (Fadok et al., 2001b). Po usmrcení cílové buňky zahájí entamoeba proces fagocytózy a zcela ji pohltí, čímž dochází k odstraňování apoptotických buněk, což by mohlo podobně omezit zánětlivou reakci imunitního systému hostitele jako u mnohobuněčných organismů a umožnit amébě v pokračování a šíření infekce dále po hostiteli.

Lidské střevo obsahuje stovky druhů mikroorganismů, nejčastěji v komenzálním vztahu k hostiteli. Dobrý zdravotní stav člověka koreluje s vysokou biodiverzitou střevní mikrobiotické flóry, která je však velmi rozdílná; liší se dokonce i u dvojčat, která společně žijí ve stejném prostředí (Lozupone et al., 2012). Střevní bakteriální flóra hraje důležitou roli v biologii *E. histolytica*. Interakce mezi *E. histolytica* a střevními bakteriemi úzce souvisí nejenom s růstem améby, ale i s její virulencí a patogenitou (Mirelman, 1987). *E. histolytica* využívá střevní bakterie jako zdroj potravy. Přijímá je právě pomocí procesu fagocytózy (viz obr. 4.).



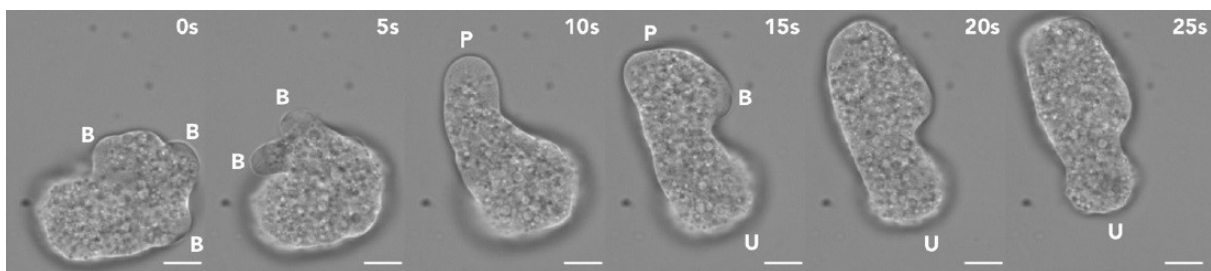
Obr. 4. Fagocytóza bakterií amébou (Taylor, 2015)

Bakteriální flóra na epiteliální straně střeva ovlivňuje invazivitu améby. Zdá se, že bakterie mohou mít pro trofozoity améb více využití než jen jako zdroj potravy. Bakterie jsou schopné ovlivnit, zda se z trofozoita stane odolná cysta, která umožní rozšíření a napadení dalšího hostitele, anebo invazi střeva a posléze dalších orgánů, kde způsobí zánětlivé abscesy. Rovnováhu mezi množstvím invazivních trofozoitů a jejich encystací usměrňují bakterie jak svým množstvím, tak složením druhů (Mirelman, 1987). Určitý druh živých bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* dokáží pomoci *E. histolytica* překonat oxidativní stres a zapříčinit změny v expresi genů, které se účastní glykolýzy a aktivity proteazomu, což usnadňuje přichycení améb na střevní sliznici hostitele (Varet et al., 2018).

Ve studii (Iyer et al., 2019) bylo popsáno, že *E. histolytica* dává přednost specifickým bakteriím pro fagocytózu v dutině tlustého střeva. Byly identifikovány bakterie, které jsou amébou z celkové bakteriální populace fagocytovány přednostně. Studie ukazuje, že *E. histolytica* dává přednost bakteriím patřícím do řádů *Lactobacillales*, *Erysipelotrichales*, *Clostridiales* a *Bifidobacteriales*, což jsou taxony důležité pro udržení zdravé střevní mikroflóry.

## 2.3 Migrace v hostiteli

Dalším faktorem, který můžeme považovat za virulenční, je migrace v hostiteli. *E. histolytica* je schopná migrovat v různých částech lidského těla, nejčastěji tvoří abscesy v játrech. Migrace souvisí s morfoloickými změnami améby a je regulována aktivitou aktinomyosinového cytoskeletu (Arhets et al., 1995). K uskutečnění migrace jsou zapotřebí různé faktory a také samotná motilita neboli pohyb *E. histolytica*. Pohyb améby je nezbytný pro přežití i pro invazi střev a dalších orgánů. *E. histolytica* se pohybuje dvěma způsoby: přímým (řízeným) a náhodným pohybem. Přímý pohyb (chemotaktická migrace nebo chemotaxe) je řízený pohyb pomocí signálů chemoatraktantů (Dufour et al., 2015). Náhodný pohyb je spíše něco jako prohledávání prostředí a vyznačuje se tvorbou tzv. „blebs“ (bublinek nebo puchýřků). Jedná se o malé membránové výstupky, které vznikají důsledkem zvýšeného intracelulární tlaku (Charras and Paluch, 2008; Maugis et al., 2010).



Obr. 5. *E. histolytica* z náhodného pohybu, který je charakterizovaný „blebs“ (označenými „B“) přechází na řízený pohyb charakterizovaný vytvořením pseudopodu vpředu (označeného „P“) a uropodu v zadní části buňky (označeného „U“) (Dufour et al., 2015)

K motilitě, přemístění a proniknutí skrze střevní sliznici je důležitá polarizace buněk trofozoitů, která souvisí s vytvořením pseudopodu na přední straně a uropodu na zadní straně buňky (viz obr. 5). Dále je důležitá adheze k substrátu a motilita améb zaměřená na signály ze střevního prostředí, které orientují a řídí migraci směrem k nim. Mohou to být erytrocytové nebo bakteriální lyzáty, N-terminální část fibronektinu, kyselina N-acetylneuraminová a také cytokiny, jako jsou faktor nádorové nekrózy (TNF) a interleukin-8 (IL-8) (Bailey et al., 1985; Blazquez et al., 2006; Franco et al., 1997; Galván-Moroyoqui et al., 2008; Udezulu and Leitch, 1987).

Střevní amébóza je onemocnění tvořící záněty ve střevech a dalších orgánech, což souvisí s inhibičním faktorem migrace makrofágů (MIF). MIF je prozánětlivý cytokin, který je mediátorem přirozené imunitní odpovědi. MIF svým účinkem zvyšuje sekreci zánětlivých

mediátorů v těle člověka (de Jong et al., 2001; Nishihira, 2012; Roger et al., 2016; Yang et al., 2015; Yao et al., 2016). *E. histolytica* kóduje homologní protein cytokinu MIF. *E. histolytica* inhibiční faktor migrace makrofágů (EhMIF) významně přispívá k zánětu sliznic vyvolaného amébou. EhMIF indukuje sekreci malých cytokinů s chemotaktickým účinkem ze střevních epiteliálních buněk, což vede k přílivu neutrofilů. Tyto informace přidávají na důležitosti EhMIF při zánětu sliznice během infekce (Ngobeni et al., 2017).

Chemotaxi neutrofilů do místa zánětu zprostředkovává prozánětlivý cytokin IL-8, který je produkován epiteliálními buňkami. Vyšší hladina IL-8 a neutrofilů v tlustém střevě byla prokázána u pacientů trpících závažnou střevní amébozou (Sierra-Puente et al., 2009; Ventura-Juárez et al., 2007).

Oproti střevní infekci se *E. histolytica* při tvorbě jaterních abscesů vyskytuje ve zcela odlišném prostředí. Přežití v játrech se považuje za silný adaptační proces, který vyžaduje specifickou regulaci některých proteinů améby. Bylo identifikováno celkem 12 genů, které jsou během tvorby abscesů specificky regulovány. Většina genů je spojena se stresovou reakcí, regulací transkripce a vezikulárním transportem (Bruchhaus et al., 2002).

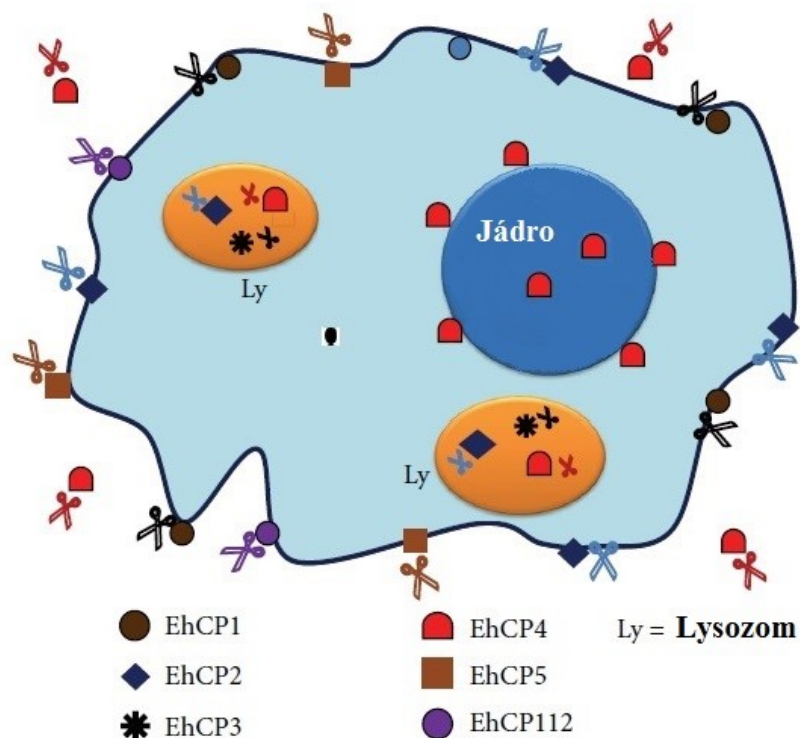
## 2.4 Cysteinové proteázy

*E. histolytica* je vybavena paletou cysteinových proteáz (EhCP). Proteázy jsou enzymy, které degradují jiné proteiny, podílejí se také na adhezi i na obraně proti imunitnímu systému hostitele. Jsou lokalizované jak intracelulárně, tak extracelulárně a označují se jako enzymy podobné katepsinu. Degradují extracelulární matrix (ECM), kolagen, imunoglobuliny, komplement, cytokiny, proteiny obsahující železo a další proteiny (Serrano-Luna et al., 2013).

V genomu *E. histolytica* bylo identifikováno 50 genů pro CP (Tillack et al., 2007). Takové množství genů poukazuje na důležitost CP v biologii entamoeb. EhCP1, 2 a 5 jsou nejvíce exprimované CP, které přibližně zodpovídají za 90 % celkové enzymatické aktivity. V porovnání s blízkce příbuznou nepatogenní *E. dispar* vylučuje *E. histolytica* celkově větší množství cysteinových proteáz. Jedinou výjimkou je CP3, která je více exprimována u *E. dispar* (Bruchhaus et al., 1996). V genomu nepatogenní *E. dispar* se CP1 vůbec nevyskytuje (Bruchhaus et al., 1996); CP5 se v genomu *E. dispar* nachází ve stejném genomickém kontextu, ale samotný gen je degenerovaný - obsahuje mnoho nukleotidových výměn, inzercí a delecí, což má za následek vícenásobné stop kodony ve čtecím rámci (Willhoeft et al.,

1999). Z toho, že nepatogenní *E. dispar* postrádá funkční geny pro EhCP1 a EhCP5, můžeme usuzovat na jejich důležitost a využití *E. histolytica* při virulenci a patogenitě.

CP mají různou buněčnou lokalizaci (viz obr. 6.). Na povrchu membrány trofozoitů se nachází EhCP1, EhCP2, EhCP5 a EhCP12. Primárně v cytoplasmě je lokalizovaná EhCP3, která se spolu s EhCP2 uvolňuje do fagocytárních vezikulů (Que et al., 2002). EhCP4 se u axenických améb nachází primárně v cytoplasmě a u améb z infikované myši se nachází uvnitř jádra i na jeho povrchu, a ve vezikulách v cytoplasmě. Po kokultivaci s buňkami tlustého střeva se EhCP4 objevila v kyselých vezikulech a byla uvolňována extracelulárně. EhCP4 je zjevně sekretována hlavně *in vivo* (He et al., 2010). Kromě výskytu EhCP5 na povrchu membrány se nachází i v lysozomech, ale její hlavní umístění pro virulenci je na povrchu membrány trofozoitů (Jacobs et al., 1998).



Obr. 6. Buněčná lokalizace cysteinových proteáz v *E. histolytica* (Serrano-Luna et al., 2013)

Největší význam ve virulenci *E. histolytica* má patrně EhCP5. Degraduje široké spektrum biologických a syntetických substrátů, jako je mucin, fibrinogen, kolagen nebo hemoglobin (Serrano-Luna et al., 2013). Degradací mucinu dochází ke ztrátě ochranné bariéry, která brání přichycení améb k hostitelským buňkám, čímž pomáhá k invazi (Moncada et al., 2003). Při zvýšené expresi EhCP5 dojde k zvýšení množství aktivní EhCP1 a EhCP2.



Oproti tomu při zvýšené expresi EhCP1 nebo EhCP2 nedojde ke zvýšení jiných CP. Spekuluje se o možnosti, že EhCP5 dokáže transformovat inaktivní prekurzory EhCP1 a 2 na enzymaticky aktivní proteázy (Tillack et al., 2006).

Cysteinová proteáza A5 (CP-A5) interaguje s integriny na povrchu lidských epitelálních buněk tlustého střeva, čímž spustí signalizaci, která indukuje sekreci prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF- $\alpha$  a IL-1b (Hou et al., 2010). CP-A5 degraduje epitelovou vrstvu proteolýzou a také spolupracuje s lidskými tkáňovými faktory během své invaze do střevní sliznice. Spouští uvolňování matrixových metaloproteináz 1 a 3 (MMP-1 a MMP-3), což jsou endopeptidázy lidského střeva, které jsou zodpovědné za degradaci ECM (Visse and Nagase, 2003). Geny MMP-1 a 3 byly nadměrně exprimovány u pacientů trpících střevní amébozou (Peterson et al., 2011). MMP-3 je exprimována epitelovými buňkami a degraduje bazální membránu, která podporuje výstelku epitelových buněk v tlustém střevě, čímž působí ve střevě jako zásadní molekula tkáňového poškození zprostředkovaného TNF- $\alpha$  (Pender et al., 1998; Salmela et al., 2002). MMP-3 má proteolytickou činnost a je schopná aktivovat pro-MMP-1, což vede k vytvoření plně aktivní MMP-1 (Bini et al., 1996).

CP-A5 a lidské MMP působí synergicky a tím se umožní a ulehčí invaze spolu s možností proniknutí do hlubších vrstev střeva (Thibeaux et al., 2014). CP-A5 je schopna převést pro-MMP-3 na aktivní katalytický enzym, který dále aktivuje MMP-1. Společně přispívají k destrukci ECM a vedou k akutnímu zánětu pozorovanému během střevní infekce.

## 2.5 Železo

Pro všechny živé organismy na naší planetě, je železo důležitým prvkem pro přežití. Vyskytuje se za normálních podmínek ve dvou stabilních redoxních stavech, Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>. Při fyziologických podmínkách není kationt Fe<sup>3+</sup> dobře rozpustný, zatímco Fe<sup>2+</sup> je dobře rozpustný, toxický a snadno oxiduje na trojmocný Fe<sup>3+</sup>. Jeho koncentrace má velký význam, jak pro parazity, tak i pro hostitele (Weinberg, 1971). Železo je potřebné pro reprodukci parazita, dokončení životního cyklu i jeho přežití v prostředí hostitele. Železo dále moduluje expresi virulenčních faktorů parazita včetně hemoglobináz, cysteinových proteáz, proteinů vázajících hemoglobin a proteiny související s cytoskeletem améby (Gastelum-Martínez et al., 2018).

Železo je toxický prvek, proto se ve vysoké koncentraci nemůže vyskytovat volně v extracelulárním prostoru ani v cytoplazmě hostitelské buňky. Nejčastěji se vyskytuje v komplexu s proteiny, čímž se zvyšuje jeho rozpustnost, zabraňuje se jeho toxicitě a udržuje se nízká koncentrace volného železa, vlivem čehož nemá parazit dostatek volného železa ke svému růstu.

*E. histolytica* má oproti ostatním eukaryotickým a prokaryotickým buňkám *in vitro* vyšší nároky na množství extracelulárního železa a jeho optimální koncentrace pro růst je 100  $\mu\text{M}$  (Serrano-Luna et al., 1998). Při nedostatku železa nebo jeho nadbytku může docházet u améb k stresové reakci. *Entamoeba* exprimuje při nedostatku železa dva geny kódující proteiny EhHmbp26 a EhHmbp45. Tyto proteiny vážou hemoglobin a s mnohem vyšší afinitou i samotný hem (Cruz-Castañeda et al., 2011). Trofozoiti *E. histolytica* jsou schopni využívat železo z lidských proteinů jako jsou: laktoferin, transferin, feritin a hemoglobin (León-Sicairos et al., 2005; López-Soto et al., 2009; Reyes-López et al., 2001; Serrano-Luna et al., 1998).

Hemoglobin je globulární protein, který je přítomen ve vysokých koncentracích v erythrocytech. Skládá se ze dvou alfa a dvou beta řetězců, z nichž každý obsahuje jednu hem prostetickou skupinu; proto jsou v molekule hemoglobinu čtyři atomy  $\text{Fe}^{2+}$ . Trofozoiti *E. histolytica* jsou schopní v krevním řečišti fagocytovat červené krvinky procesem zvaným erytrofagocytóza a získat tak hem prostřednictvím hemoglobináz (Mora-Galindo et al., 2004).

U savců je železo převážně transportováno transferinem, což je protein, který se nachází v krevním séru a lymfatické tkáni. Transferin je schopný vázat dva ionty železa a po těle přenáší železo ve formě holotransferinu, který je vychytáván *E. histolytica* (Reyes-López et al., 2001). Internalizace holotransferinu probíhá za pomoci Rab-GTPáz, které zprostředkovávají membránový transport. *Entamoeba* má ve svém genomu velké množství Rab-GTPáz (Saito-Nakano et al., 2005). Studované Rab5 a Rab7A jsou důležité pro tvorbu obřích endocytárních vakuol améby, hrají i zásadní roli při tvorbě prefagosomálních vakuol a při erytrofagocytóze a regulují časnou fázi intracelulárního transportu holotransferinu (Saito-Nakano et al., 2004). Rab7B je zapojen v pozdní fázi, což vede k degradaci transferinu v lysozomech améb (Verma et al., 2015).

Laktoferin je lidský glykoprotein, který je přítomen ve slinách, mateřském mléce a slzách. Každá molekula laktoferinu je schopná vázat dva ionty železa. *E. histolytica* pomocí povrchových proteinů zvaných laktoferin vázající proteiny (Lactoferrin binding proteins, Lfb-

ps) zachytí laktoferin s vysokou afinitou ve formě hololaktoferinu. Po rozeznání je hololaktoferin endocytován a transportován do lysozómů. Z lysozómů se uvolňuje železo a degraduje se laktoferin (León-Sicairos et al., 2005).

V buňkách člověka se ukládá železo do feritinu, který se nejvíce vyskytuje ve slezině a v játrech (Harrison and Arosio, 1996). *Entamoeba* internalizuje feritin pomocí endosomů. Při invazivní infekci mohou trofozoiti v játrech využívat jako zdroj železa jak hemoglobin, tak feritin. Preferují však právě feritin, kvůli až 1000x většímu obsahu železa (López-Soto et al., 2009).

## 2.6 Amebapory

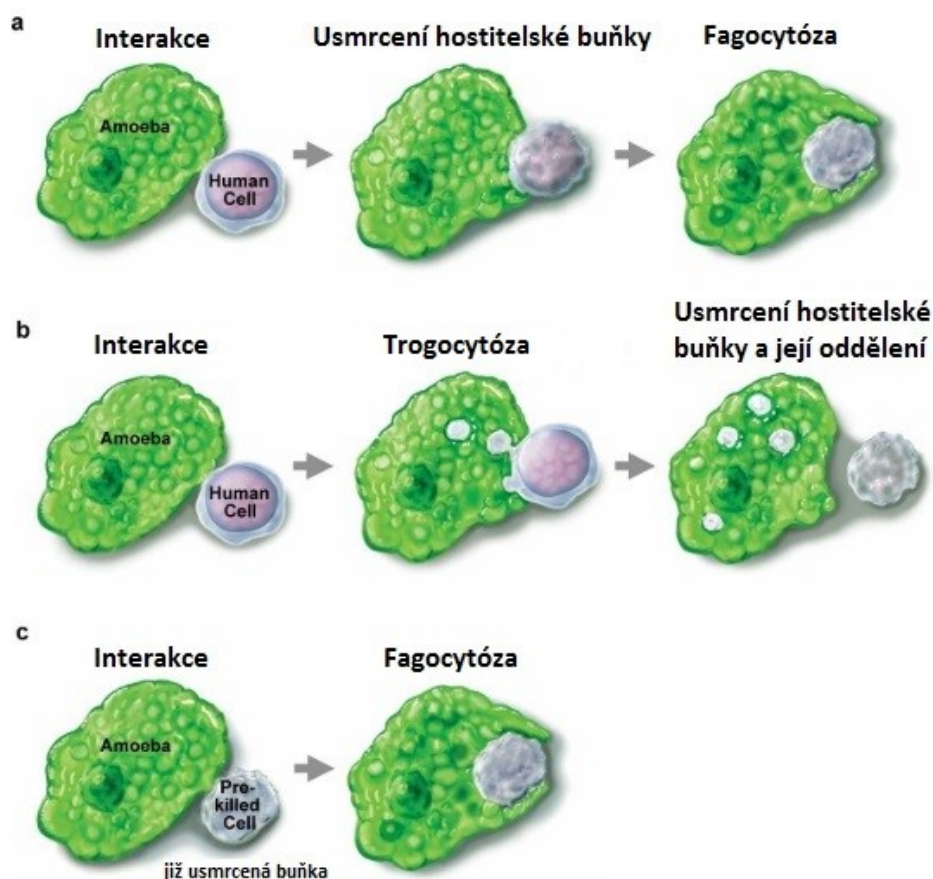
Amebapory jsou proteiny, které syntetizuje *E. histolytica* za účelem vytvoření iontových kanálů neboli pórů v membráně cílové buňky. Vytvořené póry způsobují cytolýzu buňky. (Lynch et al., 1982; Young et al., 1982). Amebapory jsou importovány také do fagosomů (potravních vakuol), kde permeabilizují cytoplazmatickou membránu bakterií (Leippe et al., 1994). Lidský imunitní systém obsahuje cytotoxické lymfocyty, mezi ně patří NK-lysin, který je součástí vnitřní obrany proti patogenům a intracelulárním bakteriím. Svoji strukturou i funkcí je obdobný amebaporům (Andersson et al., 1995; Leippe, 1995, 1997; Stenger et al., 1998). Další proteiny, které se podobají amebaporům, jsou defensiny. Defensiny jsou malé pórtvorné peptidy a stejně jako u amebaporů převažuje i u nich inhibice grampozitivních bakterií a výše zmíněná tvorba pórů v cytoplazmatických membránách bakterií, která vede k usmrcení cílových buněk (Cociancich et al., 1993; Hoffmann and Hetru, 1992; Lehrer et al., 1991; Leippe et al., 1994).

Proteiny tvořící amebapory jsou v trofozoitech *E. histolytica* uloženy uvnitř cytoplazmatických granulí. Existují tři izoformy proteinů vytvářející póry: amebapor A (AP-A), amebapor B (AP-B) a amebapor C (AP-C). Jejich molekulové hmotnosti jsou téměř shodné, každý se skládá ze 77 aminokyselinových zbytků. Všechny tři vykazují *in vitro* komplementární antibakteriální aktivitu. (Leippe et al., 1992, 1994). *In vitro* zabíjejí hostitelské buňky, na jejichž membránu jsou přeneseny exocytózou (Berninghausen and Leippe, 1997).

Při snížení exprese genu pro AP-A, dochází k nižší aktivitě v tvorbě pórů, byla i omezena schopnost tvorby jaterních abscesů a celkově se snížila schopnost zabíjet hostitelské buňky (Bracha et al., 1999).

## 2.7 Trogocytóza

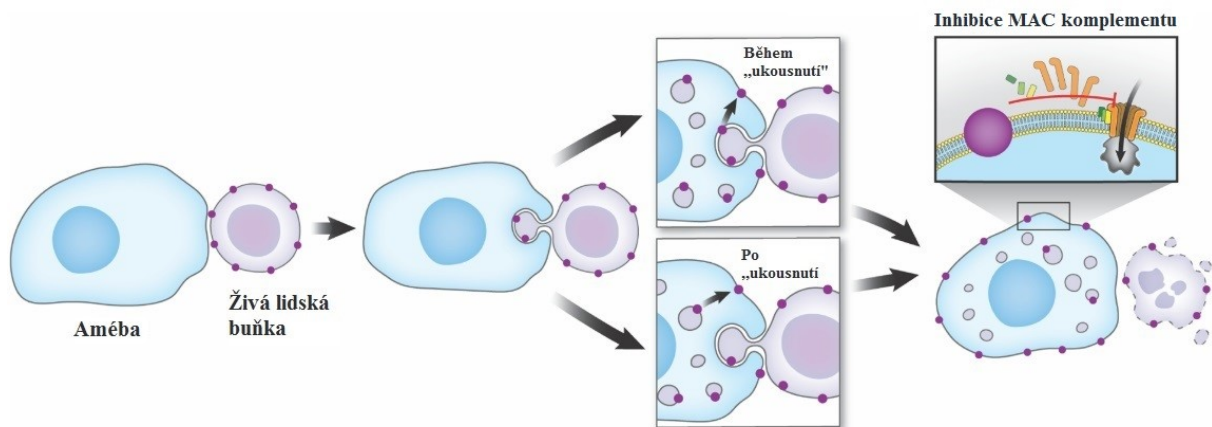
V poslední době se ukazuje, že hlavním mechanismem, kterým je *E. histolytica* schopná zabíjet buňky hostitele, je trogocytóza (Ralston et al., 2014). Trogocytóza se od fagocytózy, což je pohlcení celé cílové buňky, odlišuje pozřením jen pouhé části cílové buňky, „ukousnutím“ části membrány a intracelulárního prostoru („trogo-“ znamená „kousnutí“) (viz obr. 7). Smrt hostitelských buněk nastává až po překročení hranice poškození buňky, kterou *Entamoeba* zapříčiní pozřením většího množství fragmentů (Ralston et al., 2014). U mnohobuněčných eukaryot se trogocytóza používá hlavně k interakci mezi buňkami a byla pozorována u T-lymfocytů, B-lymfocytů, NK buněk (natural killers), dendritických buněk (Dopfer et al., 2011) a u makrofágů a neutrofilů, u kterých se může využívat k usmrcení rakovinných buněk (Matlung et al., 2018; Velmurugan et al., 2016). Příklady dalších měňavkovitých organismů, u kterých byla zjištěna trogocytóza jsou např. *Naegleria fowleri* (Brown, 1979) nebo *Dictyostelium caveatum* (Waddell and Vogel, 1985).



Obr. 7. Porovnání požití a zabití hostitelských buněk fagocytózou a trogocytózou (Ralston et al., 2014)

V lysozomech dochází k rozkladu požitého materiálu, při kterém jsou potřeba lysozomální enzymy. Většina lysozomálních enzymů je závislá na nízkém pH. Před objevením trogocytózy u *E. histolytica* bylo zjištěno, že při zvýšeném lysozomálním pH dochází k poklesu množství usmrcených lidských buněk amébou (Ravdin et al., 1986). Další studie prokázala, že inhibice kyselosti lysozomů nemá vliv na iniciaci trogocytózy, ale na její průběh. Dochází k velkému snížení požitého množství fragmentů a zabitých buněk (Gilmartin et al., 2017). Je pravděpodobné, že lysozomy zaujímají důležitou roli v pokračující trogocytóze *E. histolytica* a usmrcování buněk, protože jsou potřebné pro účinnou degradaci přijímaných fragmentů hostitele, recyklaci membrán a receptorů potřebných pro dokončení trogocytózy. Při srovnání okyselení fagosomů *E. histolytica* s nepatogenní *E. dispar* se ukazuje, že acidifikace trvá výrazně déle u *E. dispar* a nedosáhne úrovně kyselosti *E. histolytica*, což ukazuje na význam lysozomů v patogenezi u *E. histolytica* (Mitra et al., 2005).

Pomocí trogocytózy je *E. histolytica* schopná unikat imunitní reakci hostitele (Miller et al., 2019). Trofozoiti *E. histolytica* získávají lidské buněčné membránové proteiny, které pak vystavují na svém povrchu (viz obr. 8.). Tím si améba zajišťuje ochranu před imunitním systémem hostitele. Imunitní systém ji totiž nerozpozná jako parazita, ale jako buňku přirozeně vyskytující se v těle. Díky tomuto mechanismu může migrovat po těle a má schopnost přežít v lidském séru. Trogocytóza je tedy důležitá pro invazivní infekci a zvyšuje patogenitu prvoka. Aby améba byla schopná vystavit membránové proteiny na svém povrchu, musí proběhnout trogocytóza živých buněk. Při trogocytóze mrtvých buněk nebyla pozorována ochrana před imunitním systémem hostitele (Ralston et al., 2014). S živými buňkami hostitele se setkávají již ve střevě, a taky poté v krevním řečišti při invazivní infekci a v potenciálních orgánech, které napadnou.



Obr. 8. Trogocytóza živých lidských buněk amébou, následně zobrazení membránových proteinů hostitele na povrchu améby a inhibice MAC (membrane attack complex) komplementu (Miller et al., 2019)

Přenos proteinů z hostitelské membrány buňky na membránu améby nastává při fúzi plazmatických membrán obou buněk během procesu trogocytózy. Proteiny mohou být přeneseny na povrch améby membránovou fúzí v místě trogocytózy bez internalizace fragmentu do buňky (viz obr. 8. – během „ukousnutí“). Druhým možným mechanismem je internalizace fragmentu do buňky a následný přenos pozřených proteinů na povrch améby (viz. Obr. 8. – po „ukousnutí“) (Miller et al., 2019). Díky výše zmíněným mechanismům trogocytózy může dojít například k přenesení regulačního lidského proteinu CD59 na povrch membrány améby. CD59 je inhibítoem MAC (membrane attack complex) komplementu

a tato inhibice je tak dalším mechanismem při obraně před imunitní odpovědí hostitele (Braga et al 1992, Ventura-Juárez et. al, 2009).

K pozření a prezentaci získaných proteinů na povrchu membrány *E. histolytica* je potřeba přeuspořádání aktinu, Gal/GalNAc lektin, fosfatidylinositol-3-kináza a kináza obsahující C2 doménu (Ralston et al., 2014). Po vystavení hostitelských membránových proteinů na svém povrchu přejímá améba nové vlastnosti, které ovlivňují následné interakce s dalšími buňkami hostitele.

### 3 Závěr

V této bakalářské práci byly popsány a shrnuty virulenční faktory jednobuněčného parazita *E. histolytica*, který u lidí způsobuje střevní onemocnění nazývané měňavková úplavice neboli améboza. Při rozšíření do dalších orgánů tvoří nejčastěji abscesy v játrech. Většina virulenčních faktorů pomáhá parazitovi získat dostatek živin pro svůj růst a případnou invazi do dalších částí těla hostitele. Další úlohou je obrana proti imunitní odpovědi hostitele pomocí různých mechanismů.

Virulenční faktory se často doplňují a úzce spolu spolupracují. Pro růst a správný vývoj parazita je důležitým faktorem železo a fagocytóza bakterií, u kterých amebapory zajistí permeabilizaci jejich membrán ve fagosomech. Fagocytóza buněk usmrcených apoptózou se považuje jak za invazní mechanismus, tak za mechanismus, který napomáhá úniku před imunitním systémem hostitele. Lektin Gal/GalNAc zajišťuje adhezi na střevní sliznici, cysteinové proteázy degradují proteiny, které jsou její součástí, a současně může probíhat trogocytóza hostitelských buněk, která je spojena s vystavováním hostitelských membránových proteinů na povrchu améby, díky čemuž získává *E. histolytica* nové vlastnosti a stává se pro lidský komplement nerozpoznatelná.

Améboza je jedním z nejvýznamnějších parazitárních onemocnění na světě. Doposud nebyla vyvinuta žádná účinná vakcína. Podrobnější zkoumání virulenčních faktorů by mohlo přispět k úplnému pochopení průběhu parazitární infekce, a také pomoci k lepšímu pochopení strategií, které *E. histolytica* používá při invazi do hostitelských tkání, což by do budoucna mohlo přispět k vývoji účinné vakcíny.



## 4 Použitá literatura

**Ali, I.K.M., Hossain, M.B., Roy, S., Ayeh-Kumi, P.F., Petri, W.A., Haque, R., and Clark, C.G.** (2003). *Entamoeba moshkovskii* infections in children in Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 580–584.

**Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jörnvall, H., Mutt, V., Olsson, B., and Wigzell, H.** (1995). NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *EMBO J.* **14**, 1615–1625.

**Arhets, P., Gounon, P., Sansonetti, P., and Guillén, N.** (1995). Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **63**, 4358–4367.

**Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., and Holm, L.** (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**.

**Bailey, G.B., Leitch, G.J., and Day, D.B.** (1985). Chemotaxis by *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.* **32**, 341–346.

**Baxt, L.A., Baker, R.P., Singh, U., and Urban, S.** (2008). An *Entamoeba histolytica* rhomboid protease with atypical specificity cleaves a surface lectin involved in phagocytosis and immune evasion. *Genes Dev.* **22**, 1636–1646.

**Belley, A., Keller, K., Göttke, M., Chadee, K., and Göttke, M.** (1999). Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 10–15.

**Berninghausen, O., and Leippe, M.** (1997). Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **65**, 3615–3621.

**Bini, A., Itoh, Y., Kudryk, B.J., and Nagase, H.** (1996). Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly 404-Ala 405 peptide bond. *Biochemistry* **35**, 13056–13063.

**Blazquez, S., Zimmer, C., Guigon, G., Olivo-Marin, J.-C., Guillén, N., and Labruyère, E.** (2006). Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **74**, 1407–1411.

**Boettner, D.R., and Petri, W.A.** (2005). *Entamoeba histolytica* activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **289**, 175–184.

**Bracha, R., Nuchamowitz, Y., Leippe, M., and Mirelman, D.** (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* **34**, 463–472.

- Braga, L.L., Ninomiya, H., McCoy, J.J., Eacker, S., Wiedmer, T., Pham, C., Wood, S., Sims, P.J., and Petri, W.A.** (1992). Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **90**, 1131–1137.
- Brown, T.** (1979). Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *J. Med. Microbiol.* **12**, 363–371.
- Bruchhaus, I., Jacobs, T., Leippe, M., and Tannich, E.** (1996). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* **22**, 255–263.
- Bruchhaus, I., Roeder, T., Lotter, H., Schwerdtfeger, M., and Tannich, E.** (2002). Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. *Mol. Microbiol.* **44**, 1063–1072.
- Calderón, J., de Lourdes Muñoz, M., and Acosta, H.M.** (1980). Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae. *J. Exp. Med.* **151**, 184–193.
- Charras, G., and Paluch, E.** (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 730–736.
- Cheng, X.J., Hughes, M.A., Huston, C.D., Loftus, B., Gilchrist, C.A., Lockhart, L.A., Ghosh, S., Miller-Sims, V., Mann, B.J., Petri, W.A., et al.** (2001). Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infect. Immun.* **69**, 5892–5898.
- Clark, C.G., and Diamond, L.S.** (1991). The Laredo strain and other “*Entamoeba histolytica*-like” amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**, 11–18.
- Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Letellier, L.** (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239–19245.
- Cruz-Castañeda, A., López-Casamichana, M., and Olivares-Trejo, J.J.** (2011). *Entamoeba histolytica* secretes two haem-binding proteins to scavenge haem. *Biochem. J.* **434**, 105–111.
- Diamond, L.S., and Clark, C.G.** (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 340–344.
- Dopfer, E.P., Minguet, S., and Schamel, W.W.A.** (2011). A new vampire saga: the molecular mechanism of T cell trogocytosis. *Immunity* **35**, 151–153.
- Dufour, A.C., Olivo-Marin, J.-C., and Guillen, N.** (2015). Amoeboid movement in protozoan pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* **46**, 128–134.

- Espinosa-Cantellano, M., and Martínez-Palomo, A.** (1994). *Entamoeba histolytica*: mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* **79**, 424–435.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M.** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207–2216.
- Fadok, V.A., de Cathelineau A, Daleke, D.L., Henson, P.M., and Bratton, D.L.** (2001a). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**, 1071–1077.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., and Henson, P.M.** (2001b). Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J. Clin. Invest.* **108**, 957–962.
- Faust, D.M., and Guillen, N.** (2012). Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. *Microbes Infect.* **14**, 1428–1441.
- Franco, E., Vázquez-Prado, J., and Meza, I.** (1997). Fibronectin-derived fragments as inducers of adhesion and chemotaxis of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J. Infect. Dis.* **176**, 1597–1602.
- Galván-Moroyoqui, J.M., Del Carmen Domínguez-Robles, M., Franco, E., and Meza, I.** (2008). The interplay between *Entamoeba* and enteropathogenic bacteria modulates epithelial cell damage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**.
- Gastelum-Martínez, A., León-Sicairos, C., Plata-Guzmán, L., Soto-Castro, L., León-Sicairos, N., and de la Garza, M.** (2018). Iron-modulated virulence factors of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol.* **13**, 1329–1341.
- Gilmartin, A.A., Ralston, K.S., and Petri, W.A.** (2017). Inhibition of amebic lysosomal acidification blocks amebic trophocytosis and cell killing. *MBio* **8**, 1–10.
- González-Ruiz, A., Haque, R., Aguirre, A., Castañón, G., Hall, A., Guhl, F., Ruiz-Palacios, G., Miles, M.A., and Warhurst, D.C.** (1994). Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Pathol.* **47**, 236–239.
- Gum, J.R., Hicks, J.W., Toribara, N.W., Siddiki, B., and Kim, Y.S.** (1994). Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 2440–2446.
- Hamzah, Z., Petmitr, S., Mungthin, M., Leelayoova, S., and Chavalitshewinkoon-Petmitr, P.** (2006). Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3196–3200.
- Harrison, P.M., and Arosio, P.** (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161–203.

- He, C., Nora, G.P., Schneider, E.L., Kerr, I.D., Hansell, E., Hirata, K., Gonzalez, D., Sajid, M., Boyd, S.E., Hruz, P., et al.** (2010). A novel *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase, EhCP4, is key for invasive amebiasis and a therapeutic target. *J. Biol. Chem.* **285**, 18516–18527.
- Herrmann, A., Davies, J.R., Lindell, G., Mårtensson, S., Packer, N.H., Swallow, D.M., and Carlstedt, I.** (2002). Studies on the “insoluble” glycoprotein complex from human colon. *J. Biol. Chem.* **274**, 15828–15836.
- Hoffmann, J.A., and Hetru, C.** (1992). Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunol. Today* **13**, 411–415.
- Hou, Y., Mortimer, L., and Chadee, K.** (2010). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NFkappaB-mediated pro-inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* **285**, 35497–35504.
- Huston, C.D., Boettner, D.R., Miller-Sims, V., and Petri, W.A.** (2003). Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **71**, 964–972.
- Iyer, L.R., Verma, A.K., Paul, J., and Bhattacharya, A.** (2019). Phagocytosis of gut bacteria by *Entamoeba histolytica*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 34.
- Jacobs, T., Bruchhaus, I., Dandekar, T., Tannich, E., and Leippe, M.** (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **27**, 269–276.
- de Jong, Y.P., Abadia-Molina, A.C., Satoskar, A.R., Clarke, K., Rietdijk, S.T., Faubion, W.A., Mizoguchi, E., Metz, C.N., Alshali, M., ten Hove, T., et al.** (2001). Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat. Immunol.* **2**, 1061–1066.
- Khairnar, K., and Parija, S.C.** (2007). A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*, *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiol.* **7**, 47.
- de la Torre, M., de la Hoz-Couturier, R., Landa, L., and Sepulveda, B.** (1971). Cultivos axenicos de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. **2**, 165–172.
- Lachmann, P.J.** (1991). The control of homologous lysis. *Immunol. Today* **12**, 312–315.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., and Selsted, M.E.** (1991). Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* **64**, 229–230.
- Leippe, M.** (1995). Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* **83**, 17–18.
- Leippe, M.** (1997). Amoebapores. *Parasitol. Today* **13**, 178–183.

- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., van der Goot, G., Pattus, F., Horstmann, R.D., and Müller-Eberhard, H.J.** (1992). Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **11**, 3501–3506.
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E., and Müller-Eberhard, H.J.** (1994). Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol. Microbiol.* **14**, 895–904.
- León-Sicairos, N., Reyes-López, M., Canizalez-Román, A., Bermúdez-Cruz, R.M., Serrano-Luna, J., Arroyo, R., and de la Garza, M.** (2005). Human hololactoferrin: endocytosis and use as an iron source by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* **151**, 3859–3871.
- López-Soto, F., González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., León-Sicairos, N., Piña-Vázquez, C., Salazar, E.P., and de la Garza, M.** (2009). *Entamoeba histolytica* uses ferritin as an iron source and internalises this protein by means of clathrin-coated vesicles. *Int. J. Parasitol.* **39**, 417–426.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R.** (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–230.
- Lynch, E.C., Rosenberg, I.M., and Gitler, C.** (1982). An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* **1**, 801–804.
- Mann, B.J.** (2002). Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Int. Rev. Cytol.* **216**, 59–80.
- Matlung, H.L., Babes, L., Zhao, X.W., van Houdt, M., Treffers, L.W., van Rees, D.J., Franke, K., Schornagel, K., Verkuijlen, P., Janssen, H., et al.** (2018). Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep.* **23**, 3946–3959.
- Maugis, B., Brugués, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., and Amblard, F.** (2010). Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *J. Cell Sci.* **123**, 3884–3892.
- McCoy, J.J., Mann, B.J., Vedvick, T.S., Pak, Y., Heimark, D.B., and Petri, W.A.** (1993). Structural analysis of the light subunit of the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adherence lectin. *J. Biol. Chem.* **268**, 24223–24231.
- McCoy, J.J., Weaver, A.M., and Petri, W.A.** (1994a). Use of monoclonal anti-light subunit antibodies to study the structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc adherence lectin. *Glycoconj. J.* **11**, 432–436.
- McCoy, J.J., Mann, B.J., and Petri, W.A.** (1994b). Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect. Immun.* **62**, 3045–3050.

- Miller, H.W., Suleiman, R.L., and Ralston, K.S.** (2019). Trogocytosis by *Entamoeba histolytica* mediates acquisition and display of human cell membrane proteins and evasion of lysis by human serum. *MBio* **10**.
- Mirelman, D.** (1987). Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* **51**, 272–284.
- Mitra, B.N., Yasuda, T., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., and Nozaki, T.** (2005). Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **62**, 84–99.
- Moncada, D., Keller, K., and Chadee, K.** (2003). *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect. Immun.* **71**, 838–844.
- Mora-Galindo, J., Anaya-Velázquez, F., Ramírez-Romo, S., and González-Robles, A.** (2004). *Entamoeba histolytica*: correlation of assessment methods to measure erythrocyte digestion, and effect of cysteine proteinases inhibitors in HM-1:IMSS and HK-9:NIH strains. *Exp. Parasitol.* **108**, 89–100.
- Ngobeni, R., Abhyankar, M.M., Jiang, N.M., Farr, L.A., Samie, A., Haque, R., and Moonah, S.N.** (2017). *Entamoeba histolytica*-encoded homolog of macrophage migration inhibitory factor contributes to mucosal inflammation during amebic colitis. *J. Infect. Dis.* **215**, 1294–1302.
- Ngui, R., Angal, L., Fakhrurrazi, S.A., Lian, Y.L.A., Ling, L.Y., Ibrahim, J., and Mahmud, R.** (2012). Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. *Parasit. Vectors* **5**, 187.
- Nishihira, J.** (2012). Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1271**, 53–57.
- Pender, S.L., Fell, J.M., Chamow, S.M., Ashkenazi, A., and MacDonald, T.T.** (1998). A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production. *J. Immunol.* **160**, 4098–4103.
- Peterson, K.M., Guo, X., Elkahloun, A.G., Mondal, D., Bardhan, P.K., Sugawara, A., Duggal, P., Haque, R., and Petri, W.A.** (2011). The expression of REG 1A and REG 1B is increased during acute amebic colitis. *Parasitol. Int.* **60**, 296–300.
- Petri, W.A., Chapman, M.D., Snodgrass, T., Mann, B.J., Broman, J., and Ravdin, J.I.** (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **264**, 3007–3012.

- Petri, W.A., Haque, R., and Mann, B.J.** (2002). The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 39–64.
- Que, X., Brinen, L.S., Perkins, P., Herdman, S., Hirata, K., Torian, B.E., Rubin, H., McKerrow, J.H., and Reed, S.L.** (2002). Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 23–32.
- Ragland, B.D., Ashley, L.S., Vaux, D.L., and Petri, W.A.** (1994). *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Exp. Parasitol.* **79**, 460–467.
- Ralston, K.S., and Petri, W.A.** (2011). Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. *Trends Parasitol.* **27**, 254–263.
- Ralston, K.S., Solga, M.D., Mackey-lawrence, N.M., Bhattacharya, A., and Petri, W.A.** (2014). Trophocytosis by *Entamoeba histolytica* contributes to cell killing and tissue invasion. *Nature* **508**, 526–530.
- Ravdin, J.I., Schlesinger, P.H., Murphy, C.F., Gluzman, I.Y., and Krogstad, D.J.** (1986). Acid intracellular vesicles and the cytolysis of mammalian target cells by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *J. Protozool.* **33**, 478–486.
- Ravdin, J.I., Moreau, F., Sullivan, J.A., Petri, W.A., and Mandell, G.L.** (1988). Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **56**, 1505–1512.
- Reed, S.L.** (1992). Amebiasis: an update. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 385–393.
- Reyes-López, M., Serrano-Luna, J.J., Negrete-Abascal, E., León-Sicairos, N., Guerrero-Barrera, A.L., and de la Garza, M.** (2001). *Entamoeba histolytica*: transferrin binding proteins. *Exp. Parasitol.* **99**, 132–140.
- Roger, T., Schneider, A., Weier, M., Sweep, F.C.G.J., Le Roy, D., Bernhagen, J., Calandra, T., and Giannoni, E.** (2016). High expression levels of macrophage migration inhibitory factor sustain the innate immune responses of neonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**.
- Rollins, S.A., Zhao, J., Ninomiya, H., and Sims, P.J.** (1991). Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J. Immunol.* **146**, 2345–2351.
- Royer, T.L., Gilchrist, C., Kabir, M., Arju, T., Ralston, K.S., Haque, R., Clark, C.G., and Petri, W.A.** (2012). *Entamoeba bangladeshi* nov. sp., Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1543–1545.

**Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Nakada-Tsukui, K., Leippe, M., and Nozaki, T.** (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* **279**, 49497–49507.

**Saito-Nakano, Y., Loftus, B.J., Hall, N., and Nozaki, T.** (2005). The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* **110**, 244–252.

**Salmela, M.T., MacDonald, T.T., Black, D., Irvine, B., Zhuma, T., Saarialho-Kere, U., and Pender, S.L.F.** (2002). Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridisation. *Gut* **51**, 540–547.

**Santi-Rocca, J., Rigother, M.-C., and Guillén, N.** (2009). Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 65–75.

**Serrano-Luna, J., Piña-Vázquez, C., Reyes-López, M., Ortiz-Estrada, G., and de la Garza, M.** (2013). Proteases from *Entamoeba* spp. and pathogenic free-living amoebae as virulence factors. *J. Trop. Med.* **2013**.

**Serrano-Luna, J.J., Negrete, E., Reyes, M., and de la Garza, M.** (1998). *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS: hemoglobin-degrading neutral cysteine proteases. *Exp. Parasitol.* **89**, 71–77.

**Sierra-Puente, R.E., Campos-Rodríguez, R., Jarillo-Luna, R.A., Muñoz-Fernández, L., Rodríguez, M.G., Muñoz-Ortega, M.H., and Ventura-Juárez, J.** (2009). Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* **31**, 384–391.

**Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melián, A., Bogdan, C., et al.** (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121–125.

**Tannich, E., Ebert, F., and Horstmann, R.D.** (1991). Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1849–1853.

**Taylor, K.** (2015). No Title.

[https://en.wikipedia.org/wiki/Amoeba#/media/File:Phagocytosis\\_-\\_amoeba.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Amoeba#/media/File:Phagocytosis_-_amoeba.jpg)

**Thibeaux, R., Avé, P., Bernier, M., Morcelet, M., Frileux, P., Guillén, N., and Labruyère, E.** (2014). The parasite *Entamoeba histolytica* exploits the activities of human matrix metalloproteinases to invade colonic tissue. *Nat. Commun.* **5**.

**Tillack, M., Nowak, N., Lotter, H., Bracha, R., Mirelman, D., Tannich, E., and Bruchhaus, I.** (2006). Increased expression of the major cysteine proteinases by stable episomal transfection underlines the important role of EhCP5 for the pathogenicity of



*Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**, 58–64.

**Tillack, M., Biller, L., Irmer, H., Freitas, M., Gomes, M.A., Tannich, E., and Bruchhaus, I.** (2007). The *Entamoeba histolytica* genome: primary structure and expression of proteolytic enzymes. *BMC Genomics* **8**, 170.

**Udezulu, I.A., and Leitch, G.J.** (1987). A membrane-associated neuraminidase in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.* **55**, 181–186.

**Varet, H., Shaulov, Y., Sismeiro, O., Trebicz-Geffen, M., Legendre, R., Coppée, J.-Y., Ankri, S., and Guillen, N.** (2018). Enteric bacteria boost defences against oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. *Sci. Rep.* **8**, 9042.

**Velmurugan, R., Challa, D.K., Ram, S., Ober, R.J., and Ward, E.S.** (2016). Macrophage-mediated trogocytosis leads to death of antibody-opsonized tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1879–1889.

**Ventura-Juárez, J., Barba-Gallardo, L.F., Muñoz-Fernández, L., Martínez-Medina, L., Márquez-Díaz, F., Sosa-Díaz, S.J., Gerardo-Rodríguez, M., González-Romo, R., and Campos-Rodríguez, R.** (2007). Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol.* **29**, 201–209.

**Verma, K., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T., and Datta, S.** (2015). Insights into endosomal maturation of human holo-transferrin in the enteric parasite *Entamoeba histolytica*: essential roles of Rab7A and Rab5 in biogenesis of giant early endocytic vacuoles. *Cell. Microbiol.* **17**, 1779–1796.

**Villarreal, M.R.** (2008). No Title.

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Entamoeba\\_histolytica\\_life\\_cycle-en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Entamoeba_histolytica_life_cycle-en.svg)

**Visse, R., and Nagase, H.** (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839.

**Waddell, D.R., and Vogel, G.** (1985). Phagocytic behavior of the predatory slime mold, *Dictyostelium caveatum*. Cell nibbling. *Exp. Cell Res.* **159**, 323–334.

**Walsh, J.A.** (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8**, 228–238.

**Weinberg, E.D.** (1971). Role of iron in host-parasite interactions. *J. Infect. Dis.* **124**, 401–410.

**WHO** (1997). WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol. Bull.* **18**, 13–14.

**Willhoeft, U., Hamann, L., and Tannich, E.** (1999). A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect. Immun.* **67**, 5925–5929.

**Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A., and Gómez, A.** (2009). Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 1023–1032.

**Yang, J., Li, Y., and Zhang, X.** (2015). Meta-analysis of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene -173G/C polymorphism and inflammatory bowel disease (IBD) risk. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 9570–9574.

**Yao, J., Leng, L., Sauler, M., Fu, W., Zheng, J., Zhang, Y., Du, X., Yu, X., Lee, P., and Bucala, R.** (2016). Transcription factor ICBP90 regulates the MIF promoter and immune susceptibility locus. *J. Clin. Invest.* **126**, 732–744.

**Young, J.D., Young, T.M., Lu, L.P., Unkeless, J.C., and Cohn, Z.A.** (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* **156**, 1677–1690.