

Die Eilast bestimmt das Ausmaß der Leberzellschädigung bei einer
Schistosoma mansoni-Infektion im Hamstermodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Russ, Lena Sophie
aus Böblingen

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie
Medizinische Klinik II

1. Gutachterin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MHAC

2. Gutachterin: Frau PD Dr. Birgit Bassaly

Tag der Disputation: 25.06.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Hauptteil.....	1
1.1. Einleitung.....	1
1.1.1. Lebenszyklus <i>S. mansoni</i>	2
1.1.2. Pathogenese und Klinik der <i>S. mansoni</i> -Infektion	3
1.1.3. Leberpathologie durch <i>S. mansoni</i> -Eier	4
1.1.3.1. Leberzellschädigung	5
1.1.3.2. Immunantwort	5
1.1.3.2.1. Akute Immunantwort.....	5
1.1.3.2.2. Chronische Immunantwort.....	8
1.1.3.3. Metabolischer Stress.....	9
1.1.3.3.1. Hepatischer Stoffwechsel	9
1.1.3.3.2. Hepatischer metabolischer Stress bei <i>S. mansoni</i> -Infektion	11
1.1.3.4. Oxidativer Stress.....	13
1.1.3.4.1. Entstehung des oxidativen Stresses.....	13
1.1.3.4.2. Antioxidative Mechanismen	14
1.1.3.4.3. Hepatischer oxidativer Stress bei <i>S. mansoni</i> -Infektion	15
1.1.4. Zielsetzung der Arbeit	16
1.2. Materialien und Methoden.....	18
1.2.1. Materialien	18
1.2.1.1. Oligonukleotide	18
1.2.1.2. Chemikalien und Reagenzien.....	20
1.2.1.3. Kommerzielle Kits.....	21
1.2.1.4. Lösungen und Puffer	21
1.2.1.5. Oligonukleotide	21
1.2.1.6. Zelllinie	21
1.2.1.7. Medien und Zusatzstoffe	22
1.2.1.8. Verbrauchsmaterialien.....	22
1.2.1.9. Geräte	23

1.2.1.10.	Versuchstiere (Hamster).....	24
1.2.1.11.	<i>Schistosoma mansoni</i> -Eier.....	25
1.2.1.12.	Software.....	25
1.2.2.	Tierexperimentelle Methoden.....	25
1.2.2.1.	Tierversuch.....	25
1.2.2.1.1.	Versuchsaufbau.....	25
1.2.2.1.2.	Gewinnung der Gewebeprobe.....	26
1.2.2.2.	Bestimmung der hepatischen Eilast.....	26
1.2.2.2.1.	KOH-Verdau des Lebergewebes.....	26
1.2.2.2.2.	Auszählung der parasitären Eier.....	26
1.2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	28
1.2.3.1.	mRNA-Isolation aus Gewebeprobe.....	28
1.2.3.2.	mRNA-Isolation aus Zelllysaten.....	29
1.2.3.3.	mRNA-Isolation aus <i>S. mansoni</i> -Eiern.....	29
1.2.3.4.	Konzentrationsbestimmung der mRNA mittels Spektralphotometer... ..	30
1.2.3.5.	Qualitätskontrolle der mRNA mittels Agarosegel.....	31
1.2.3.6.	Umschreibung der mRNA in cDNA.....	32
1.2.3.7.	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	33
1.2.3.7.1.	Prinzip der qRT-PCR.....	33
1.2.3.7.2.	Durchführung der qRT-PCR.....	35
1.2.3.8.	Design der Primer-Paare.....	36
1.2.3.9.	Bestimmung des Referenzgens.....	37
1.2.4.	Histologische Methoden.....	38
1.2.4.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
1.2.4.2.	Mikroskopische Aufnahme der gefärbten Schnitte.....	38
1.2.5.	Glykogenbestimmung in Leberproben.....	39
1.2.5.1.	Proben- und Reagenzienpräparation.....	39
1.2.5.2.	Präparation des Glykogen-Standards.....	39
1.2.5.3.	Assay.....	39

1.2.6. Zellkultur mit HepG2-Zellen.....	40
1.2.6.1. Zellkultivierung	40
1.2.6.2. Aussaat und Stimulation der Zellen mit SEA	41
1.2.7. Statistische Methoden	41
1.3. Ergebnisse.....	43
1.3.1. Etablierung und Validierung der Methoden.....	44
1.3.1.1. Bestimmung der hepatischen Eilast.....	44
1.3.1.1.1. Spektrum der Eilast in Hamsterlebern	44
1.3.1.1.2. Verteilung der Eier im Leberlappen	45
1.3.1.1.3. Regression zwischen Eilast und ESP-Komponenten	46
1.3.1.2. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (Lebergewebe).....	46
1.3.1.2.1. <i>Srsf4</i> als Referenzgen	47
1.3.1.2.2. Ungeeignete Referenzgene	48
1.3.1.2.3. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (HepG2-Zellen) ...	48
1.3.2. <i>S. mansoni</i> -induzierte Leberschädigung und hepatische Eilast	48
1.3.2.1. Immunantwort	49
1.3.2.1.1. Eilast-unabhängige Steigerung der T _H 1-Immunantwort	49
1.3.2.1.2. Inverser Zusammenhang zwischen T _H 2-Immunantwort und Eilast	50
1.3.2.1.3. <i>Il10</i> -Expression und Eilast	51
1.3.2.1.4. <i>Il6</i> -Expression und Eilast	52
1.3.2.2. Metabolischer Stress.....	53
1.3.2.2.1. Negativer Zusammenhang zwischen <i>Fasn</i> -Expression und Eilast	53
1.3.2.2.2. Inverser Zusammenhang zwischen Glykogengehalt und Eilast ..	54
1.3.2.3. Oxidativer Stress	55
1.3.2.3.1. Inverser Zusammenhang zwischen <i>Cat</i> -Expression und Eilast...	55
1.3.2.3.2. Reduktion der <i>Katalase</i> -Expression in HepG2-Zellen	57
1.3.2.4. Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse	57
1.4. Diskussion	60

8.1.2. <i>Actb</i> , <i>Rps18</i> und <i>Tubb</i> als ungeeignete Referenzgene.....	102
8.2. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (HepG2-Zellen).....	103
8.3. Expression des T _H 2-Zytokins IL-5	104
8.4. Zusammenhang zwischen <i>Il4</i> - und <i>Ifng</i> -Expression	104
8.5. Zusammenhang zwischen der Elast und GyS, PK und G6PD	105
8.6. Zusammenhang zwischen <i>Il4</i> - und <i>Cat</i> -Expression.....	105
8.7. Modulation weiterer antioxidativer Enzyme	106
8.8. Regulation des Transkriptionsfaktors Nrf2.....	106
9. Publikationsverzeichnis	107
10. Ehrenwörtliche Erklärung.....	108
11. Danksagung	109

1. Hauptteil

1.1. Einleitung

Schistosomiasis, auch bekannt als Bilharziose, ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Trematoden (Saugwürmer) der Gattung *Schistosoma spp.* (Pärchenegel) verursacht wird⁹⁹. Sie wurde erstmals 1851 von dem deutschen Arzt Theodor Bilharz in Kairo, Ägypten, entdeckt und beschrieben⁸⁴. Es gibt mehrere humanpathogene Arten; am häufigsten kommen *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), *S. haematobium* und *S. japonicum* vor⁸². Der Parasit vermehrt sich in Süßwasserschnecken (Zwischenwirt) in warmen stehenden Gewässern, dringt perkutan in den Menschen (Endwirt) ein und gelangt über das Gefäßsystem in die Endorgane, um sich dort fortzupflanzen¹⁴⁶. *S. mansoni* und *S. japonicum* befallen bevorzugt den Gastrointestinaltrakt, *S. haematobium* den Urogenitaltrakt⁹⁹.

Schätzungsweise sind mindestens 250 Millionen Menschen weltweit von der Erkrankung betroffen (Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2021)²¹¹, wobei von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen werden muss^{15,43,105,203}. Schistosomiasis ist mit Malaria eine der häufigsten parasitären Erkrankungen weltweit⁹⁹. Sehr verbreitet ist die tropische Krankheit in Afrika südlich der Sahara, im mittleren Osten, in Südamerika, in der Karibik und in Südostasien¹⁷⁶. Laut Einschätzungen der WHO leben etwa 90% der behandlungsbedürftigen Betroffenen in Afrika²¹¹. Schistosomiasis gehört zu den fünf häufigsten *neglected tropical diseases*, die zwar in den betroffenen Gebieten ein großes sozioökonomisches Problem darstellen, aber nur wenig globale Aufmerksamkeit und Unterstützung erhalten⁶². In Hochrisikogebieten ist die Prävalenz der Erkrankung sehr hoch¹⁰⁸. Weil Kinder schon früh wiederkehrend in Kontakt mit kontaminiertem Wasser kommen, infizieren sie sich oft innerhalb der ersten Lebensjahre⁴⁴. Beispielsweise wurden bei Kindern aus den Uferregionen des Weißen Nils in Uganda Prävalenzen von bis zu 100% gefunden¹⁴¹. Gründe für die massive Ausbreitung und Übertragung in endemischen Gebieten ist das warme Klima, die herrschende Armut, ein mangelhaftes Gesundheitssystem, unzureichende Sanitäranlagen und fehlender Zugang zu sauberem Trinkwasser⁶². Darüber hinaus ist auch die Therapie mit dem gut wirksamen Anthelminthikum Praziquantel wegen der anfallenden Kosten und fehlenden Infrastruktur eine Herausforderung^{82,211}. Dennoch konnte in den letzten Jahren eine Intensivierung der präventiven Massenbehandlungen mit Praziquantel erreicht werden¹⁰⁸. Besonders bei Schulkindern führten sie in Afrika zu einem Rückgang der Prävalenz von 23% (2000-2010) auf 9,6% (2015-2019)¹⁰⁸. Die COVID-19-Pandemie

fürhte allerdings 2020 zur Unterbrechung bzw. Verzögerung vieler Behandlungsprogramme, weshalb eine erneute Zunahme der Prävalenz zu befürchten ist ^{212,121}.

Durch die globale Erwärmung im Rahmen des Klimawandels und vermehrte Mobilität dehnen sich tropische Erkrankungen in neue Gebiete aus ^{115,211}. Es wird davon ausgegangen, dass Schistosomiasis in den nächsten Jahren bis in den Süden Europas vordringen wird ²¹⁸. Bereits 2014 wurde ein Ausbruch auf Korsika bekannt, bei dem sich etwa 120 Touristen und Einheimische angesteckt hatten ⁶⁴.

In endemischen Gebieten spielt vor allem die chronische Schistosomiasis eine große Rolle ⁴⁴. Sie kann sich zunächst durch unspezifische Symptome bemerkbar machen und führt in einigen Fällen zu gefährlichen Spätfolgen ⁸². Als schwerste Komplikation gilt die Entwicklung einer hepato-splenischen Schistosomiasis (HSS), die sich durch eine portale Hypertension und deren Folgen auszeichnet ⁸². Darüber hinaus kommt es gehäuft zu Koinfektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis B-Virus (HBV) oder Hepatitis C-Virus (HCV) ^{138,152} und es besteht eine Assoziation zu Plattenepithelkarzinomen der Harnblase (*S. haematobium*) sowie hepatozellulären Karzinomen (*S. mansoni*, *S. japonicum*) ^{31,221}.

In dieser Arbeit soll für die Art *S. mansoni* untersucht werden, inwieweit die hepatische Eibelastung das Ausmaß der Immunantwort und der Leberzellschädigung beeinflusst. Dazu werden zunächst die relevanten Hintergründe der Parasiteninfektion erläutert und der aktuelle Stand der Forschung dargelegt.

1.1.1. Lebenszyklus *S. mansoni*

Der Parasit *S. mansoni* durchläuft während eines Lebenszyklus unterschiedliche Stadien (Abbildung 1). Aus Eiern geschlüpfte Mirazidien befallen Süßwasserschnecken in stehenden Gewässern, vermehren sich dort asexuell und gelangen als Zerkarien zurück ins Wasser ¹⁷⁶. Kommen Menschen in Kontakt mit zerkarienhaltigem Wasser, penetrieren die Zerkarien die Haut, werden zu Schistosomulae und gelangen ins venöse Gefäßsystem des Menschen ¹⁴⁶. Über die Lunge wandern sie mit dem Blutstrom über die Mesenterialgefäße in die Pfortader, wo sie zu adulten männlichen oder weiblichen Würmern reifen und sich paaren ¹⁴⁶. Sie wandern anschließend gegen den Blutstrom in die venösen Gefäße des Darms zurück und legen dort ihre Eier ab ¹⁴⁶. Ein Weibchen legt bis zu 350 Eier am Tag ^{37,135} und überlebt mit ihrem Männchen ohne Therapie durchschnittlich 5-10 Jahre im Wirt ^{78,205}. Um den Kreislauf zu schließen, wandern die Eier durch die Gefäß- und Darmwand ins Darmlumen und werden mit dem Stuhl ausgeschieden ¹⁴⁶. Gelangt Stuhl mangels Sanitäreinrichtungen und Abwasserkanäle in Gewässer, schlüpfen dort Mirazidien aus den Eiern und der Kreislauf setzt sich fort ¹⁴⁶.

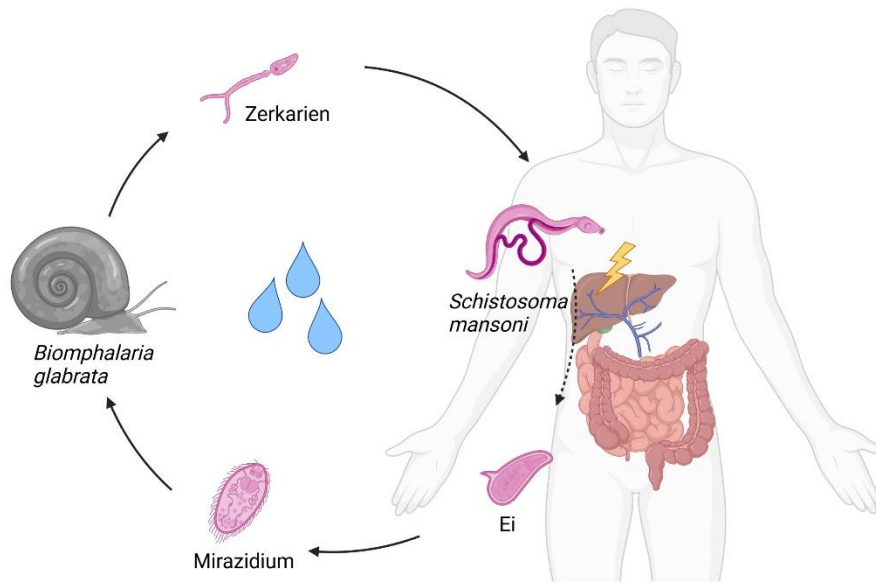


Abbildung 1: Lebenszyklus von *S. mansoni*

Gelangen *S. mansoni*-Eier in warme, stehende Gewässer, schlüpfen Mirazidien, die sich in Süßwasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*) vermehren. Sie gelangen als Zerkarien zurück ins Wasser und dringen bei Kontakt percutan in das humane Gefäßsystem ein. Sie wandern bis in die Pfortader, reifen zu adulten Würmern heran, paaren sich und legen ihre Eier im venösen Gefäßsystem des Darms ab. Die Eier migrieren durch die Darmwand, werden mit den Fäzes ausgeschieden und gelangen erneut in Gewässer. Der Kreislauf schließt sich. Manche Eier geraten über die Pfortader in die Leber und verursachen dort schwere Läsionen. Eigene Abbildung erstellt mit Biorender.com.

1.1.2. Pathogenese und Klinik der *S. mansoni*-Infektion

Nicht alle Eier durchlaufen den Kreislauf erfolgreich. Experimentellen Studien zufolge werden weniger als die Hälfte der gelegten Eier tatsächlich mit dem Stuhl ausgeschieden^{37,72,135}. Viele Eier werden mit dem Blutfluss aus den Mesenterialgefäßen wieder in die Pfortader gespült und „verirren“ sich so in die Leber^{118,135}. Sie migrieren aus den Pfortaderabgängen ins hepatische Gewebe und werden dort - ohne Möglichkeit das Organ wieder zu verlassen - dauerhaft eingeschlossen⁴⁴. Es entwickelt sich eine starke granulomatöse Entzündungsreaktion um die Eier, die folglich besonders ausgeprägt in unmittelbarer Nachbarschaft der periportalen Gefäße zu finden ist^{11,44}. Im chronischen Stadium werden die Immunzellen der Granulome zunehmend durch Fibroblasten ersetzt¹⁷. Die Größe der Granulome nimmt ab und es kommt zur Fibrosierung und Kalzifizierung der periportalen Bereiche¹⁷. Dabei bleiben die Hepatozyten intakt und die lobuläre Struktur der Leber erhalten¹⁷. Dies unterscheidet die assoziierte periportale Fibrose einer schweren hepatosplenischen Schistosomiasis (HSS) von der klassischen Leberzirrhose¹¹. Zum ersten Mal beschrieben wurde die Pathologie 1904 von William Symmers in Kairo¹⁸⁹. Bei mehreren Leberautopsien entdeckte er neben Schistosomiasis-Eiern eine ausgeprägte Vermehrung des fibrösen periportalen Gewebes¹⁸⁹. Da ihm die Form der Fibrose im Längsschnitt an weiße

Tonpfeifenstiele (engl. *pipe stems*) erinnerte, wird sie bis heute als „Symmer’s Pipe Stem Fibrosis“ bezeichnet ¹⁸⁹.

Klinisch kann bei einer *S. mansoni*-Infektion zwischen lokalen, akuten und chronischen Symptomen, sowie Spätkomplikationen unterschieden werden.

Zuerst äußert sich der perkutane Befall innerhalb weniger Stunden als Zerkarien-Dermatitis mit makulopapulösem Ausschlag und Juckreiz ¹⁰⁹.

Innerhalb von 4-6 Wochen tritt bei Erstinfektionen die akute Form der Schistosomiasis auf (Katayama-Fieber), die vermutlich durch eine systemische Hypersensitivitäts-Reaktion verursacht wird ^{167,180}. Sie manifestiert sich bei der Bevölkerung endemischer Regionen verhältnismäßig selten, vermutlich durch eine Lymphozyten-Sensibilisierung bereits *in utero* ^{82,107}. Das klinische Erscheinungsbild ist unspezifisch; es kann zu plötzlichem Fieber, Kopfschmerzen, respiratorischen Symptomen und Myalgien kommen ^{56,168}. Darüber hinaus kann im Verlauf eine entzündliche Hepatomegalie mit abdominellen Schmerzen und blutiger Diarrhö auftreten ^{56,168}.

Nach etwa drei Monaten geht die akute Schistosomiasis in die chronische über ¹⁷⁶. Obwohl sie sich in vielen Fällen nicht spezifisch äußert, werden vor allem bei Kindern Anämie, Malnutrition, verminderte körperliche Belastbarkeit und kognitive Entwicklungsstörungen beobachtet ^{17,44,66,77,106,176}.

Schwere hepatosplenische Komplikationen (HSS) können bei hoher Infektionslast, dauerhafter Entzündung, verminderter Fähigkeit der Immunmodulation sowie bei genetischer Prädisposition nach 5-15 Jahren auftreten ^{52,82,180}. Die stetig zunehmende periportale Fibrosierung löst eine portale Hypertension aus. Diese kann mit einer Splenomegalie, Aszites und portokavalen Anastomosen einhergehen, wobei letztere häufig zum Tod führen ^{44,82,180,206}. Der Übergang in ein Leberversagen ist zwar im dekompensierten Endstadium möglich, aber eher selten ¹¹.

1.1.3. Leberpathologie durch *S. mansoni*-Eier

Es ist bereits bekannt, dass die Organpathologie und die daraus resultierende Morbidität im Rahmen einer Schistosomiasis-Erkrankung nicht auf die Würmer, sondern auf die parasitären Eier zurückzuführen sind ^{44,86,180}. Die Eier sondern Ei-sezernierte Proteine ab (ESP) ¹³¹, die in einer zellulären Hüllschicht unterhalb der Eischale produziert werden ¹³. Die Proteine weisen ein breites Funktionsspektrum auf und interagieren auf unterschiedliche Weise mit dem periovulären Wirtsparenchym ⁸⁶. So besitzen einige Proteine eine enzymatische Aktivität oder binden Botenstoffe ^{131,187}. Andere sind in der Lage, bis in das Zytosol oder den Nukleus der Wirtszellen vorzudringen und dort die Proteinexpression zu beeinflussen ^{65,101}. Es kommt zur Schädigung der Hepatozyten ².

1.1.3.1. Leberzellschädigung

Zunächst muss betont werden, dass eine generalisierte Leberzellschädigung mit Leberversagen bei der Pathologie durch *S. mansoni* nicht im Vordergrund steht¹¹. Selbst bei einem schweren chronischen Verlauf kann die Leber noch lange ihre Funktion aufrechterhalten und es kommt erst spät zum Versagen des Organs¹¹. Dennoch wird in Tierversuchen und klinischen Studien immer wieder von einer Erhöhung der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Zusammenhang mit einer Schistosomen-Infektion berichtet^{9,49,114,161}. Besonders die Transaminase ALT weist spezifisch auf die Schädigung des Leberparenchyms hin¹⁶². Das Enzym wird im Zytosol der Hepatozyten exprimiert und bei deren Schädigung freigesetzt¹⁶². Oft ist der Transaminasen-Anstieg nicht oder nur leicht messbar^{24,49,60,180}. Das liegt vermutlich daran, dass nicht das gesamte Leberparenchym, sondern nur die Ei-nahen Bereiche von einer Schädigung betroffen sind.

Dass die parasitären Eier für die Hepatotoxizität verantwortlich sind, zeigten Abdulla et al.². Sie inkubierten primäre Maus-Hepatozyten mit *S. mansoni*-Eiern unterschiedlicher Anzahl². In einem zweiten Versuch stimulierten sie die Hepatozyten mit ESP-Bestandteilen zunehmender Konzentration². Zur Quantifizierung der Hepatotoxizität wurde anschließend die ALT-Aktivität bestimmt². Es zeigte sich eine Dosis-abhängige Schädigung der Hepatozyten durch die Eier und deren sezernierte Proteine². Sie nahm mit steigender Eizahl und ESP-Konzentration zu².

Die Hepatotoxizität der Eier kann auf verschiedene Pathomechanismen zurückgeführt werden, die im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.1.3.2. Immunantwort

Die Immunreaktion des Wirts trägt zur Ei-vermittelten Pathologie der hepatischen Schistosomiasis einen entscheidenden Teil bei⁸⁶. Selbst bei vollständiger Immunkompetenz können Schistosomen nicht vom menschlichen Immunsystem beseitigt werden und persistieren im hepatischen Gewebe¹⁷. Das Ziel des Wirts ist, den Parasiten in Schach und die Morbidität dabei möglichst gering zu halten¹⁷.

1.1.3.2.1. Akute Immunantwort

In der akuten Phase spielt die erworbene Immunantwort - besonders die T_H1- bzw. T_H2-Immunantwort - eine große Rolle. Namensgebend sind die *cluster of differentiation* 4-positiven (CD4+) T-Helferzellen Typ 1 und 2 (T_H1-, T_H2-Zellen), die jeweils zentrale Funktionen übernehmen⁷¹. Während die T_H1-Immunantwort proinflammatorisch wirkt, v.a. intrazelluläre Erreger bekämpft und bei fehlender Regulation zu ausgedehnter

Entzündung und Gewebeschäden führen kann, erfolgt die T_H2 -Antwort hauptsächlich antikörpervermittelt, dämpft die T_H1 -Antwort und trägt zur Eindämmung des Entzündungsgeschehens bei ^{144,169}.

Nachdem zu Beginn einer Infektion zunächst eine unspezifische Immunreaktion ausgelöst wird, geht diese in den ersten Tagen in eine T_H1 -Immunantwort über ¹⁷. Sie wird durch wandernde Schistosomulae und Wurmantigene ausgelöst und ist durch das Auftreten von hohen Interleukin (IL)-12-Spiegeln und T_H1 -Lymphozyten gekennzeichnet, die Interferon- γ (IFN- γ) und IL-2 sezernieren ^{32,176}.

Nach etwa fünf bis sechs Wochen – ab dem Zeitpunkt der Eiablage – erfolgt ein Übergang von der T_H1 - in eine T_H2 -Immunantwort ¹⁷⁶. Sie zeichnet sich durch eine Eosinophilie, erhöhte IL-4-, IL-5-, IL-13- und Immunglobulin (Ig) E-Spiegel sowie abnehmende T_H1 -Zytokin-Spiegel aus ¹⁷⁶. Das Entzündungsgeschehen ist auf das periovuläre Gewebe begrenzt und es bilden sich um die Eier Granulome ¹⁷⁶. Ausgelöst wird der Wechsel v.a. durch die Eier und deren ESP. Dies wurde bei der Injektion von Eiern in immun-naive Mäuse gezeigt ²⁰². Auch eine Stimulation von murinen Lebergewebe mit löslichen Ei-Antigenen (engl. *soluble egg antigens*, SEA) *in vitro* führte zur Sekretion T_H2 -typischer Zytokine, wohingegen T_H1 -Zytokine kaum messbar waren ⁸³. In einer Gegenprobe erhöhte eine Infektion von Mäusen mit gleichgeschlechtlichen Würmern (ohne Eiablage) zwar die Expression der T_H1 -Zytokine, eine T_H2 -Antwort blieb im Verlauf aber aus ⁸³. Der Verlauf der akuten Immunantwort ist in Abbildung 2 dargestellt.

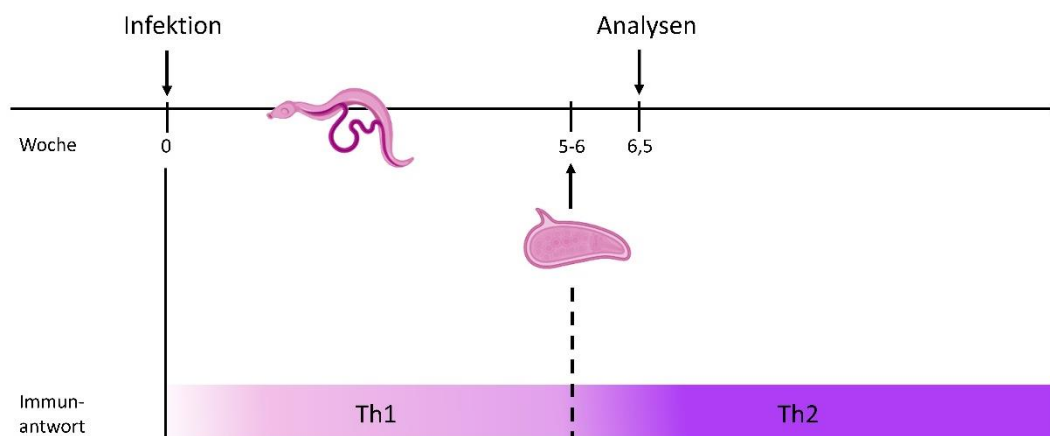


Abbildung 2: Dynamik der Immunantwort nach einer *S. mansoni*- Infektion

Infolge einer Infektion mit *S. mansoni* lösen die unreifen Vorstufen der Würmer zunächst eine T_H1 -Immunantwort aus. Nach 5-6 Wochen und erfolgter Wurmreifung und -paarung kommt es zur Eiablage. Die Eier induzieren den Übergang der T_H1 - in eine T_H2 -Immunantwort. Das Tierexperiment wurde nach 6,5 Wochen zur Analyse des hepatischen Gewebes beendet. Es ist davon auszugehen, dass sich die Tiere zu diesem Zeitpunkt in der Phase einer etablierten T_H2 -Immunantwort befanden. ¹⁷⁶
Teile der eigenen Abbildung wurden mit Biorender.com erstellt.

Für mehrere ESP-Bestandteile wurde bereits ein immunmodulatorischer Effekt nachgewiesen. Das Glykoprotein *Interleukin-4 inducing principle from schistosome eggs* (auch $\alpha 1$ genannt, IPSE/ $\alpha 1$) macht einen sehr großen Anteil der ESP aus¹³¹. Mit Hilfe seiner Glykostrukturen bindet es an C-Typ-Lektin-Rezeptoren der Wirtszellen¹³³. Es stimuliert humane und murine basophile Zellen IgE-abhängig zur massiven Freisetzung von IL-4 und IL-13^{68,175}. IPSE/ $\alpha 1$ ist außerdem in der Lage, mit Hilfe einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) bis in den Nukleus der Wirtszellen vorzudringen, an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu binden und die Genexpression zu beeinflussen¹⁰¹. Eine weitere Eigenschaft von IPSE/ $\alpha 1$ ist die Bindung selektiver Chemokine, weshalb es auch den Namen *S. mansoni chemokine binding protein* (SmCKBP) trägt^{173,187}.

Darüber hinaus nimmt auch das Glykoprotein $\omega 1$ Einfluss auf das Immungeschehen. Es bindet an Mannose-Rezeptoren dendritischer Zellen (DCs) und wird internalisiert⁶⁵. Mit Hilfe seiner RNase-Aktivität kann es *messenger RNA* (mRNA) und ribosomale RNA (rRNA) abbauen und die Proteinexpression stören⁶⁵. Dies führt zur Entwicklung eines T_H2 -induzierenden Zelltyps⁶⁵.

Auch das Glykoprotein $\kappa 5$ scheint für die Immunantwort sehr relevant zu sein. Es wird spezifisch von IgE erkannt und gebunden¹⁷⁴.

Als antigenpräsentierende Zellen nehmen dendritische Zellen ESP auf, präsentieren sie naiven CD4+ T-Zellen und aktivieren deren Differenzierung zu T_H2 -Lymphozyten¹²⁷. Diese sezernieren IL-4, IL-5 und IL-13 und bilden den Hauptbestandteil der Granulome¹⁷⁶. Sie sind für die Granulomentstehung sehr bedeutend, weshalb bei CD4+ T-Zell-depletierten Mäusen eine gestörte Granulombildung beobachtet wurde^{71,130}.

Neben T-Lymphozyten bestehen Granulome aus Eosinophilen, B-Lymphozyten, Basophilen, Neutrophilen und Makrophagen¹⁷⁶. Die genaue Funktion eosinophiler und neutrophiler Granulozyten im Granulom ist bisher noch ungeklärt¹⁷⁶. Eosinophile können zwar Schistosomulae bekämpfen, einen wesentlichen Beitrag zur Granulombildung scheinen sie jedoch nicht zu leisten^{81,193}. Stimuliert wird die Eosinophilie durch IL-5 und IL-13^{70,182}. B-Lymphozyten sind an der Entwicklung der T_H2 -Polarisierung beteiligt, produzieren IL-4, regulieren die Granulombildung und produzieren Antikörper (zunächst IgM und IgG, im Verlauf IgE) gegen ESP^{42,74,91,93,176}. Die Makrophagen werden entweder durch ESP direkt oder durch IL-4 und IL-13 zu alternativ aktivierten Makrophagen vom Typ M2 (AAMs) aktiviert^{177,224}. Diese spielen bei parasitären Erkrankungen im Allgemeinen eine wichtige Rolle: Im Gegensatz zu klassisch aktivierten Makrophagen (CAM) führen sie nicht zur Destruktion des Gewebes, sondern minimieren Gewebeschäden durch Unterstützung der Wundheilung und Förderung des Gewebeumbaus^{16,177}. Dies ist im Darm besonders relevant, weil AAMs dort parasitäre

Läsionen der Darmwand reparieren und die Darmbarriere aufrechterhalten^{48,90}. Bei Mäusen, in denen die IL-4-/IL-13-abhängige Aktivierung der AAMs ausgeschaltet wurde, kam es in der akuten Phase zu einer Mortalitätsrate von 100%⁹⁰.

Granulome sind sowohl für den Wirt, als auch für den Parasiten lebensnotwendig und deshalb von großer Bedeutung: Einerseits halten sie in Leber und Darm das Entzündungsgeschehen im Wirtsparenchym klar begrenzt und schirmen die umliegenden Wirtszellen von den gewebetoxischen Ei-Proteinen ab⁸⁶. Andererseits ermöglichen sie den unbeweglichen Eiern die Migration durch die Darmwand und sind deshalb für den erfolgreichen Lebenszyklus des Parasiten unabdingbar⁸⁶. Dass die Ei-Ausscheidung stark immunabhängig ist, unterstützt eine Studie mit HIV-positiven Proband:innen: Die Anzahl der im Stuhl ausgeschiedenen Eier korrelierte mit der Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten im Blut¹⁰⁰.

Allerdings hat die Bildung der Granulome auch einen entscheidenden Nachteil. Granulome enthalten neben Immunzellen auch profibrotische Zellen. Diese produzieren im Rahmen der T_H2-Antwort IL-13-abhängig Kollagen, welches sich im und um das Granulom anlagert^{34,70}. In der Leber wurden aktivierte hepatische Sternzellen (HSC) als wichtige Akteure der Fibrose-Entstehung identifiziert³⁴. Obwohl die T_H2-Antwort zwar erforderlich ist, um die Gewebe-schädigende T_H1-Antwort zu supprimieren, führt sie ohne Eindämmung selbst zu einem großen Parenchymschaden. Es entsteht eine zunehmende Fibrosierung der betroffenen Bereiche, was in einer HSS enden kann⁸⁶.

1.1.3.2.2. Chronische Immunantwort

Um eine übermäßige Fibrosierung zu vermeiden, wird im Verlauf der Infektion die T_H2-gesteuerte Granulombildung begrenzt. Granulome erreichen ihre maximale Größe 8-10 Wochen nach Infektion; etwa ab Woche 10 nimmt die Größe ab^{48,125}. Die Abnahme der Immunreaktion markiert den Übergang ins chronische Stadium⁴⁸. Als wichtige Akteure gelten dabei IL-10, AAMs, regulatorische B-Zellen (B_{reg}) und regulatorische T-Zellen (T_{reg})^{48,125}.

Im Allgemeinen ist das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen, Rezeptoren und immunaktiven Substanzen komplex und noch nicht gänzlich erforscht. Einen großen immunmodulatorischen Effekt wird dem Zytokin IL-10 zugeschrieben. Es vermindert Studien zufolge sowohl eine überschießende T_H1- als auch T_H2-Reaktion. Eine Infektion bei IL-10-/IL-12- und IL-4-/IL-10-defizienten Mäusen führte jeweils zu schwerer hepatischer Pathologie und zum Tod⁹². In der IL-10/IL-12-defizienten Gruppe kam es zu einer enormen Erhöhung der T_H2-Zytokine mit vergrößerten und stark fibrotischen Granulomen^{92,125}. In einer klinischen Studie berichteten Falcão et al. von höheren IL-10-

Spiegeln im Serum von Patient:innen in der chronischen Phase verglichen mit Patient:innen in der akuten Phase⁶⁷. Die gemessenen IL-10-Werte bei chronischen Patient:innen mit HSS waren auffallend niedrig, was mit einem protektiven Effekt von IL-10 in Einklang gebracht werden kann⁶⁷. Auch Booth et al. stellten einen Zusammenhang zwischen niedrigen IL-10-Werten und periportalener Fibrose fest²⁷.

Es ist inzwischen bekannt, dass die IL-10-Expression direkt durch die Eier ausgelöst werden kann. Dabei induzieren SEA und ganz besonders IPSE/ α 1 die Differenzierung der B-Lymphozyten zu B_{reg}, die wiederum IL-10 sezernieren⁸⁵. Auch die Bildung natürlicher T_{reg} (nT_{reg}) wird durch SEA und andere Ei-assoziierte Moleküle stimuliert^{195,200,222}. Vor allem im chronischen Stadium sind sie vermehrt messbar²²². Sie produzieren nicht nur IL-10, sondern supprimieren die T_H1- und T_H2-Antwort auch IL-10-unabhängig²²². So weisen T_{reg}- und *IL10*-depletierte Mäuse erhöhte IL-4- und IFN γ -Spiegel auf¹⁹. An ihrer Aktivierung sind DCs beteiligt¹¹⁹. Auch AAMs produzieren antiinflammatorische Faktoren, die die Aktivität und Proliferation der T_H2-Zellen reduzieren und leisten damit einen großen Beitrag zur Kontrolle der T_H2-Antwort¹⁷⁷. Zum Beispiel bauen AAMs mit Hilfe ihres Enzyms Arginase-1 Arginin ab, welches als lebensnotwendiges Substrat für T-Lymphozyten gilt und hemmen so deren Proliferation¹⁵⁴. Gleichzeitig hemmen sie damit ihre eigene Aktivierung durch T_H2-Zellen¹⁶.

Obwohl die Würmer einige Jahre überleben und kontinuierlich Eier in die Leber gelangen, entwickeln die meisten Patient:innen dank dieser konsequenten Regulierung der Immunreaktion keine tödliche Leberpathologie⁴⁸. Nur weniger als 10% der Infizierten erleiden schwere Symptome^{143,187}.

1.1.3.3. Metabolischer Stress

Nicht nur eine Immunantwort wird etabliert, auch der Metabolismus der Hepatozyten wird durch die *S. mansoni*-Eier verändert^{24,190}. Da die Leber eine große Rolle in der Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels des Wirts spielt, hat dies weitreichende Folgen für den gesamten Organismus.

1.1.3.3.1. Hepatischer Stoffwechsel

1.1.3.3.1.1. Lipidstoffwechsel

Lipide bilden eine vielfältige Gruppe von Verbindungen mit unterschiedlichsten Funktionen. Eine wichtige Aufgabe der Lipide ist die Energiegewinnung und -speicherung, wobei Triacylglyceride (TAG) als wesentliche Speichermoleküle den größten und effizientesten Energiespeicher des Organismus bilden. Sie bestehen jeweils

aus drei Fettsäuren (FS) und einem Glycerin-Molekül. Um TAG zu synthetisieren (Lipogenese), werden FS und Glycerin aktiviert und durch Esterbindungen miteinander verknüpft. FS werden ausgehend von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) synthetisiert. Nachdem Acetyl-CoA mit Hilfe der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) zu Malonyl-CoA carboxyliert wurde, wird die weitere FS-Synthese schrittweise durch das multifunktionelle Enzym Fettsäuresynthase (engl. *fatty acid synthase*; FAS) katalysiert. Der Vorgang findet im Zytosol der Leber und des Fettgewebes statt.

Besteht Energiebedarf, kommt es zur Lipolyse. Dabei werden TAG wieder zu FS und Glycerin hydrolysiert und FS für den weiteren Abbau verfügbar gemacht. In Mitochondrien erfolgt schrittweise die β -Oxidation der FS zu Acetyl-CoA, welches im Anschluss in den Citratzyklus eingeschleust werden kann und so der Energieerzeugung dient.

Reguliert werden Lipogenese und Lipolyse je nach Substratzufuhr oder -mangel. So führt Nahrungskarenz zur Stimulation der Lipolyse. Einige Substrate und Produkte wirken über Feedback-Mechanismen stimulierend oder hemmend auf die beteiligten Enzyme. Auch Proteinkinasen und Hormone beeinflussen die Aktivität der Enzyme. Insulin stimuliert beispielsweise die Lipogenese und hemmt die Lipolyse.^{122,123}

1.1.3.3.1.2. Kohlenhydratstoffwechsel

Auch Kohlenhydrate haben viele Funktionen. Sie sind nicht nur wichtige Strukturbestandteile der Organismen und vermitteln Zell-Zell-Kommunikation, sondern dienen als schnell metabolisierbare Energielieferanten und als Energiespeicher. Das Monosaccharid Glukose ist der wichtigste Energielieferant. Es wird im Zytosol aller Zellen durch Glykolyse zu Pyruvat abgebaut. Dabei werden Adenosintriphosphat (ATP)-Moleküle und die Reduktionsäquivalente Nikotinamidadenindinukleotid (NADH/H⁺) gebildet, die mit Hilfe der Atmungskette Energie in Form von ATP generieren können. Wird Pyruvat unter aeroben Bedingungen weiter abgebaut, kann es über den Citratzyklus weitere Reduktionsäquivalente und damit ATP erzeugen. Unter anaeroben Bedingungen entsteht stattdessen Laktat. Ein Schlüsselenzym der Glykolyse ist die Pyruvatkinase (PK). Glukose kann alternativ auch durch den Pentosephosphatweg abgebaut werden. Es entsteht NADPH/H⁺, das für anabole Prozesse (z.B. FS-Synthese) und zur Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies erforderlich ist. Unter Energieverbrauch wird Glukose in Hepatozyten bei der Glukoneogenese synthetisiert. Die Regulation des Auf- und Abbaus erfolgt über Schlüsselenzyme allosterisch oder hormonell durch Insulin und Glukagon.

Eine wichtige Speicherform der Kohlenhydrate ist Glykogen. Es ist ein Polymer aus stark verzweigten Glukoseresten und wird bei Glukoseüberschuss vor allem im Zytoplasma

der Leber und der Skelettmuskulatur gespeichert. Bei der Glykogensynthese wird Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert und aktiviert. Es kann durch das Schlüsselenzym Glykogensynthase (GyS) über eine glykosidische Bindung an bestehende Glykogen-Moleküle angebaut werden oder entsteht bei der *de novo*-Synthese mit Hilfe des Proteins Glykogenin. Abgebaut wird Glykogen im Rahmen der Glykogenolyse durch die phosphorolytische Spaltung in Glukose-Vorstufen und deren Weiterreaktion zu Glukose-Molekülen. Diese können durch die Einspeisung in die Glykolyse direkt Energie liefern oder an das Blut abgegeben werden. So kann der Blutglukosespiegel aufrechterhalten und die Versorgung der Organe sichergestellt werden. ^{123,142}

1.1.3.3.2. Hepatischer metabolischer Stress bei *S. mansoni*-Infektion

Nach Eiablage kommt es während einer *S. mansoni*-Infektion in der Leber zu einem Nährstoffmangel und der Beeinträchtigung bzw. Anpassung metabolischer Vorgänge der Hepatozyten ^{24,30}. Diese Auswirkungen auf den Stoffwechsel können als metabolischer Stress zusammengefasst werden ⁹⁸. Die Eier selbst scheinen nicht in der Lage zu sein, sich autark zu ernähren und sind auf die Aufnahme von Nährstoffen aus dem umliegenden Gewebe angewiesen ³⁰. Da ein Ei seine Masse nach der Eiablage etwa verdreifacht, ist von einem großen Nährstoffübergang auf die Eier auszugehen ¹³. Interessanterweise wurde in Studien beobachtet, dass infizierte Patient:innen niedrige Risikofaktoren für metabolische Erkrankungen aufwiesen ^{38,50,181,210}. Sie hatten signifikant reduzierte postprandiale und Nüchtern-Glukosespiegel, niedrigere HbA1c-Werte, einen geringeren Taillenumfang, einen niedrigeren Body-Mass-Index und eine niedrigere Prävalenz der Dyslipidämie, des Typ-2-Diabetes mellitus und des metabolischen Syndroms, verglichen mit Kontrollgruppen ^{38,50,181,210}. Auch im Tiermodell wiesen Mäuse nach Infektion eine reduzierte Körpermasse, weniger Körperfett, niedrigere Cholesterinwerte, eine reduzierte Insulinresistenz und Glukoseintoleranz und eine deutlich reduzierte Atherogenese auf ^{55,94,190}. Für die positiven Auswirkungen auf Glukose- und Fettstoffwechsel wird vor allem die T_H2-Immunantwort und die Aktivierung von AAMs verantwortlich gemacht ^{47,94}. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete, dass auch die Eier und ihre ESP einen großen Einfluss auf den Metabolismus der Hepatozyten ausüben ³⁰.

Eine Übersicht über die Regulation des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels ist in Abbildung 3 dargestellt.

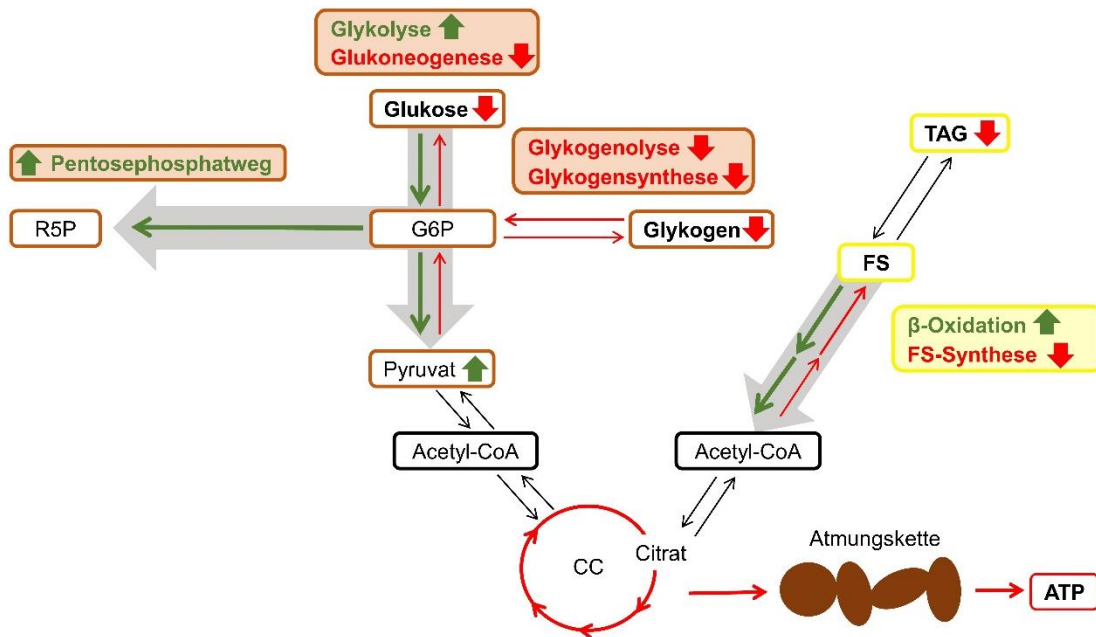


Abbildung 3: Regulation des hepatischen Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus bei *S. mansoni*-Infektion

Der Lipidstoffwechsel ist in Gelb, der Kohlenhydratstoffwechsel ist in Braun dargestellt. Die anabole FS-Synthese und Glukoneogenese sind herabreguliert (rote Pfeile), die katabole β -Oxidation und der Glukoseabbau (Glykolyse und Pentosephosphatweg) finden verstärkt statt (grüne Pfeile). Der Glykogen- und TAG-Gehalt des Leberparenchyms ist reduziert (rot). Glykogenolyse und Glykogensynthese sind ebenfalls herabreguliert (rote Pfeile). Auch CC und Atmungskette sind herabreguliert (dünne rote Pfeile). Es kommt zur Ansammlung von Pyruvat. Eigene Abbildung.

R5P: Ribose-5-Phosphat; G6P: Glukose-6-Phosphat; CC: Citratzyklus; FS: Fettsäure; TAG: Triacylglyceride; ATP: Adenosintriphosphat

1.1.3.3.2.1. Lipidstoffwechsel bei *S. mansoni*-Infektion

S. mansoni besitzen eine Reihe von Genen für Enzyme wichtiger Stoffwechselwege¹³¹. Allerdings sind sie nicht in der Lage, FS selbst zu synthetisieren und nehmen diese aus dem hepatischen Wirtsgewebe auf²³. Sie werden zunächst im unreifen Ei in Form von TAG gespeichert und während des Reifungsprozesses zunehmend für die Synthese von Membranbausteinen verbraucht²³. Der Gesamt-TAG-Gehalt infizierter Hamster- und Mauslebern zeigte sich in mehreren Studien passend dazu deutlich reduziert, wobei eine Akkumulation der Lipide im Bereich der Granulome und Eier nachzuweisen war^{30,190}. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe von *Live Imaging Analysen* verfolgt, wie parasitäre Eier Lipide aus ihrer Umgebung aufnehmen und speichern³⁰.

Ferner ist bekannt, dass eine Schistosomen-Infektion Auswirkungen auf die Expression der Enzyme des hepatischen Fettstoffwechsels hat. Die Enzyme der β -Oxidation werden vermehrt exprimiert, die Enzymexpression der FS-Synthese (FAS, ACC) und die Lipidaufnahme sind reduziert^{30,217}.

1.1.3.3.2.2. Kohlenhydratstoffwechsel bei *S. mansoni*-Infektion

Eine Infektion mit *S. mansoni* führt zu einer Veränderung des Glykogen- und des Glukosestoffwechsels. Neben dem Abbau des Fettspeichers kommt es zu einer Abnahme des Glykogengehalts der Leber^{30,179}. Die Glykogensynthese ist passend dazu reduziert; die Expression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms GYS ist herabreguliert³⁰. Die Glykogenolyse ist ebenfalls reduziert^{5,30,170}.

Der Glukose-Abbau über eine verstärkt ablaufende Glykolyse ist ein Hauptmerkmal des hepatischen Kohlenhydratstoffwechsels während der Infektion. Die Expression der PK und weiterer Glykolyse-spezifischer Enzyme sind erhöht^{30,161,217}, während die Glukoneogenese reduziert ist^{161,217}. Auch die Untersuchung von Metaboliten im Urin von mit *S. mansoni*-infizierten Mäusen wies auf eine verstärkt ablaufende Glykolyse hin²¹³. Interessanterweise waren sowohl der Citratzyklus, als auch die Atmungskette in mehreren Untersuchungen herabreguliert^{5,87,161}. Weiterhin zeigten sich die Pyruvat-Spiegel erhöht, was eine Ansammlung und ggf. alternative Verwendung der Glykolyse-Produkte nahe legt^{179,213}.

Auch der Glukose-Abbau über den Pentosephosphatweg ist gesteigert. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) wird vermehrt exprimiert^{30,179}.

1.1.3.4. Oxidativer Stress

Neben metabolischen Veränderungen verursachen Eier und ihre Antigene die Entstehung sogenannter reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS)¹. Können diese mit Hilfe antioxidativer Mechanismen nicht ausreichend abgebaut werden, kann das Oxidantien-Antioxidantien-Gleichgewicht nicht aufrechterhalten werden¹⁸⁴. Es verschiebt sich zugunsten der Oxidantien, was als *oxidativer Stress* bezeichnet wird¹⁸⁴.

1.1.3.4.1. Entstehung des oxidativen Stresses

ROS sind kleine, von Sauerstoff abgeleitete Moleküle, die besonders reaktionsfreudig sind²⁰. Dazu gehören Sauerstoffradikale, wie das Hydroxylradikal (OH•) und das Superoxidradikalanion (O₂•⁻) sowie Nichtradikale wie das aggressive Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H₂O₂)²⁰. ROS entstammen als physiologisches Nebenprodukt einer Reihe intrazellulärer Reaktionen. Besonders hervorzuheben ist ihre Entstehung bei der überlebensnotwendigen ATP-Produktion über die Atmungskette in Mitochondrien²¹⁹. In angemessenen Konzentrationen nützen sie dem Organismus und dienen als wichtige Signalmoleküle zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und zur Unterstützung der Immunantwort^{157,178}. Liegen zu viele ROS vor, überwiegt

allerdings ihr negativer Effekt. Dieser kann durch endogene Überproduktion oder exogene Auslöser, wie ultraviolette Strahlung oder Medikamente, hervorgerufen werden ¹⁴⁵. Die reaktionsfreudigen Moleküle interagieren mit intrazellulären Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nucleinsäuren, verändern deren Struktur und Funktion und führen so zu irreversiblen Zellschäden ²⁰.

1.1.3.4.2. Antioxidative Mechanismen

Um die gewebescheidigenden Folgen einer übermäßigen ROS-Entstehung zu verhindern, verfügen Organismen über antioxidative Mechanismen ¹⁴⁵. Eine Reihe von Enzymen ist an der Umwandlung der reaktiven Sauerstoffmoleküle zu weniger schädlichen Verbindungen beteiligt ¹⁴⁵. Dazu gehören die Enzyme Katalase, Superoxid-dismutase (SOD) 1 und 2 und die Glutathion-Peroxidase (GPx) ¹⁴⁵. Die SOD 1 wird auch als Mangan-SOD (MnSOD) bezeichnet und kommt in den Mitochondrien vor, wohingegen die SOD 2 (auch Kupfer-Zink-SOD; CuZnSOD) im Zytoplasma und Nucleus auftritt ¹⁷¹. Die Katalase befindet sich hauptsächlich in Peroxisomen ¹⁷¹. Bei ihrem Abbau reagieren ROS über H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff. Die beteiligten Enzyme und Reaktionen sind schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Über den Pentosephosphatweg ist der ROS-Abbau mit dem Glukose-Stoffwechsel verbunden. Bei der Umsetzung von H_2O_2 durch die GPx fungiert Glutathion in seiner reduzierten Form (GSH) als Reduktionsmittel ¹⁶⁵. Zur Regeneration des oxidierten

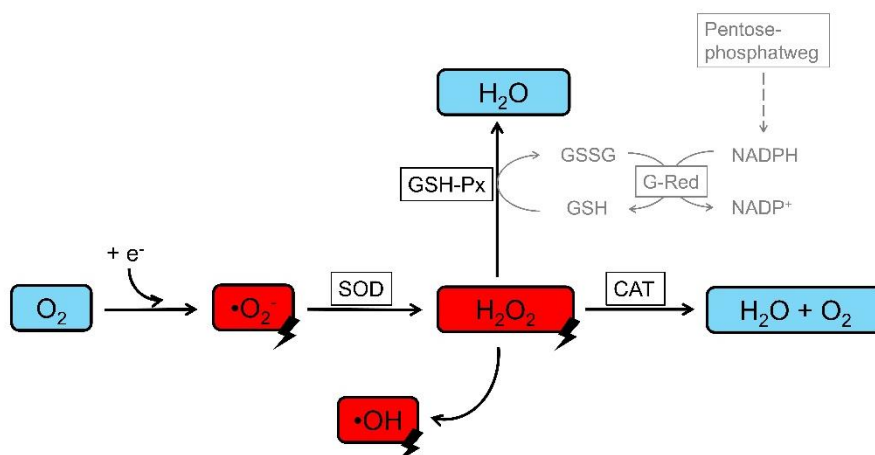


Abbildung 4: Entstehung und Abbau reaktiver Sauerstoffmoleküle

$\bullet O_2^-$ entsteht, wenn Elektronen auf Sauerstoffmoleküle übertragen werden. Es kann mit Hilfe der SOD zu H_2O_2 reagieren. H_2O_2 wiederum kann mit Metall-Ionen (z.B. Kupfer oder Eisen) zu $\bullet OH$ reagieren und Zellschäden verursachen. Reagiert H_2O_2 weiter durch das Enzym Katalase, wird es zu H_2O und O_2 neutralisiert oder es wird durch die GPx zu H_2O umgesetzt. Dabei dient GSH als Reduktionsmittel und wird gleichzeitig zu GSSG oxidiert. Bei der Regeneration durch die G-Red erfolgt seine NADPH-abhängige Reduktion zurück zu GSH. Das NADPH stammt aus dem Pentosephosphatweg.

rot = ROS; blau = unschädliche Moleküle; $\bullet O_2^-$: Superoxidanion; $\bullet OH$: Hydroxylradikal; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; O_2 : Sauerstoff; H_2O : Wasser; e^- : Elektron; SOD: Superoxiddismutase; CAT: Katalase; GPx: Glutathion-Peroxidase; G-Red: Glutathion-Reduktase; GSH: Glutathion (reduziert); GSSG: Glutathiondisulfid (oxidiert); NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert); NADP⁺: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert). Abbildung modifiziert nach Ribas et al. ¹ und Sarsour et al. ¹⁷¹.

Glutathions (GSSG) wird anschließend Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) benötigt, das über den Pentosephosphatweg generiert wird ¹⁹¹.

Neben nicht-enzymatischen Molekülen wie Vitamin C und E und Bilirubin, vermitteln auch Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) antioxidative Effekte und tragen zur ROS-Reduktion bei ^{95,145,219}.

1.1.3.4.3. Hepatischer oxidativer Stress bei *S. mansoni*-Infektion

In vielen Studien wurde erhöhter hepatischer oxidativer Stress sowohl bei *S. mansoni*-infizierten Menschen als auch im Tiermodell nachgewiesen ^{1,61,150,153}. Bisher galt die begleitende Immunantwort als dessen Auslöser ¹⁵⁰. Es zeigte sich, dass eosinophile Granulozyten Peroxidase-abhängig reaktive oxidative Moleküle freisetzen, um larvale *S. mansoni*-Vorstufen zu bekämpfen ⁷⁹. Auch andere Granulom-assoziierte Leukozyten (v.a. Makrophagen und Lymphozyten) scheinen in unmittelbarer Nähe zu den Eiern ROS abzugeben, um diese zu attackieren ^{1,112}.

Allerdings wurde jüngst in einer Studie unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass oxidativer Stress nicht allein auf Immunzellen zurückzuführen ist ³⁰. Nach der *in vitro* Stimulation von Hepatozyten mit SEA wurde ihr Malondialdehyd (MDA)-Spiegel bestimmt ³⁰. MDA entsteht bei der Peroxidation von Lipiden durch reaktive Sauerstoffmoleküle und gilt als Marker für oxidativen Stress ³⁰. Die stimulierten Zellen wiesen signifikant höhere MDA-Werte auf als die Kontrollen - ganz ohne die Anwesenheit von Immunzellen ³⁰. SEA ist also selbst in der Lage, in Hepatozyten oxidativen Stress zu induzieren ³⁰.

Interessanterweise werden in Zusammenhang mit erhöhtem oxidativem Stress bei *S. mansoni*-Infektionen reduzierte Spiegel antioxidativer Enzyme beschrieben. Besonders die Katalase-Expression zeigte sich in mehreren Studien signifikant reduziert ^{79,150}, während die Untersuchung anderer antioxidativer Enzyme wie SOD 1 und 2 und GPx in unterschiedlichen Studien widersprüchliche Ergebnisse lieferten ^{79,150}. Oxidativer Stress wird für die schwere hepatische Pathologie und die Folgen einer Infektion mit *S. mansoni* mitverantwortlich gemacht. Oxidativer Stress unterstützt die Entstehung fibrotischer Läsionen, führt zu DNA-Schäden, zur Aktivierung von Protoonkogenen und steht damit vermutlich im Zusammenhang mit der Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) ^{21,30,31,158,188}.

1.1.4. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der *S. mansoni*-induzierten Effekte in der Wirtsleber von der Menge der parasitären Eier abhängig ist. Die Eier und ihre sezernierten Proteine werden hauptsächlich für die Leberpathologie der *S. mansoni*-Infektion verantwortlich gemacht⁸². In unserer Arbeitsgruppe wurde in mehreren Zellkulturexperimenten nachgewiesen, dass SEA in isolierten Hepatozyten pathologische Effekte induzieren^{30,166}. Dazu gehören unter anderem die Entstehung von oxidativem Stress und die Veränderungen des Metabolismus³⁰.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die pathologischen Effekte in der Leber *in vivo* mit ansteigender Eilast zunehmen. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit im Hamstermodell der Zusammenhang zwischen der hepatischen Eizahl und der Leberpathologie mittels Regressionsanalysen untersucht werden.

Im Mittelpunkt standen hierbei die Ausprägung der Immunantwort sowie die Umprogrammierung metabolischer Reaktionen und der daraus resultierende oxidative Stress. Für die Analyse der Immunantwort sollte die Expression von T_H1- und T_H2-Zytokinen (IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-10, IL-6) ermittelt werden; für Stoffwechsel und oxidativen Stress wesentliche (Schrittmacher-) Enzyme des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels (FAS, GyS, PKM, G6PD), Glykogengehalt der Leber sowie antioxidative Enzyme (Katalase). Abbildung 5 zeigt schematisch die untersuchten Teilbereiche der durch *S. mansoni* ausgelösten Leberschäden. Die Eilast wurde mit Hilfe des Kaliumhydroxid (KOH)-Verdaus bestimmt. Für die *in vivo* Analysen erfolgte die Untersuchung von Lebergewebe infizierter Hamster. Die Ergebnisse sollten *in vitro* mit SEA-stimulierten HepG2-Zellen bestätigt werden.

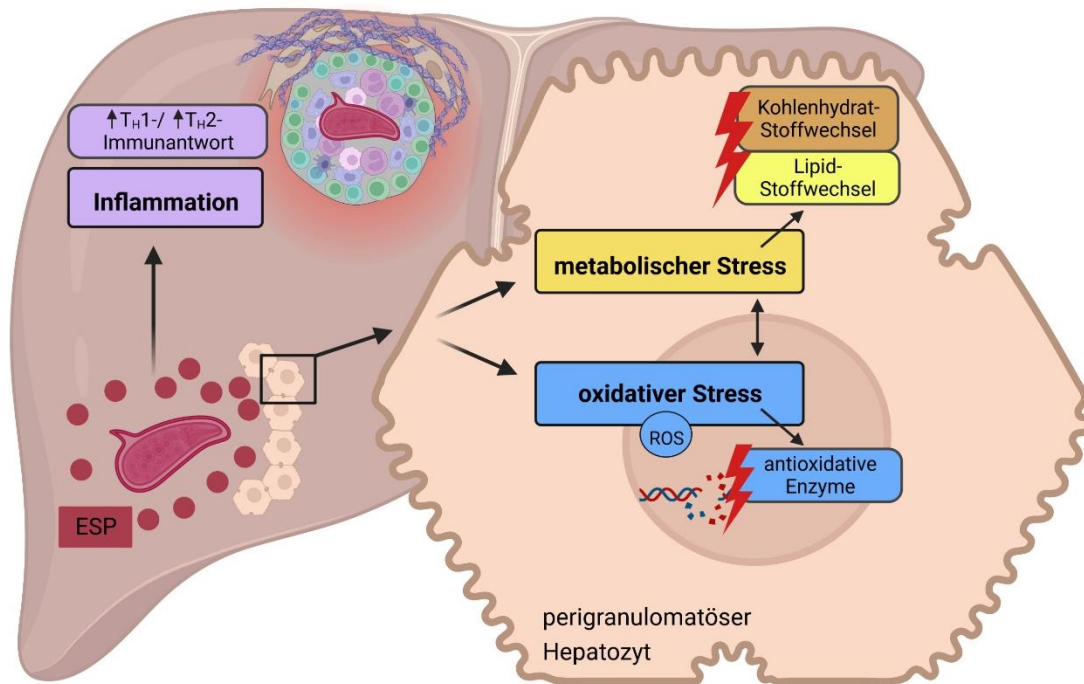


Abbildung 5: Die Wirkung von *S. mansoni*-Eiern auf Leberparenchym und Hepatozyten

Gelangen Eier in das Leberparenchym, lösen sie eine T_H2 -Immunantwort aus, die bis dahin ausgeprägte T_H1 -Antwort wird herunterreguliert. Es bilden sich Granulome um die Eier. Eier und ihre Ei-sezernierten Proteine (ESP) beeinflussen die Stoffwechselwege der perigranulomatösen Hepatozyten (Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel). Sie erhöhen den zellulären oxidativen Stress. Es kommt vermehrt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Reduktion antioxidativer Enzyme. Dies schadet der Zelle.
Eigene Abbildung erstellt mit Biorender.com

1.2. Materialien und Methoden

1.2.1. Materialien

1.2.1.1. Oligonukleotide

Tabelle 1: Oligonukleotide

Primer-Paar	Sequenz	T _A *
Hamster		
<i>Actb</i>	Sense: 5'-GGC CGT CTT CCC CTC CAT CGT-3' Antisense: 5'-CCA GTT GGT GAC AAT GCC GTG T-3'	60°C
<i>Cat</i>	Sense: 5'-TCC GTC CTT CAT CCA TAG C-3' Antisense: 5'-TGT GAG CCG TAG CCA TTC-3'	55°C
<i>Fasn</i>	Sense: 5'-CAC AGA TGA TGA CAG GAG ATG G-3' Antisense: 5'-TCG GAG TGA GGC TGG GTT GAT-3'	58°C
<i>G6pd</i>	Sense: 5'-CTC ACA GTG GAT GAC ATC CG-3' Antisense: 5'-CAT CAT ATT GGC CAG CCA CAT-3'	60°C
<i>Gpx</i>	Sense: 5'-TTA CAT CGC CAA GTC GTT CTA TG-3' Antisense: 5'-CTG GTT GAA GTC TCT GGT AGT TG-3'	55°C
<i>Gusb</i>	Sense: 5'-GCT TCC GCG CTG ATT TCT C-3' Antisense: 5'-CTG GAA GGG ACT GGC ATG T-3'	60°C
<i>Gys2</i>	Sense: 5'-GAC CGA GAA GCC AAC GAC A-3' Antisense: 5'-TCC AGC CTG CCA TTC ATG G-3'	60°C
<i>Hprt1</i>	Sense: 5'-AGC CTG TTG GGC TTA CTT CC-3' Antisense: 5'-CAC TAA TCA CGA CGC TGG GA-3'	57°C
<i>Ifng</i>	Sense: 5'-CCA GGC CAT CCA GAG GAG CA-3' Antisense: 5'-CCA CCC CCA AAA CAG CAC CG-3'	60°C
<i>Il10</i>	Sense: 5'-TCC GAG AGC TGA GGA CTG CC-3' Antisense: 5'-TGG TTC TCT GCC TGG GGC AT-3'	60°C
<i>Il13</i>	Sense: 5'-AAT GGC GGG TTC TGT GCA GC-3' Antisense: 5'-TGA TGC CCT TCG GAC GCA GA-3'	60°C
<i>Il4</i>	Sense: 5'-GGG TCT CAG GCC CCA GCT AG-3' Antisense: 5'-TTG CGA AGC ACC TGG GAA GC-3'	60°C
<i>Il5</i>	Sense: 5'-AAC GAG ACG GTG AGG CTT CCT-3' Antisense: 5'-CGC CTC TCC TGG CCA CAC TG-3'	60°C
<i>Il6</i>	Sense: 5'-ACG CCT AGC CCA ACC TCC AA-3' Antisense: 5'-TCG GTA TGC TAA GGC ACA GCA C-3'	60°C
<i>Ipse/α1</i>	Sense: 5'-GCG TTG GCT CAC TCT CAC CAC C-3' Antisense: 5'-ACA GTA TGT CCT TCT CCG TTT CGG T-3'	60°C

<i>Nfe2l2</i>	Sense: 5'-ACC AGA GAC GGC AAT GTA TTC-3' Antisense: 5'-ACA TCA CAG TAG GAA GTC TTA GC-3'	55°C
<i>Pkm</i>	Sense: 5'-CTC TAC CGA CCT GTT GCT G-3' Antisense: 5'-GTG GCT CCC TTC TTC AGC T-3'	60°C
<i>Rps18</i>	Sense: 5'-GCA GAC ATC GAC CTC ACC AA-3' Antisense: 5'-ACT TTC CGT CCT TCA CGT CC-3'	57°C
<i>Sod1</i>	Sense: 5'-TCA GGA GAG CAT TCC ATC ATT G-3' Antisense: 5'-TCC CAG CAT TTC CAG TCT TTG-3'	55°C
<i>Sod2</i>	Sense: 5'-CTG GAG CCG CAC ATC AAC-3' Antisense: 5'-AAG AGC AAC CTG AGT CGT AAC-3'	55°C
<i>Srsf4</i>	Sense: 5'-GCA GTT ACG GTT CTG GAC G-3' Antisense: 5'-TCA GGT CTT GCC AGC TGC A-3'	59°C
<i>Tubb</i>	Sense: 5'-TGC TCG GCA CCT ACC TTG AA-3' Antisense: 5'-CCT CCC AGA ACT TAG CAC CGA-3'	59°C
Human		
<i>ACTB</i>	Sense: 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA-3' Antisense: 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3'	57°C
<i>CAT</i>	Sense: 5'-GAT AGC CTT CGA CCC AAG CA-3' Antisense: 5'-ATG GCG GTG AGT GTC AGG AT-3'	57°C
<i>GAPDH</i>	Sense: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3' Antisense: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	57°C
<i>GUSB</i>	Sense: 5'-CAC CAG GGA CCA TCC AAT ACC-3' Antisense: 5'-GCA GTC CAG CGT AGT TGA AAA A-3'	57°C
<i>RPS18</i>	Sense: 5'-GAT CAG ATA CCG TCG TAG TTC C-3' Antisense: 5'-TAT CAA TCT GTC AAT CCT GTC C-3'	57°C
<i>SRSF4</i>	Sense: 5'-TTA AGG GCT ACG GGA AGA TCC-3' Antisense: 5'-ATG CTC AAC AAT TAC TCG CTC A-3'	57°C
<i>TUBB</i>	Sense: 5'-TGG AAC CCA CAG TCA TTG ATG A-3' Antisense: 5'-TGA TCT CCT TGC CAA TGG TGT A-3'	57°C

Die Primer wurden von der Firma Microsynth AG, Balgach, Schweiz hergestellt.

*T_A: verwendete Annealing-Temperatur

1.2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Agarose (broad range) #T846.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 96% (V/V) vergällt #27685	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol absolut vergällt #27690	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8%, #9065.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Formaldehyd-Lösung ≥37% #104003	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin-Lösung, Gill 1 #GHS116-500ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
Isopropanol #33539-2.5L-M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
Kaliumhydroxid Plätzchen (KOH) #1.05032.1000	Merck KGaA, Darmstadt
MOPS ≥99.5% (titration) #M1254-1KG	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
Natriumacetat #KMF.08-319	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Natriumhydroxid (NaOH) #6771.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NorthernMax® Formaldehyd-Ladefarbstoff #AM8552	Invitrogen, Waltham, Massachusetts (USA)
Pertex™ Eindeckmittel #41-4012-00	Biosystems Switzerland AG, Muttenz, Schweiz
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG #11733-046	Invitrogen, Waltham, Massachusetts (USA)
RNase AWAY™ Oberflächendekontaminationsmittel #7002	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Salzsäure (HCL) #30721-1L-M	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
Shandon™ Eosin-Y Stain #6766007	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
β-Mercaptoethanol #60242	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
Trypanblaue Lösung, 0,4% #15250-061	Life Technologies Corporation, Grand Island, New York (USA)
Xylene ≥98.5% #28975.325	VWR International GmbH, Darmstadt

1.2.1.3. Kommerzielle Kits

Tabelle 3: Kommerzielle Kits

Glucose (HK) Assay Kit # GAHK20-1KT	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (USA)
iScript® cDNA Synthesis Kit #1708891	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Kalifornien (USA)
QIAshredder® (250) #79656	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set #79254	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit (250) #74106	Qiagen GmbH, Hilden

1.2.1.4. Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

10x MOPS pH 7,0	41,8 g MOPS 6,8 g Natriumacetat-Trihydrat 1000 ml Aqua dest. Mit 10M NaOH auf pH 7,0 einstellen
Kollagen I-Verdünnung (50 µg/ml)	49,17 ml Essigsäure (20 mM) 833 µL Kollagen I (3 mg/ml)

1.2.1.5. Oligonukleotide

1.2.1.6. Zelllinie

Tabelle 5: Zelllinie

HepG2 Zellen	
Firma	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim
Produktnummer	300198
Organismus	Homo sapiens (human)
Ethnische Herkunft	kaukasisch
Alter	15 Jahre
Geschlecht	männlich
Gewebe	Leber
Morphologie	epithelial
Zelltyp	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)
Wachstumseigenschaften	Einzelschicht, adhärent

1.2.1.7. Medien und Zusatzstoffe

Tabelle 6: Medien und Zusatzstoffe

DMEM #P04-04510 (w: 4.5 g/L Glucose, w: stable Glutamine, w: Sodium pyruvate, w: 3,7 g/L NaHCO ₃)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DPBS #17-512F	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
FBS Good (Filtrated Bovine Serum) #P40-37500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Gibco™ Collagen I, Rat Tail 3 mg/ml #A10483-01	Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien (USA)
Penicillin/Streptomycin #P06-07050	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
SEA gelöst in PBS (2,655 mg/ml)	AG Prof. Grevelding, Institut für Parasitologie, JLU Gießen
Trypsin/EDTA #P10-0231SP	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

1.2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Biosphere® Filter Tips #70.760.211	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 100 #70.762.211	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
CELLSTAR® 12 Well Cell Culture Plate #665 180	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® 96 Well Cell Culture Plate #655 180	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® TUBES, 15 ml #188 271	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® TUBES, 50 ml #227 261	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Zellkultur Schale #664160	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
Corning® Falcon® Zellschaber, 1,8 cm #10707441	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
C-Slide Disposable Hemocytometer #CUR-CRCSD-NI50	Curiosis Inc., Seoul, Südkorea
Deckgläser Automat-Star 24x50mm #K12450A1,5	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm #612-1702	VWR International GmbH, Darmstadt
HistoBond®+S adhäsive Objektträger #0810501	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0.1 ml #4358293	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts (USA)

MicroAmp® Optical 8-Cap Strips #4323032	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts (USA)
Microplatte, 96 Well, UV-STAR® Coc, F-Boden, Kaminform, schwarz #655809	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µL, farblos #70.3010	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl, blau #70.762.010	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 20µl, farblos #70.3020	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µl, gelb #70.760.012	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 0,5 ml #72.699	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml #72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 2,0 ml #72.695.500	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht

1.2.1.9. Geräte

Tabelle 8: Geräte

Agagel Maxi Biometra®	biometra Analytik GmbH, Göttingen
Canon EOS 600D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
ChemiDoc® Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Consort® Spannungsgeber	Fisher Bioblock Scientific, Villeneuve-d'Ascq, Frankreich
Dispergiergerät Ultra TURRAX T3	IKA-Labortechnik, Staufen
FACSCOPE® B	Curiosis Inc., Seoul, Südkorea
Feinwaage Kern 440-47	KERN & SOHN GmbH, Albstadt
Gefrierschrank GNP3376	Liebherr-Werk Biberach, Biberach
Großzentrifuge GS-6KR	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien (USA)
HERACELL 150 i CO2 Incubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL Typ 090-135.002	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen
LaminAir® HBB	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Lichtmikroskop Leitz DMRB	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer RCTB 00.084009	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikrowelle 900 & Grill	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Mikrozentrifuge IR 6000 rpm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikrozentrifuge Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt

NanoZoomer	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Pipette serologisch 10 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmunster (Österreich)
Pipette serologisch 5 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmunster (Österreich)
Pipetten Abimed	International Labmate Ltd, St Albans, Vereinigtes Königreich
Pipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
PipetusR-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Platten-Reader Infinite® 200 PRO	Tecan Group Ltd., Männedorf (Schweiz)
Spektralphotometer NanoDrop® 2000	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
StepOnePlus® Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts (USA)
Stickstofftank CFB-160	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Husum- Mildstedt
Thermocycler T3000	Biometra GmbH (jetzt Analytik Jena GmbH), Göttingen
ThermoMixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank Heraeus T12	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Ultratiefkühlgerät TSX50086V	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Vertical Autoclave 3870ELV	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Vortex Schüttler VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Wasseraufbereitungsanlage Millipore ELIX® Essential	Fa. Merck Millipore, Billerica, Massachusetts (USA)

1.2.1.10. Versuchstiere (Hamster)

Für das Tiermodell wurden syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) mit Zerkarien eines liberianischen Stamms (Bayer AG, Monheim) infiziert. Als Zwischenwirt dienten Wasserschnecken der Spezies *Biomphalaria glabrata*. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Lebern der Versuchstiere stammen aus dem Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen, Schubertstraße 81, 35392 Gießen, mit dem eine Kooperation unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Christoph Grevelding (Arbeitsgruppe Prof. Grevelding) besteht (Geschäftszeichen der Tierversuchsanträge: V54-19 c 20/15 h 02 GI 18/10 Nr. A 1/2014 und V54-19 c 20/15 h 02 GI 18/10 Nr. A 26/2018).

1.2.1.11. *Schistosoma mansoni*-Eier

Die *S. mansoni*-Eier wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Grevelding nach der Perfusion aus den Lebern der Hamster gewonnen und aufgereinigt (Geschäftszeichen der Tierversuchsanträge: V54-19 c 20/15 h 02 GI 18/10 Nr. A 1/2014 und V54-19 c 20/15 h 02 GI 18/10 Nr. A 26/2018) ⁵¹. Sie wurden in M199-Medium mit 10% Serum (NCS; *newborn calf serum*) und 1% Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in einem Brutschrank bei 37°C bis zum Beginn des Experiments aufbewahrt.

1.2.1.12. Software

BioRender Online Tool	BioRender, Toronto, Kanada
Citavi 6.14, 2022	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
NDP.view 2	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
NDP-scan for SQ1.0.9.	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Python, Version 3.9.15, 2022 und assoziierte Bibliotheken	Python Software Foundation, Beaverton, Oregon (USA)
SPSS Inc., Version 26.0, 2019	IBM Corporation, Armonk, New York (USA)
StepOne®-Software, Version 2.2.2, 2011	Life Technologies Corporation, Foster City, Kalifornien (USA)

1.2.2. Tierexperimentelle Methoden

1.2.2.1. Tierversuch

1.2.2.1.1. Versuchsaufbau

Im Institut für Parasitologie der JLU wurden die Goldhamster im Alter von acht Wochen durch Badeinfektion in Zerkarien-Wasser (2x 45 Minuten, 1750 Zerkarien) infiziert und nach 46 Tagen getötet. Um zwischen Effekten, verursacht durch adulte Würmer oder durch Eier, differenzieren zu können, wurden die Goldhamster in drei Gruppen eingeteilt: Die „bisex“ infizierte Gruppe wurde mit männlichen und weiblichen Zerkarien infiziert, sodass im Verlauf eine Paarung mit Eiablage stattfinden konnte (n = 22). Die „monosex“ infizierte Gruppe wurde als Kontrollgruppe ausschließlich mit Zerkarien eines Geschlechts infiziert, um eine Eiablage zu verhindern (n = 10) und die „nicht infizierte“ Gruppe diente als Superkontrolle (n = 6).

1.2.2.1.2. Gewinnung der Gewebeproben

Die Lebern der Tiere wurden *in situ* perfundiert, entnommen, mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert. Sie wurden auf Eis zu Pulver gemörsert, als Gewebeschnitte oder in Form von Gewebestücken verwendet.

1.2.2.2. Bestimmung der hepatischen Eilast

Um den Grad des Eibefalls der bisex infizierten Hamsterlebern zu ermitteln, wurden die parasitären Eier zunächst mit Hilfe eines Gewebeverdaus aus Leberstücken isoliert und anschließend gezählt.

1.2.2.2.1. KOH-Verdau des Lebergewebes

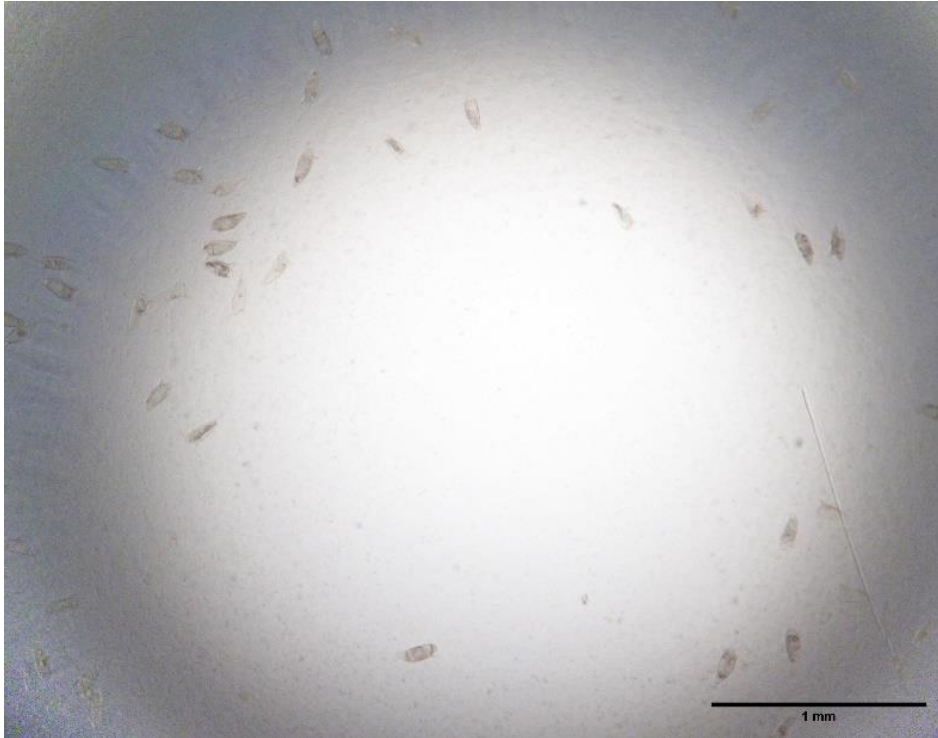
Die Isolation der Eier erfolgte durch Verdau des Lebergewebes durch KOH nach Cheever³⁵. Die Lauge führt durch Destruktion molekularer Strukturen zur Verflüssigung des Gewebes. Da Schistosomen-Eier im Gegensatz zu Lebergewebe durch die KOH-Lösung nur schwer verdaulich sind, hat sich die Methode zur Bestimmung der Eilast bewährt³⁶. Die widerstandsfähige, harte Schale der Eier besteht aus einer stark vernetzten Proteinmatrix, die z.B. auch bei der Sklerosierung von Insektenpanzern eine große Rolle spielt^{26,53}.

Für jedes Versuchstier wurden etwa 100 mg Lebergewebe in ein Reaktionsgefäß abgewogen und 5%-KOH-Lösung hinzugegeben (pro 100 mg Gewebe 1 ml KOH-Lösung). Zur Unterstützung und Beschleunigung des Gewebeverdaus erfolgte eine Inkubation für 16 Stunden bei 37°C im Trockenschrank.

1.2.2.2.2. Auszählung der parasitären Eier

Nach der Inkubation enthielten die Reaktionsgefäße abgesehen von den gelösten Eiern keine festen Bestandteile mehr. In eine beschriftete 96-Well-Platte wurden pro Probe jeweils 20 µl in drei Wells pipettiert. Um eine repräsentative Eimenge aus einer homogenen Suspension zu entnehmen, wurde jedes Reaktionsgefäß vor dem Pipettieren dreimal invertiert und die Lösung auf und ab pipettiert. Nach Entfernen der Luftblasen wurden die Eier pro Well bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop gezählt (Abbildung 6). Für jede Probe wurde der Mittelwert berechnet und von Eiern/Well in Eier/mg Lebergewebe umgerechnet (Faktor 1/1,818).

A



B



Abbildung 6: Schistosomen-Eier nach KOH-Verdau unter dem Lichtmikroskop.
(A) Übersichtsaufnahme, Balken entspricht 1 mm. (B) Detailansicht von 3 Eiern, Balken entspricht 0,1 mm.

1.2.3. Molekularbiologische Methoden

Um Aussagen über die Genexpression bestimmter Proteine zu treffen, kann mRNA quantifiziert werden. mRNA dient als Matrize bei der Translation genetischer Information in Aminosäureketten. Sie kann aus Gewebeproben isoliert werden und nach einer Qualitätsprüfung in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Mit spezifischen Primern wird sie schließlich mit Hilfe der quantitativen Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR, engl. *real-time polymerase chain reaction*) analysiert.

1.2.3.1. mRNA-Isolation aus Gewebeproben

Zur Quantifizierung der mRNA durch die qRT-PCR erfolgte die Isolation der mRNA aus den Leberproben der bisex, monosex und nicht infizierten Tiere. Verwendet wurde das *RNeasy*® Mini Kit von Qiagen. Die Durchführung erfolgte leicht modifiziert nach dem Protokoll des Herstellers¹⁶⁰. Das fein gemörserte Lebergewebe wurde auf Eis in schockgefrostete Reaktionsgefäße abgewogen (20-30 mg), um ein Auftauen der Proben und dabei die Zerstörung der enthaltenen mRNA zu verhindern. Um das Gewebe zu lysieren, wurden 25 ml des Lysepuffers (RLT-Puffer aus dem Kit) mit 250 µl β-Mercaptoethanol versetzt und je 600 µl zum gekühlten Lebergewebe gegeben. Der Lysepuffer besteht zu großen Teilen aus Guanidinisothiocyanat, das Proteine denaturiert und Zellen lysiert¹⁶³. β-Mercaptoethanol verhindert den RNA-Abbau, indem es RNasen denaturiert¹³⁷. Zusätzlich verhindert es die oxidative Schädigung der RNA durch seine reduzierende Wirkung¹⁶³. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben mit einem Dispergiergerät (Ultra TURRAX) homogenisiert. Bei Raumtemperatur wurde das Homogenisat auf Shredder-Säulen gegeben (*QIAshredder*®, Fa. Qiagen) und zentrifugiert. Die Säulen homogenisieren die Lysate fein und filtern dabei unlösliche Rückstände heraus. Der Überstand - inklusive RNA - wurde mit 600 µl 70% unvergälltem Ethanol versetzt und in zwei Schritten (jeweils 600 µl) auf die Spin-Säulen aus dem Kit pipettiert. Jede Säule enthält eine positiv-geladene Siliziumdioxid-Membran, an die die negativ geladene mRNA bindet⁶³. Die Säulen wurden anschließend zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Vorgang wiederholt. Zum Waschen der Membran und zur Entfernung von Verunreinigungen wurden nun 350 µl Waschpuffer (RW1-Puffer aus Kit) auf die Säulen pipettiert, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Um unerwünschte DNA-Fragmente zu verdauen und eine Reinheit der mRNA zu erreichen, wurden DNasen aus dem *RNase-Free DNase Set* (Fa. Qiagen) verwendet. Es wurden 10 µl DNase und 70 µl DNase-Puffer auf die Säulen gegeben und diese für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift mit RW1-Waschpuffer wiederholt (s.o.). Es erfolgte die Überführung der Säulen in frische Sammelröhrchen (*Collection Tubes*

aus dem Kit) und zwei weitere Waschschr tte mit 500 µl Waschpuffer (RPE-Puffer aus dem Kit). Nach mehrmaliger Zentrifugation wurden nun die trockenen RNA-haltigen Säulen in ein Reaktionsgefäß (aus dem Kit) transferiert. Um die mRNA unter salzarmen Bedingungen von der Membran zu lösen, wurden 40 µl RNase-freies Wasser (Kit) direkt auf die Membran gegeben, 5 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die in Wasser gelöste mRNA wurde im Reaktionsgefäß aufgefangen und die Spin-Säule verworfen. Die mRNA wurde sofort auf Eis gestellt und auf Eis weiterverarbeitet bzw. bei -80°C gelagert, um den Abbau der empfindlichen Moleküle zu verhindern.

1.2.3.2. mRNA-Isolation aus Zelllysaten

Für die mRNA-Isolation aus Zellen wurde ebenfalls das *RNeasy*® Mini Kit von Qiagen verwendet und ggf. die Mengen der eingesetzten Reagenzien angepasst. Die Zellen wurden nach Aussaat, Medienwechsel und Stimulation (s. 1.2.6.2) in ihren Wells mit kalter steriler PBS (engl. *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferter Salzlösung) gewaschen. Nach Absaugen der PBS mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden 600 µl RLT-Puffer mit -Mercaptoethanol (Ansatz: 5 ml RLT-Puffer und 50 µl -Mercaptoethanol) zur Zelllyse in jedes Well gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Wells gelöst und zusammen mit dem Lysepuffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Wenn die mRNA-Isolation nicht am selben Tag erfolgen konnte, wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Isolation bei -80°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden die Zelllysate auf Eis gelagert. Sie wurden mit einem Dispergiergerät homogenisiert und die nächsten Schritte erfolgten nun nach Protokoll des Herstellers (s. 1.2.3.1). Nach Gabe des Homogenisats auf die Shredder-Säulen und Zentrifugation wurde der Überstand mit Ethanol auf die Spin-Säulen pipettiert und zentrifugiert. Zwischen den Waschschr tten (mit RW1- und RPE-Puffer) erfolgte der DNase-Verdau, wie oben beschrieben. Um die RNA zum Schluss in Wasser zu lösen, wurden 30 µl RNase-freies Wasser verwendet, da die Menge der Zellen deutlich geringer war, als die der Gewebelysate und deshalb auch geringere Mengen mRNA erwartet wurden.

1.2.3.3. mRNA-Isolation aus *S. mansoni*-Eiern

Auch die RNA-Isolation aus lebendigen *S. mansoni*-Eiern erfolgte mit dem *RNeasy*® Mini Kit von Qiagen. Die Eier wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Grevelding in Medium zur Verfügung gestellt. 821 µl der Ei-Medium-Suspension (~10.000 Eier) wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für 5 Minuten in der Grozentrifuge GS-6KR bei 2300 rpm ohne Bremse zentrifugiert. So konnten Eier und Medium getrennt und das Medium anschließend abgesaugt werden. Um die Eier zu reinigen, wurde sterile PBS

hinzugegeben und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstands, wurde der Waschschrift wiederholt. Um die Eier zu lysieren, wurden 350 µl Lysepuffer hinzugegeben und mit Hilfe des Dispergiergeräts homogenisiert. Weil die Schale der Eier sehr widerstandsfähig ist, wurde zusätzlich mit einem Gewebezerstoßer gearbeitet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Protokoll (s. 1.2.3.1) mit angepassten Volumina. Verwendet wurden wie oben beschrieben 350 µl 70%-Ethanol, aber jeweils nur 250 µl RW1- und 300 µl RPE-Waschpuffer. Zum Verdau der DNasen wurden 50 µl Puffer und 7 µl DNase verwendet. Die RNA wurde schließlich in 20 µl Wasser gelöst.

1.2.3.4. Konzentrationsbestimmung der mRNA mittels Spektralphotometer

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der isolierten RNA, erfolgte mit einem Spektralphotometer (NanoDrop® 2000, Fa. Thermo Scientific). NanoDrop® wurde speziell für die Analyse von Nukleinsäuren entwickelt. Im Vergleich zu klassischen Photometern mit großen Küvetten werden hier Probenvolumina im Mikroliter-Bereich eingesetzt. Ein Spektralphotometer sendet monochromatisches Licht verschiedener Wellenlängen durch eine Flüssigkeit und detektiert das transmittierte Licht. Jeder Stoff absorbiert Licht einer ganz bestimmten Wellenlänge, wobei das Maß der Absorption proportional zur Konzentration des Stoffes ist. Deshalb kann aus dem Absorptionsverhalten auf die Substanz und ihre Konzentration geschlossen werden. Nukleinsäuren absorbieren besonders ultraviolettes Licht der Wellenlänge 260 nm. Nachdem das Gerät mit 1 µl RNase-freiem Wasser kalibriert und der Leerwert mit 1 µl RNase-freiem Wasser bestimmt wurde, erfolgte die Messung von 1 µl mRNA-Lösung. Dabei formt sich die Lösung auf der Messsonde zu einem Tropfen und es entsteht eine Flüssigkeitssäule. So kann das Licht durch die Flüssigkeit gesendet und anschließend die Absorption gemessen werden. Die RNA-Konzentration wurde mit der Nanodrop®-Software mit Hilfe der modifizierten Lambert-Beer-Formel ermittelt:

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) \times 40 \times V$$

C_{RNA} = RNA-Konzentration der Probe [ng/µl]

A_{260} = Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm

A_{LW} = Absorption der Leerwertprobe bei einer Wellenlänge von 260 nm

40 = RNA-spezifischer Multiplikationsfaktor

V = Verdünnungsfaktor

Die Zielkonzentration lag bei mindestens 200 ng/µl.

Die Reinheit der mRNA wurde anhand des $A_{260/280}$ - und $A_{260/230}$ -Quotienten überprüft. $A_{260/280}$ wird bestimmt, indem der Absorptionswert der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm durch den Absorptionswert bei 280 nm dividiert wird (A_{260nm}/A_{280nm} , analog

$A_{260/230} = A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$). Da Proteine Strahlung der Wellenlänge von 280 nm absorbieren, weist ein $A_{260/280} < 2$ auf eine Kontamination der Probe durch Proteine hin. Ein niedriger $A_{260/230}$ ($< 1,8$) spricht für eine Kontamination mit anderen organischen Verbindungen, deren Absorptionsmaximum häufig bei 230 nm liegt.

1.2.3.5. Qualitätskontrolle der mRNA mittels Agarosegel

Um zu bestätigen, dass tatsächlich reine, intakte RNA isoliert wurde, wurde mit den Proben eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei werden Nukleinsäuren nach ihrer Größe in sogenannte Banden aufgetrennt. Agarose ist ein stark vernetztes Polysaccharid, das in seiner Struktur einem dreidimensionalen Gitter ähnelt. Werden die Proben auf das Gel aufgetragen und zwischen den Enden des Gels eine Spannung angelegt, bewegen sich die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Für die negative Ladung der Nukleinsäuren sind die Phosphatgruppen des Grundgerüsts verantwortlich¹⁶³. Sie ist proportional zur Molekülgröße¹⁶³. Da bei großen Molekülen starke Reibungskräfte bei der Fortbewegung auftreten, ist es für kleine Nukleinsäuren einfacher, das netzförmige Gel zu passieren¹⁶³. Je kleiner die Nukleinsäuren sind, desto schneller und damit weiter bewegen sie sich¹⁶³. Bei der Herstellung des 1,2% Agarosegels wurden 138,75 ml MOPS Puffer und 1,8 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Nachdem es auf 60°C abgekühlt war, wurden 11,25 ml Formaldehyd hinzugefügt. Formaldehyd soll verhindern, dass die RNA unerwünschte Sekundärstrukturen ausbildet¹⁶³. Das Gel wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Durch den Kamm entstehen kleine Kammern im Gel, in die später die RNA-Lysate gegeben werden. Entstandene Luftblasen wurden entfernt und anschließend 20 Minuten gewartet, bis das Gel polymerisiert war. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der RNA-Proben. Je 1 µl RNA wurde mit 4 µl Ladepuffer versetzt. Dieser wurde mit Ethidiumbromid versetzt (50µl/ml), welches zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet wird. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der RNA oder DNA und macht sie durch seine fluoreszierenden Eigenschaften bei ultraviolettem Licht sichtbar. Der Proben-Ansatz wurde bei 65°C für 10 Minuten in einem Heizblock erwärmt und anschließend kurz zentrifugiert. Nach Aushärtung des Gels wurde dieses in die Elektrophorese-Kammer gesetzt und mit MOPS Puffer bedeckt. Je 5 µl der RNA-Ansätze wurden einzeln in die Kammern pipettiert. Nach Anschluss an den Stromgeber wurden für 40 Minuten eine Spannung von 130 V angelegt. Um die Nukleinsäuren anschließend sichtbar zu machen, wurde der ChemiDoc®-Imager (Fa. Bio-Rad) verwendet.

Da die mRNA nur etwa 1-5% der RNA ausmacht und unterschiedliche Größen hat, ist sie im Gel kaum abzugrenzen¹⁶³. Kleine mRNA-Moleküle laufen oft sogar aus dem Gel heraus¹⁶³. Der größte Teil der RNA einer Zelle (~ 80%) besteht aus rRNA¹⁶³. Die rRNA eukaryotischer Zellen enthält 18S und 28S rRNA, die unterschiedlich viele Nukleotide enthalten¹⁶³. Sie sollten getrennt als Banden abgrenzbar sein. Die Qualität der RNA ist gut, wenn das Verhältnis der 28S-Bande zur 18S-Bande etwa 2:1 beträgt. Weitere Banden können auf eine Verunreinigung mit DNA hinweisen.

1.2.3.6. Umschreibung der mRNA in cDNA

Weil mRNA sehr instabil ist und die Polymerase bei der qRT-PCR keine mRNA binden kann, muss sie in cDNA umgeschrieben werden. Diese enthält die komplementäre Basenabfolge der mRNA und entspricht der kodierenden DNA-Sequenz des Genoms. Allerdings enthält die cDNA im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns. Zur Umschreibung wurde das *iScript® cDNA Synthesis* Kit von Bio-Rad verwendet²⁵.

Die Übersetzung der mRNA in eine cDNA-Sequenz erfolgt durch das Enzym Reverse-Transkriptase (RT). Es stammt ursprünglich aus Retroviren. Die hier verwendete RT ist eine modifizierte RT des Moloney Maus-Leukämie-Virus (M-MLV), das oft zur Umschreibung verwendet wird. Sie enthält mehrere Domänen: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine RNase H und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase und zugesetzten Primern und Nukleotiden lagert sich auf der mRNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang an. Primer sind Oligonukleotide, die die Transkription als Startsequenz initiieren. Als Primer diente eine Mischung aus Oligo(dT)- und Random-Hexamer-Primern. Die Oligo(dT)-Primer bestehen aus einer kurzen Nukleotidsequenz der Base Thymin. Da reife mRNA am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz besitzt, kann hier der Primer binden, ohne die Sequenz der mRNA zu kennen. Bei Random-Hexamer-Primern handelt es sich um verschiedene Hexanukleotide mit zufälliger Basenfolge. Sie können an unterschiedlichen Stellen der mRNA binden und somit die RNA vollständig abdecken. Nach Synthese des ersten DNA-Strangs wird die mRNA-Matrize durch die RNase H abgebaut. Am ersten DNA-Strang entsteht nun mit Hilfe der DNA-abhängigen DNA-Polymerase ein weiterer komplementärer DNA-Strang, sodass nun ein cDNA-Doppelstrang vorliegt.

Die benötigten Enzyme, Primer und Nukleotide (Desoxyribonukleosidtriphosphate; dNTPs) sind im *iScript® cDNA Synthesis* Kit enthalten. Für die Quantifizierung bestimmter Sequenzen mittels PCR ist es wichtig, dass die Gesamtkonzentration der Nukleotide der verschiedenen Proben identisch ist. Allerdings sind die Unterschiede in der Ausbeute bei der RNA-Isolation zwischen den Proben nicht zu vermeiden und müssen ausgeglichen werden. In frischen Reaktionsgefäßen wurden die Proben mit

RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass eine RNA-Konzentration von 1 µg/15 µl erreicht wurde. Die ursprünglichen RNA-Konzentrationen der Proben (C_{RNA}) wurden bereits mit Hilfe des NanoDrops® ermittelt (s. 1.2.3.4). Anhand dieser Werte wurden die Verdünnungen für jede Probe berechnet:

$$V_{RNA} = 1 \mu\text{g} / C_{RNA}$$

$$V_{H_2O} = 15 \mu\text{l} - V_{RNA}$$

Zu 15 µl Probe wurden 5 µl Master-Mix aus dem Kit hinzugefügt. Dieser wurde wie folgt angesetzt:

Pro Probe:

4 µl 5x iScript Reactions Mix

1 µl iScript Reverse Transcriptase

Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt, um optimale Temperaturen für die Transkriptionsphasen zu schaffen:

Thermozyklus:	25°C	5 Minuten	Hybridisierung Primer und mRNA
	42°C	30 Minuten	Reverse Transkription
	85°C	5 Minuten	Denaturierung der RT
	Abkühlen auf 4°C		

Die cDNA wurde anschließend auf Eis gestellt, 1:2 verdünnt und bei -20°C gelagert.

1.2.3.7. Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

1.2.3.7.1. Prinzip der qRT-PCR

Bei der PCR erfolgt die Vervielfältigung der cDNA-Abschnitte, die nachgewiesen und quantifiziert werden sollen. Es werden Primer verwendet, die spezifisch an die gesuchte Nukleotidsequenz binden und dort die Synthese komplementärer Stränge initiieren. In einem Thermocycler erfolgt zu Beginn die Denaturierung des cDNA-Doppelstrangs bei 95°C in zwei Einzelstränge. Nach einer Abkühlung auf etwa 60°C lagern sich die Primer an (Annealing). Es wird für beide Einzelstränge ein eigener Primer benötigt (sense und antisense). Diese binden jeweils am 3'-Ende der gesuchten Sequenz und schließen so die gesuchte DNA-Sequenz ein. Für die Synthese der komplementären Stränge ist das Enzym Taq DNA-Polymerase essentiell. Es bindet an das 3'-Ende der Primer und setzt dort die DNA-Synthese fort (Elongation). Die Taq Polymerase ist hitzestabil, weshalb sie bei erhöhten Temperaturen arbeiten und während der PCR auch einer Temperatur von 95°C standhalten kann. Nachdem zwei DNA-Doppelstränge entstanden sind, wiederholt sich der Reaktionszyklus. Es kommt erneut zu Denaturierung, Annealing und Elongation.

Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die gesuchte DNA-Sequenz, weshalb die Menge exponentiell ansteigt. Um die entstandene DNA zu quantifizieren, wird der fluoreszierende Farbstoff *SYBR® Green* eingesetzt. Dieser bindet an Doppelstrang-DNA (dsDNA), indem er mit der kleinen Furche interagiert, in die Basenpaare interkaliert und mit Molekülgruppen der DNA wechselwirkt⁵⁹. In gebundener Form fluoresziert *SYBR® Green* bei Licht der Wellenlänge ~520 nm 1000x stärker als ungebunden⁵⁹. Die Fluoreszenz kann deshalb zur quantitativen Bestimmung der DNA-Konzentration genutzt werden. Da nicht nur *SYBR® Green*-DNA fluoresziert, wird ROX (Carboxy-Rhodamin-X) als Referenzfarbstoff verwendet, um Fluoreszenzsignale anderer Quellen herauszufiltern. Die Fluoreszenz von ROX wird durch PCR-Produkte nicht beeinflusst. Für das auf ROX normalisierte Fluoreszenzsignal R_n gilt:

$$R_n = \text{Fluoreszenz (SYBR-Green)} / \text{Fluoreszenz (ROX)}.$$

Gemessen wird das Fluoreszenzsignal nach jedem Amplifikationszyklus. Die Signalstärke ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge. Der Zyklus, bei dem die Signalstärke einen festgelegten Wert T überschreitet (*Threshold*), wird als Threshold-Zyklus C_T bezeichnet. Je weniger Ausgangs-DNA in der Probe vorhanden ist, desto mehr Zyklen müssen durchlaufen werden, bis das Signal den Threshold-Wert erreicht

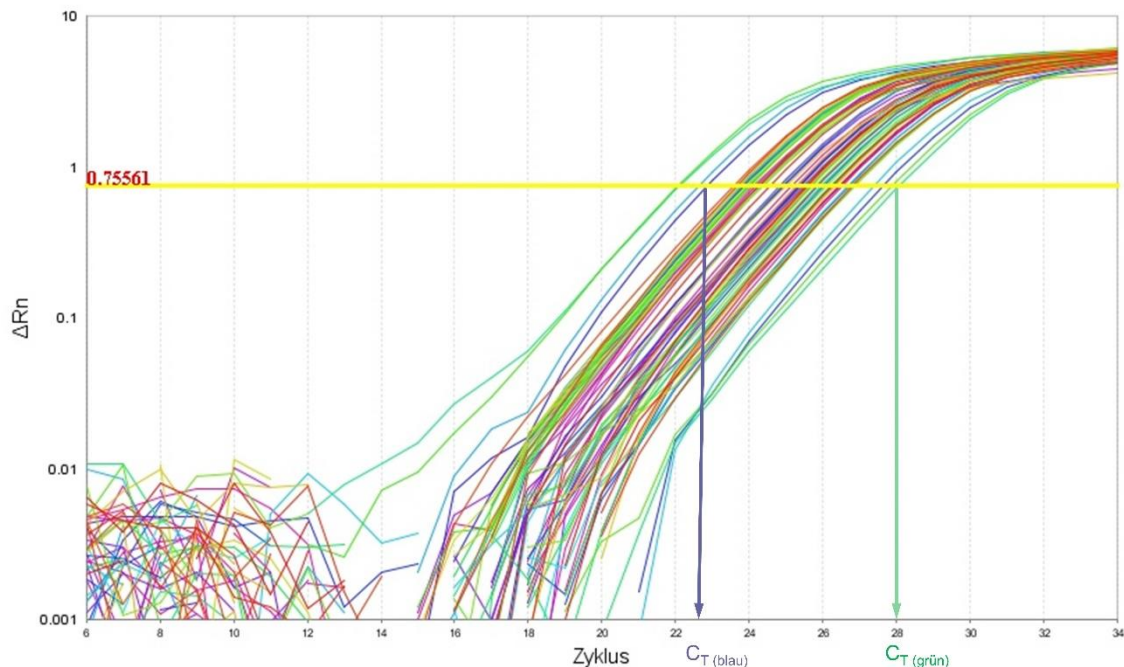


Abbildung 7: Exemplarisches Amplifikationsdiagramm einer qRT-PCR des Enzyms FAS

Aufgetragen wurde ΔR_n gegen die Anzahl der PCR-Zyklen. ΔR_n ist das normalisierte Fluoreszenzsignal R_n der amplifizierten dsDNA nach Subtraktion der Basislinie. Das Signal jeder Probe ist in einer Farbe dargestellt. Der *Threshold* lag bei dieser Messung bei 0,75561 (gelbe Linie). Die C_T -Werte können für jede Probe abgelesen werden. Beispielhaft wurden die C_T -Werte zweier Proben markiert ($C_T(\text{blau}) = 22,85$; $C_T(\text{grün}) = 28,03$).

Das Diagramm wurde von der StepOne® Software ausgegeben und ergänzt.

und desto größer ist der C_T -Wert. Abbildung 7 zeigt exemplarisch ein Amplifikationsdiagramm für die mRNA des Enzyms FAS.

Mit dem C_T -Wert jeder Probe kann die Ausgangs-DNA mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode nach Livak und Schmittgen relativ quantifiziert werden ¹²⁰:

$$N_x = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(C_{T;X;Y} - C_{T;X;Ref}) - (C_{T;MW;Y} - C_{T;MW;Ref})}$$

N_x = Menge der Ausgangs-DNA der Probe x [Vielfaches der Referenzgruppe]

$C_{T;X;Y}$ = C_T -Wert der Probe x bei Ermittlung des Zielgens y

$C_{T;X;Ref}$ = C_T -Wert der Probe x bei Ermittlung des Referenzgens

$C_{T;MW;Y}$ = Mittelwert aller C_T -Werte der Referenzgruppe bei Ermittlung des Zielgens y

$C_{T;MW;Ref}$ = Mittelwert aller C_T -Werte der Referenzgruppe bei Ermittlung des Referenzgens

Der C_T -Wert jeder Probe wird auf den Durchschnittswert einer Referenzgruppe normalisiert und als Vielfaches dieser angegeben. In dieser Arbeit diente die nicht infizierte Kohorte als Referenzgruppe. Lediglich bei der Auswertung der *I14*-Quantifizierung musste davon abgewichen werden. Hier wurde die monosex infizierte Gruppe als Referenz herangezogen, da die gesuchte cDNA in der nicht infizierten Gruppe nicht nachweisbar war. Bei der Quantifizierung der SEA-Komponente *Ipse/α1* dienten isolierte *S. mansoni*-Eier als Referenzgruppe. Um mögliche Schwankungen der Gesamt-DNA-Menge der Proben auszugleichen, wurde außerdem auf die Expression eines Referenzgens normalisiert (s. 1.2.3.9).

Mit Hilfe einer Schmelzkurve kann nach der PCR überprüft werden, ob die Amplifikation der Target-DNA erfolgreich war und ob unspezifische Nebenprodukte entstanden sind.

1.2.3.7.2. Durchführung der qRT-PCR

Bei der Vorbereitung wurden jeweils 1 µl der cDNA-Probe als Doppelwert in PCR-Reaktionsgefäße (*Tube Strips*) überführt und mit 11,5 µl Mastermix versetzt. Als Kontrolle diente 1 µl Aqua destillata (Aqua dest.) und Mastermix, um Verunreinigungen auszuschließen. Der Mastermix setzte sich aus dem Primer-Paar, dem *SYBR® Green*-Reaktionsmix und Aqua dest. zusammen:

Mastermix pro Probe:	Primer, sense	0,25 µl
	Primer, antisense	0,25 µl
	<i>SYBR® Green</i> -Reaktionsmix	6,30 µl
	Aqua dest.	4,70 µl

Die Primer wurden von der Firma Microsynth hergestellt und zu einer Konzentration von 10 µM verdünnt. Als Reaktionsmix wurde der *Platinum® SYBR® Green qPCR*

SuperMix-UDG (Fa. Invitrogen) verwendet. Dieser enthält eine Taq DNA-Polymerase, die Farbstoffe *SYBR® Green* und ROX, Reaktionspuffer (mit Mg²⁺-Ionen), dNTPs und das Enzym Uracil-DNA Glykosylase (UDG). Der dNTP-Mix beinhaltet u.a. Uracil als Base, die statt Thymin in die DNA eingebaut wird. Um eine Verschleppungskontamination mit PCR-Produkten aus vorherigen Reaktionen zu vermeiden, spaltet die UDG vor Beginn der PCR Uracil vom DNA-Grundgerüst und verhindert so die Amplifikation dieser Sequenzen. Die befüllten *Tube Strips* wurden anzentrifugiert und mit Hilfe des *StepOnePlus® Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems) analysiert. Es diente gleichzeitig als Thermocycler und Fluoreszenzphotometer, schaffte optimale Temperaturen für jeden Reaktionsschritt (Abbildung 8) und erfasste nach jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität der markierten dsDNA.

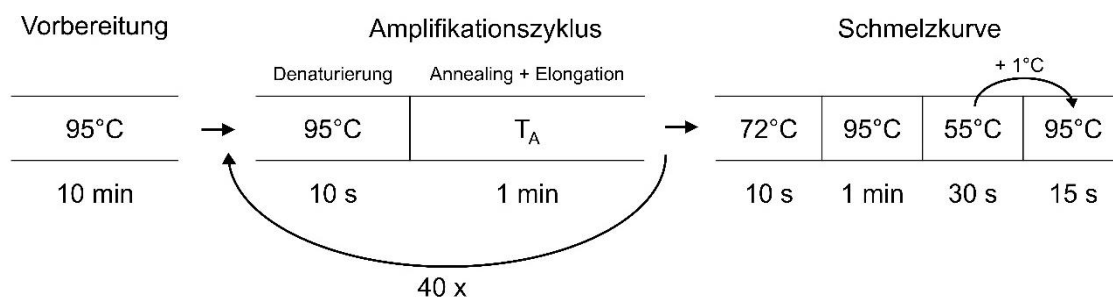


Abbildung 8: Ablauf einer qRT-PCR mit Temperatur- und Zeitprofil

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte im StepOnePlus® Real-Time PCR System. Nach der Aufheizung auf 95°C folgte der Übergang in den Amplifikationszyklus. Bei 95°C wurde die cDNA für 10 min denaturiert. Die Annealing-Temperatur (T_A) wurde Primer-spezifisch gewählt und für 1 min gehalten, auch die Elongation erfolgte bei dieser Temperatur. Dieser Zyklus wurde 40-mal wiederholt und das Fluoreszenzsignal gemessen. Zum Schluss wurde die Schmelzkurve ermittelt. Nach der Aufheizung auf 72°C bis 95°C und Abkühlung auf 55°C wurde die Temperatur in 1°C-Schritten auf 95°C erhöht und währenddessen das Fluoreszenzsignal detektiert. Eigene Abbildung.

1.2.3.8. Design der Primer-Paare

Einige der eingesetzten Primersequenzen wurden selbst entworfen. Die Basis bildeten die mRNA-Sequenzen für die gesuchten Targets, die das NCBI (National Center for Biotechnology Information) auch für Goldhamster zur Verfügung stellt¹⁴⁷. Die mRNA-Sequenz wurde in das Online *Translate Tool ExPASy*¹⁸³ übertragen, das die mRNA-Sequenzen in Aminosäure-Abfolgen übersetzen kann. Dort wurden das richtige Leseraster sowie Start- und Stopcodon ermittelt. Weil die mRNA nach dem Spleißen im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns mehr enthält, sollten die Primer oder das amplifizierte Produkt Intron-überspannend sein. Selbst wenn die Proben neben cDNA auch genomische DNA enthalten, können die Primer so nur an cDNA binden. Mit Hilfe der NCBI-Datenbank wurden die Intron-Exon-Grenzen in der mRNA-Sequenz ermittelt¹⁴⁷. Anschließend erfolgte die Auswahl eines Primer-Paars (sense und

antisense) zwischen Start- und Stopcodon. Die Länge der Primer betrug 18 – 25 Nukleotide und die Länge des Produkts 160 +/- 20 Nukleotide. Der CG-Gehalt der Primer (C: Cytosin, G: Guanin) lag bei 35 – 60%. Weil eine optimale Primer-Hybridisierung für den komplikationslosen Ablauf der PCR unabdingbar ist, wurde ein CG-Gehalt der ersten sechs Basen des 3'-Endes von 50% angestrebt. Reihungen derselben Base (z.B. CCCCC) wurden vermieden. Um eine Schmelztemperatur von etwa 60°C zu erreichen, wurden die Primersequenzen ggf. um einzelne Nukleotide verlängert oder verkürzt. Ermittelt wurde die Temperatur mit Hilfe des Online Tools *Oligo Calc*¹⁰⁴. Vor Bestellung der Primer bei der Firma Microsynth wurde die Basenfolge des antisensen Primer rückwärts und komplementär übersetzt¹⁰⁴.

1.2.3.9. Bestimmung des Referenzgens

Als Referenzgene werden Housekeeping-Gene verwendet, die nicht reguliert und unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert werden, weil sie für das Überleben der Zellen notwendig sind¹⁹⁶. Oft werden gängige Housekeeping-Gene wie *ACTB* (β -Actin) oder *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) als Referenzgene verwendet, ohne diese vorher zu validieren⁸⁹. Die Expression vieler dieser Housekeeping-Gene ist jedoch nicht für jede Spezies, jeden Zelltyp und unter allen Versuchsbedingungen stabil^{54,76,172}. Werden Referenzgene durch die Versuchsbedingungen beeinflusst, kann dies zu verfälschten Ergebnissen und Interpretationen dieser führen^{18,80}. Daten zur Stabilität von Housekeeping-Genen in hepatischem Gewebe gesunder Goldhamster sind in der Literatur zu finden. Miao, Wang et al. bewerteten *Hprt1* (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1), *Actb* (β -Actin), *Tubb* (β -Tubulin) und *Rps18* (40S ribosomales Protein S18) als am stabilsten¹³⁴. In einer Untersuchung humaner Leberproben bei Hepatitis-C-Infektion zeigten sich *Gusb* (β -Glucuronidase) und *Srsf4* (Serin-/Arginin-reicher Splicing Faktor 4) als geeignet⁴⁵. Selbst in stark entzündetem und fibrosiertem Gewebe blieb deren Expression stabil⁴⁵. Auf Basis dieser Daten wurden die sechs oben genannten Housekeeping-Gene für die vorliegende Arbeit getestet. Für jedes Gen wurden qRT-PCR durchgeführt und die C_T -Werte aller Proben (bisex n = 22, monosex n = 10 und nicht infiziert n = 6) auf Gruppenunterschiede untersucht. Darüber hinaus wurde das webbasierte Programm RefFinder^{216,215} verwendet, um die Abweichung der Genexpression im gesamten Probenkollektiv (n = 38) zu bestimmen und zu vergleichen. RefFinder kombiniert die Algorithmen der Berechnungsprogramme BestKeeper¹⁵⁵, NormFinder¹⁰, Genorm²⁰¹, und der Delta- C_T -Methode¹⁸⁶. Über jeden Algorithmus wird die Expressionsstabilität der Gene auf andere Weise berechnet²¹⁴. Für alle diese Programme werden die getesteten Gene anschließend nach ihrer Stabilität geordnet und Rängen zugewiesen (1: am stabilsten; 6: am wenigsten stabil)²¹⁴. Aus den

vier zugewiesenen Rängen für jedes Gen errechnet RefFinder anschließend das geometrische Mittel, woraus die Gesamtwertung und -gewichtung abgeleitet wird ²¹⁴.

Für die Bestimmung des Referenzgens für die *in vitro* Analysen mit HepG2-Zellen wurden die Zellen für 3 h, 6 h und 24 h mit SEA stimuliert (s. 1.2.6.2). Anschließend erfolgte die Ermittlung der Stabilität der Genexpression von *ACTB*, *GAPDH*, *RPS18*, *TUBB*, *GUSB* und *SRSF4* mit Hilfe von RefFinder und einem Gruppenvergleich (SEA-Gruppe vs. Kontrollgruppe).

1.2.4. Histologische Methoden

1.2.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) eignet sich gut als Übersichtsfärbung und setzt sich aus Kern- und Plasmafärbung zusammen. Sie wurde 1867 erstmals von Wissozky beschrieben ²⁰⁹. Für die Färbung wurden Gewebeschnitte fixiert und in Paraffin eingebettet. Da bei der HE-Färbung hydrophile Farbstoffe verwendet werden, wurden die Schnitte schrittweise in Xylol entparaffiniert (10 min, 10 min, 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2x 5 min Ethanol absolut, 5 min 96% Ethanol, 2 min 70% Ethanol, 5 min fließendes Leitungswasser). Anschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne in Hämatoxylin für 6 Minuten. Hämatoxylin selbst ist farblos. Erst bei der Komplexbildung seines Oxidationsprodukts Hämatein mit Aluminiumionen (Al^{3+}) entstehen sogenannte Hämalaune. Im sauren Milieu des Farbstoffs färben die basischen Hämalaune die negativ geladenen Bestandteile des Zellkerns zunächst rötlich-braun. Bei der Bläuung in Leitungswasser (5 min) wird der pH-Wert angehoben und die Färbung schlägt in blau um. Die Färbung des Zellplasmas in Eosin erfolgte für 12 Sekunden und wurde in Leitungswasser abgestoppt. Das verwendete Eosin Y (*yellowish*) ist negativ geladen und bildet Ionenbindungen mit den positiv geladenen Plasmaproteinen aus. Neben dem Zytoplasma werden auch Bindegewebe, Kollagenfasern und sogar Kernbestandteile in unterschiedlicher Intensität rot angefärbt. Deshalb erscheint der Zellkern nach der HE-Färbung blau-violett. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert (2 min in 96% Ethanol, 2x 2 min Isopropanol), in Xylol paraffiniert (3x 2 min) und mit Pertex-Eindeckmittel und Deckgläschen eingedeckt. ¹¹³

1.2.4.2. Mikroskopische Aufnahme der gefärbten Schnitte

Um eine hochaufgelöste mikroskopische Übersichtsaufnahme der gefärbten Leberlappen zu erhalten, wurde das Kamerasystem NanoZoomer (Fa. Hamamatsu Photonics)

verwendet. Die Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. Kernt Köhler (Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen) angefertigt.

1.2.5. Glykogenbestimmung in Leberproben

Die quantitative Bestimmung des Glykogengehalts der Leberproben erfolgte mit dem Glukose Assay Kit von Sigma-Aldrich, leicht modifiziert nach Protokoll des Herstellers¹⁸⁵. Um den Glykogengehalt bestimmen zu können, wurde zunächst das enthaltene Glykogen durch Salzsäure in Glukose gespalten und ein zusätzlicher Glykogen-Standard angesetzt und mitgeführt⁶⁹.

1.2.5.1. Proben- und Reagenzienpräparation

Für jedes Versuchstier wurde gefrorenes Leberpulver in schockgefrostete Reaktionsgefäße überführt. Dazu wurden Reaktionsgefäße und Spatel in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend etwa 20 mg Gewebepulver abgewogen und bis zum Versuchsbeginn auf Trockeneis gelagert. Bei Raumtemperatur wurde schließlich 0,5 ml 2M HCl hinzugegeben.

1.2.5.2. Präparation des Glykogen-Standards

Um die Glykogenkonzentration der Proben quantitativ auswerten zu können, wurde ein Glykogen-Standard hergestellt. Dazu wurden 2 mg Glykogen in 0,5 ml 2M HCl gelöst und weiter mit 2M HCl verdünnt, sodass eine Standardreihe mit 90, 45, 22,5, 11,3 und 5,6 µg Glykogen pro ml entstand. Als Kontrolle diente reine 2M HCl.

1.2.5.3. Assay

Abbildung 9 zeigt die zugrundeliegenden Reaktionen des Glykogen-Assays. Die Proben, Glykogen-Standards und -Kontrolle wurden bei 95°C für 1 Stunde auf einem Heizblock aufgekocht und bei ca. 300 rpm geschüttelt. Hierbei kam es im Beisein der Salzsäure zur hydrolytischen Spaltung der glykosidischen Bindungen des Glykogens. Es entstanden Glukose-Moleküle. Um die Reaktion abzustoppen, erfolgte eine Abkühlung auf Raumtemperatur für 15 Minuten und anschließend die Neutralisierung der Hydrolyseprodukte durch Zugabe von 0,5 ml 2M NaOH. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 10 Minuten zentrifugiert. In frischen Reaktionsgefäßen wurde zum Überstand der Proben Glukose-Assay-Reagenz aus dem Kit hinzugegeben: Die Proben der nicht infizierten und monosex infizierten Gruppe wurden 1:40 verdünnt (6 µl Probe mit 240 µl Assay Reagenz), die bisex infizierte Gruppe 1:10 (24 µl Probe mit 240 µl Assay Reagenz) und der Glykogen-Standard 1:6 (40 µl Standard/Kontrolle mit 240 µl Assay Reagenz). Das Glukose-Assay-Reagenz enthält die Enzyme Hexokinase (HK) und G6PD. Die Glukose der Proben wurde durch ATP und HK zu Glukose-6-Phosphat

phosphoryliert, das dann durch die G6PD zu 6-Phosphoglukonat oxidiert wurde. Gleichzeitig wurde bei dieser Reaktion NAD zu NADH reduziert. Das bei der Reaktionskette entstandene NADH ist proportional zum initial umgesetzten Glykogen. Nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden jeweils 100 µl der Ansätze als Doppelwerte auf eine 96-Well-Platte (UV-Star) pipettiert. Mit dem Plattenspektrophotometer Infinite® 200 PRO (Fa. Tecan) wurde die Absorption von NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Durch den proportionalen Zusammenhang der NADH- und Glykogenkonzentrationen konnte aus den Absorptionswerten der mitgeführten Standards mit bekannter Glykogenkonzentration eine Trendlinie erstellt und auf die Glykogenmengen der Proben geschlossen werden.

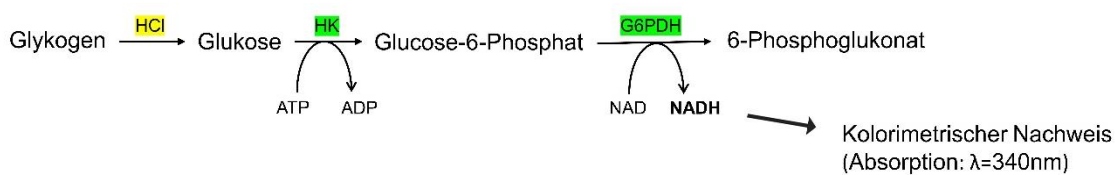


Abbildung 9: Prinzip des Glykogen-Assays

Glykogen wird durch Hydrolyse der glykosidischen Bindungen durch HCl zu Glukose gespalten. Das Enzym Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung der Glukose zu Glucose-6-Phosphat unter Verbrauch von ATP. Glucose-6-Phosphat wird durch die G6PD zu 6-Phosphoglukonat oxidiert. Dabei wird NAD reduziert und NADH entsteht. NADH kann kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm quantifiziert werden. Die Entstehung von NADH ist dabei proportional zur initialen Umsetzung des Glykogens.

HCl, Salzsäure; HK, Hexokinase; ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; G6PD, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; NAD, Nikotinamid-Adenindinukleotid; NADH, Nikotinamid-Adenindinukleotid-Hydrid. Eigene Abbildung.

1.2.6. Zellkultur mit HepG2-Zellen

Die verwendeten HepG2-Zellen sind Hepatomzellen, die ursprünglich aus einem gut differenzierten HCC eines jungen Mannes kaukasischer Abstammung isoliert wurden und die sehr häufig in *in vitro* Experimenten verwendet werden^{4,57}. Durch ihre hohe Proliferationsrate, ihre nahezu unbegrenzte Lebenszeit und ihren Hepatozyten-spezifischen Stoffwechsel eignen sie sich gut als hepatisches Zellmodell⁵⁷. HepG2-Zellen sind in der Lage, Enzyme zu exprimieren, u.a. das in dieser Arbeit untersuchte Enzym Katalase¹⁹⁹.

1.2.6.1. Zellkultivierung

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden sie im Wasserbad auf 37°C erwärmt und in einer Zellkulturschale (58 cm² Wachstumsfläche) in 10 ml Medium bei 37°C kultiviert. Als Medium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet, dem 10% filtriertes bovines Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (100 µM) zugesetzt wurden. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. DMEM enthält u.a. Glukose, Natriumpyruvat und Glutamin für den

Zellstoffwechsel. In bovinem Serum sind Wachstumsfaktoren, Hormone, Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Aminosäuren und Vitamine enthalten, die für die Proliferation und Kultivierung der Zellen benötigt werden.

Um den Zellen bei der Kultivierung ausreichend Wachstumsfläche zu gewähren, erfolgte zwei- bis dreimal wöchentlich eine Passage in eine neue Schale. Nach dem Absaugen des Medium-Überstands wurden die Zellen dreimal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA enzymatisch vom Schalenboden gelöst (Inkubation für 5 min bei 37°C). Die enzymatische Reaktion wurde mit 9 ml Medium abgestoppt und der Erfolg der Resuspension lichtmikroskopisch überprüft. In der Zwischenzeit wurde eine neue Zellkulturschale mit 5 ml Kollagen I (mit Essigsäure auf 50 µg/ml verdünnt) benetzt, das Kollagen abgesaugt und 10 ml serumhaltiges DMEM hinzugefügt. Nach Auf- und Abpipettieren wurde 1 ml der gewonnenen Zellsuspension in die neue Schale überführt.

1.2.6.2. Aussaat und Stimulation der Zellen mit SEA

Zur Aussaat der Zellen auf eine 12-Well-Platte wurden die Zellen zunächst gewaschen und trypsinisiert, wie bereits beschrieben (s. 1.2.6.1). Nach der Trypsinierung erfolgte die Aufnahme und Resuspension der Zellen in 3 ml Medium. In einem sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 9 ml Medium vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension hinzugegeben. Jedes Well wurde mit Kollagen beschichtet und mit 1,5 ml der Zellsuspension befüllt. Durchschnittlich ergab dies etwa 500.000 Zellen / Well. Die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Facsope®-Zellzählers (Fa. Curiosis Inc.). Nach Inkubation der Platte bei 37°C für 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und das serumhaltige DMEM gegen 1,5 ml DMEM ohne Serum ausgetauscht.

Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubation im Brutschrank, erfolgte die Stimulation der Zellen mit SEA. Unter dem Lichtmikroskop wurde zunächst ein gleichmäßig konfluentes Zellwachstum sichergestellt und eine mögliche Kontamination ausgeschlossen. In jedes Well wurden im Zuge des Mediumwechsels 0,5 ml serumfreies Medium vorgelegt und anschließend 2,8 µl SEA (2,655 mg/ml) hinzu pipettiert. Daraus ergab sich eine SEA-Konzentration von 15 µg/ml. Da das SEA in der Stammlösung in PBS gelöst vorlag, wurden als Kontrolle 2,8 µl PBS ohne SEA eingesetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 6 Stunden wurde der Stimulationsversuch mit steriler PBS abgestoppt (s. 1.2.3.2).

1.2.7. Statistische Methoden

Für die Auswertung der qRT-PCR wurden die gemessenen Daten mit der StepOne®-Software (Version 2.2.2, 2011) erfasst und in MS Excel® importiert. In MS Excel® wurden aus den gemessenen C_T-Doppelwerten der Proben Mittelwerte gebildet. Die C_T-

Einzelwerte wurden zuvor mit der Statistiksoftware SPSS (Version 26.0, 2019) auf mögliche Ausreißer untersucht (Werte außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands). Unterschieden sich die Doppelwerte um mehr als 2 C_T -Werte und war einer der beiden Einzelwerte ein Extremwert, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Einzelwert um eine Fehlmessung handelt. Dieser Wert wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Falls anhand der Schmelzkurve erkennbar war, dass bei der PCR ein falsches Produkt entstanden war, ging das Messergebnis ebenfalls nicht in die Wertung ein. Die Normierung auf die Kontrollgruppe und das Kontrollgen erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (s. 1.2.3.7.1) in MS Excel®.

Die Daten zur Auswertung des Glykogen-Assays wurden nach Erfassung durch das Plattenspektrophotometer Infinite 200 PRO (Fa. Tecan) mit MS Excel® dargestellt. Aus den Messwerten der Standards bekannter Glykogenkonzentrationen wurde eine Trendlinie erstellt. Mit Hilfe der Geradengleichung konnte die Glykogenkonzentration der Proben berechnet werden. Diese wurde in mg pro g Lebergewebe umgerechnet.

Alle Daten wurden zur statistischen Auswertung in die SPSS®-Software übertragen.

Um Gruppenunterschiede zwischen der bisex, monosex und nicht infizierten Hamsterkohorte zu ermitteln, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test herangezogen, da auf Basis bisheriger Erfahrung unserer Arbeitsgruppe nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte. Mit der Nullhypothese H_0 wird angenommen, dass die Verteilung der Messwerte zwischen den verschiedenen Gruppen identisch sei. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ für die Ablehnung von H_0 wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen paarweise mit Hilfe eines Anschluss-tests (Post-hoc Dunn-Bonferroni-Test) untersucht. Auch hier behauptet H_0 eine Gleichverteilung der Werte zwischen jeweils zwei Gruppen. Um dabei eine Akkumulierung des α -Fehlers zu vermeiden, wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Da es sich um eine explorative Studie handelt, wurde auf eine weitere Adjustierung der p-Werte verzichtet. Bei der Auswertung der Zellkulturexperimente wurde die SEA-stimulierte Gruppe und die Kontrollgruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen ($p \leq 0,05$).

Der statistische Zusammenhang verschiedener Messparameter wurde mit Regressionsanalysen untersucht. Dazu wurden die Messgrößen je nach Sinnhaftigkeit in abhängige und unabhängige Parameter unterteilt. Um die Abhängigkeit der Parameter mit möglichst geringer Abweichung mathematisch zu beschreiben, wurde mit Hilfe der Funktion *Kurvenanpassung* von SPSS® die beste Regressionsfunktion (linear, invers oder exponentiell) ermittelt. Als Kriterium wurde das Maximum des Bestimmtheitsmaßes

R^2 herangezogen. Dieses gibt an, wie viel Streuung in den Daten durch den funktionellen Zusammenhang erklärt werden kann.

Die statistischen Abbildungen wurden mit der Software Python (Version 3.9.15, 2022) erstellt. Zum Vergleich der Gruppen wurden die Daten in Form von Whisker-Box-Plot-Diagrammen dargestellt. Die Box wird durch das untere und obere Quartil begrenzt und bildet 50% der Daten ab, der Median wurde als Linie in der Box veranschaulicht. Oberer und unterer Whisker repräsentieren die größten und kleinsten Messwerte. Messwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands liegen, wurden als Extremwerte in Form einer Raute abgebildet. Die einzelnen Messwerte sind als graue, teiltransparente Kreise eingezeichnet.

1.3. Ergebnisse

Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden zur besseren Unterscheidung der untersuchten Gruppen einheitliche Farben gewählt. Werden bisex, monosex und nicht infizierte Gruppen einander gegenübergestellt, ist im Folgenden die nicht infizierte Gruppe in Grün, die monosex infizierte in Gelb und die bisex infizierte Gruppe in Rot dargestellt. Die Datenpunkte der Regressionsanalysen sind ebenfalls rot gefärbt, da sie sich auf die bisex infizierte Gruppe beschränken. Wird ein Parameter zunächst zwischen den Gruppen verglichen und anschließend in einem Diagramm gegen die Eilast aufgetragen, wurde für einen einfacheren Vergleich der Werte bei den Ordinaten die gleiche Skalierung der Werte gewählt, wo es sinnvoll war.

Zur statistischen Untersuchung der Zusammenhänge zweier Parameter wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Während Korrelationsanalysen lediglich einen ungerichteten Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreiben, wird im Rahmen von Regressionsanalysen darüber hinaus untersucht, ob ein gerichteter Zusammenhang zwischen Variablen besteht, d.h. ob die abhängige Variable mithilfe einer mathematischen Funktion durch die unabhängige Variable (hier meist die Eilast) statistisch vorhergesagt werden kann.

1.3.1. Etablierung und Validierung der Methoden

1.3.1.1. Bestimmung der hepatischen Eilast

1.3.1.1.1. Spektrum der Eilast in Hamsterlebern

Um die Auswirkungen der parasitären Eier auf das Leberparenchym *in vivo* zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen der hepatischen Eilast und der Ausprägung Schädigungs-assoziiierter Parameter analysiert. Ermittelt wurde die Eilast von 22 bisex infizierten Hamstern nach KOH-Verdau des Gewebes. Durch die sehr umfangreiche Gruppengröße wurde sichergestellt, dass sowohl Hamster mit wenig *S. mansoni*-Eiern, als auch Hamster mit vielen Eiern in das Hamsterkollektiv eingeschlossen wurden. Abbildung 10 zeigt die Eilast für jedes der 22 Tiere der bisex infizierten Gruppe. Die Proben sind nach der Ei-Anzahl pro Milligramm Lebergewebe aufsteigend geordnet. Die Eilast der Tiere weist ein breites Spektrum von 12 bis 85 Eier/mg Lebergewebe auf. Die dazwischenliegenden Werte sind nahezu linear verteilt.

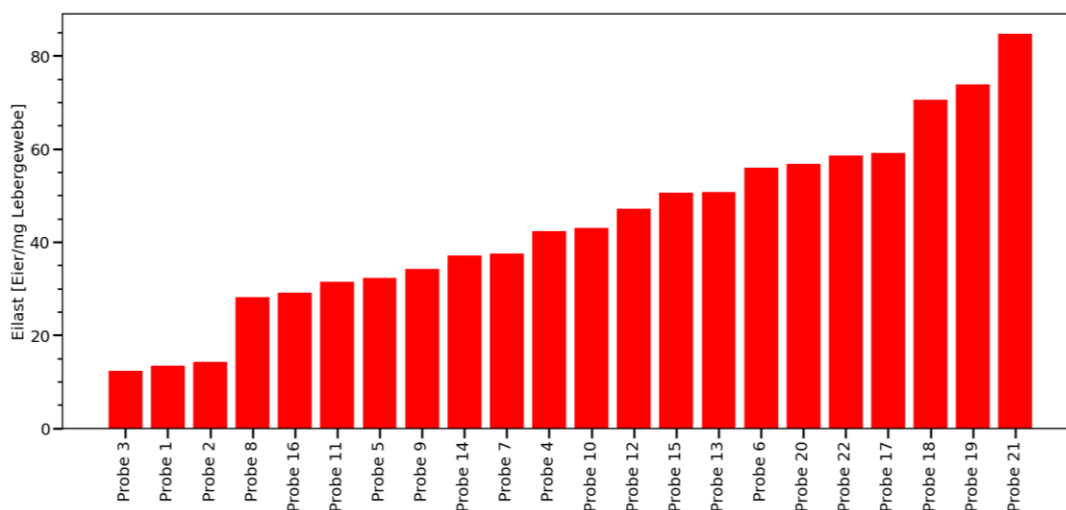


Abbildung 10: Spektrum der hepatischen Eilast der bisex infizierten Hamsterkohorte

Es zeigt sich eine breite gleichmäßige Verteilung der hepatischen Eilast zwischen 12 und 85 Eier/mg Lebergewebe. Abgewogene Leberproben der Hamster (n=22) wurden mit KOH verdaut und die isolierten Eier dreimal mikroskopisch ausgezählt. Der Mittelwert aus den Zählungen der Eilast wird in Eier/mg Lebergewebe angegeben. Die Tiere wurden entsprechend ihrer Eilast aufsteigend geordnet.

1.3.1.1.2. Verteilung der Eier im Leberlappen

Für die Bestimmung der hepatischen Eilast wurden die analysierten Leberteile zufällig ausgewählt. Um zu überprüfen, ob die Verteilung der Parasiteneier im Parenchym eines Leberlappens gleichmäßig ist, wurden HE-Färbungen angefertigt. In Abbildung 11 ist eine HE-Färbung eines repräsentativen Schnitts zu sehen. In der Übersichtsaufnahme (Abbildung 11A) ist ein vollständiger Leberlappen abgebildet, die parasitären Eier sind rot markiert. Es fällt auf, dass die Verteilung der Eier relativ gleichmäßig ist, sodass es weder große Ei-freie Bereiche gibt, noch große Ei-Nester auftreten. Bei näherer Betrachtung (Abbildung 11B) lassen sich die Eier und die gebildeten Granulome von intaktem Leberparenchym abgrenzen.

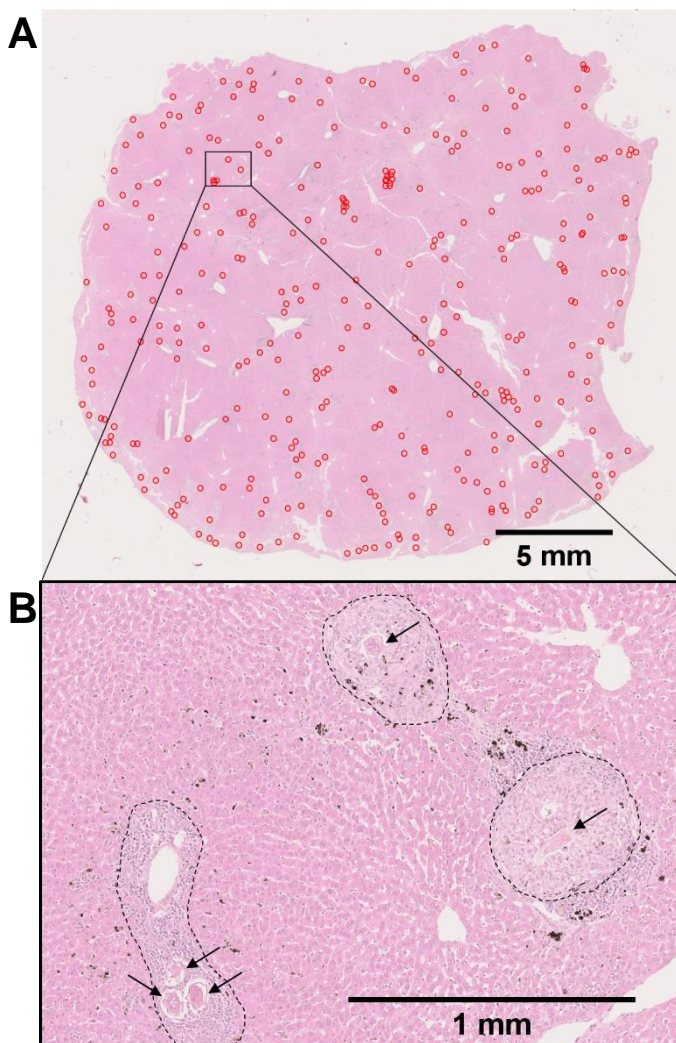


Abbildung 11: Gleichmäßige Verteilung der Eier innerhalb eines Leberlappens

Die Leberlappen bisex infizierter Hamster wurden im Gesamtquerschnitt HE gefärbt. (A) Übersicht über einen Leberlappen im Querschnitt mit parasitären Eiern (rote Kreise). (B) Vergrößerung mit Eiern (→) und Granulomen (---).

1.3.1.1.3. Regression zwischen Eilast und ESP-Komponenten

Die parasitären Eier sezernieren verschiedene ESP in das umliegende Gewebe. Das Glykoprotein IPSE/ α 1 ist ein Hauptbestandteil der ESP. Ist die Eilast des Gewebes hoch, ist eine erhöhte IPSE/ α 1-Sekretion zu erwarten. Um zu überprüfen, ob die Bestimmung der Eilast mittels KOH-Verdau die Realität abbildet, wurde ein Zusammenhang zwischen der Eilast und der *Ipse/ α 1*-Expression untersucht. Die Quantifizierung der *Ipse/ α 1*-Expression der bisex infizierten Gruppe (n = 22) erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR. Da beide Kontrollgruppen erwartungsgemäß keine *Ipse/ α 1*-Expression aufweisen, erfolgte die Normierung auf die Werte mitgeführter Ei-Lysate. Die Regressionsanalyse zeigt eine positiv-exponentielle Abhängigkeit zwischen der *Ipse/ α 1*-Expression von der Eilast (Abbildung 12, $R^2 = 0,862$).

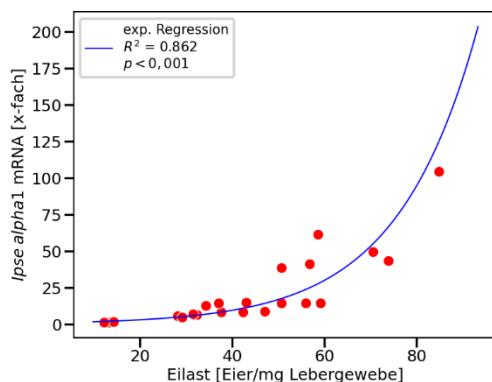


Abbildung 12: Exponentielle Regression der Eilast und *Ipse/ α 1*

Die Expression der SEA-Komponente *Ipse/ α 1* der bisex infizierten Gruppe (n = 22) wurde mittels qRT-PCR analysiert und mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ausgewertet. Es wurden 3 technische Replikate durchgeführt. Als Referenzgruppe dienten verdünnte Ei-Lysate. Der Zusammenhang zwischen hepatischer Eilast und *Ipse/ α 1* wird mit Hilfe einer exponentiellen Regressionskurve dargestellt ($R^2 = 0,862$, $p < 0,001$). Dabei ist die Eilast die unabhängige und *Ipse/ α 1* die abhängige Größe. Die Eilast wird in Eier/mg Lebergewebe und *Ipse/ α 1* als Vielfaches der Expression der Ei-Lysate angegeben.

1.3.1.2. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (Lebergewebe)

Die Auswahl eines stabilen und unregulierten Referenzgens ist die Voraussetzung für eine valide quantitative Auswertung der qRT-PCR-Messungen. Nur so kann eine korrekte Normierung mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode erfolgen. Folgende Housekeeping-Gene wurden als potenzielle Referenzgene getestet: *Srsf4*, *Hprt1*, *Rps18*, *Actb*, *Gusb* und *Tubb*. Die Expression der Zielgene wurde mit qRT-PCR in allen drei Gruppen gemessen (bisex, monosex und nicht infiziert).

1.3.1.2.1. *Srsf4* als Referenzen

Um gruppenunabhängig die Stabilität der Gene zu testen, wurden die C_T -Werte für jedes Gen in das webbasierte Programm RefFinder^{215,216} eingepflegt. Es erfolgte keine Trennung der Daten nach Gruppen (n = 38). Basierend auf der Kombination mehrerer Algorithmen werden dort die Gene nach der Stabilität ihrer Expression geordnet. Hierbei weist *Srsf4* die stabilste Expression auf (Abbildung 13A). Beim Vergleich der *Srsf4*-Expression der drei Gruppen mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests kann die Hypothese, dass die Expressionswerte über die Gruppen gleichverteilt sind, nicht mit ausreichender Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden (Abbildung 13B; $p = 0,163$). Auch Regressionsanalysen zwischen Eilast und *Srsf4*-Expression innerhalb der bisex infizierten Gruppe zeigen keinen Zusammenhang der beiden Parameter (Abbildung 25, Anhang).

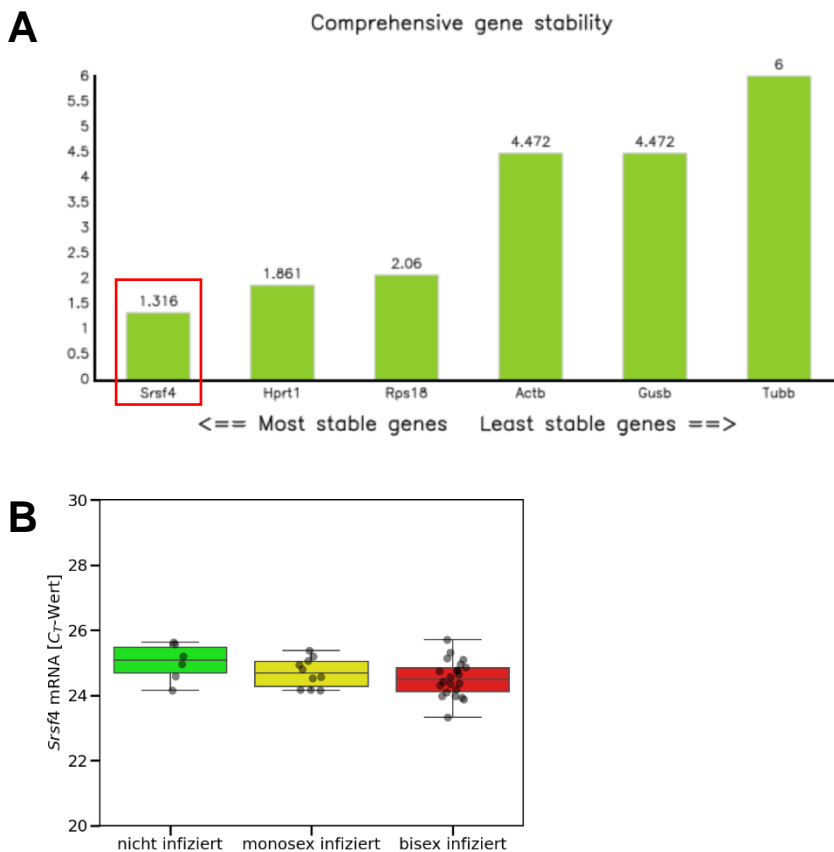


Abbildung 13: Geeignetes Referenzen *Srsf4*

(A) *Srsf4* (roter Rahmen) zeigt bei der Analyse durch RefFinder²¹⁶ die stabilste Expression (n = 38). (B) Die *Srsf4*-Expression weist keine Gruppenunterschiede der C_T -Werte mit Kruskal-Wallis-Test zwischen bisex (n = 22), monosex (n = 10) und nicht infizierten (n = 6) Hamsterlebern auf ($p=0,163$). Die C_T -Werte liegen alle zwischen 23,33 und 25,70.

1.3.1.2.2. Ungeeignete Referenzgene

Die übrigen getesteten Gene zeigen sich weniger gut geeignet als Referenzgene. Beispielsweise gibt RefFinder die Expression von *Hprt1* als zweitstabilste an (Abbildung 13A), jedoch zeigt die Überprüfung auf Gleichverteilung der Werte über die Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test, dass keine Gleichverteilung vorliegt (Abbildung 14A; $p < 0,001$). Dabei sind vor allem Unterschiede in der Verteilung der Werte zwischen bisex und monosex, sowie bisex und nicht infizierten Tieren festzustellen. Umgekehrt sind bei der *Gusb*-Expression zwar keine markanten Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen zu sehen (Abbildung 14B; $p = 0,059$), dafür scheint aber die Expression zwischen den einzelnen Proben des gesamten Hamster-Kollektivs deutlich stärker zu streuen als die von *Srsf4* und *Hprt1* (Abbildung 13A). Die statistische Testung auf Unterschiede in der Expression von *Rps18*, *Actb* und *Tubb* macht Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich (Abbildung 26, Anhang).

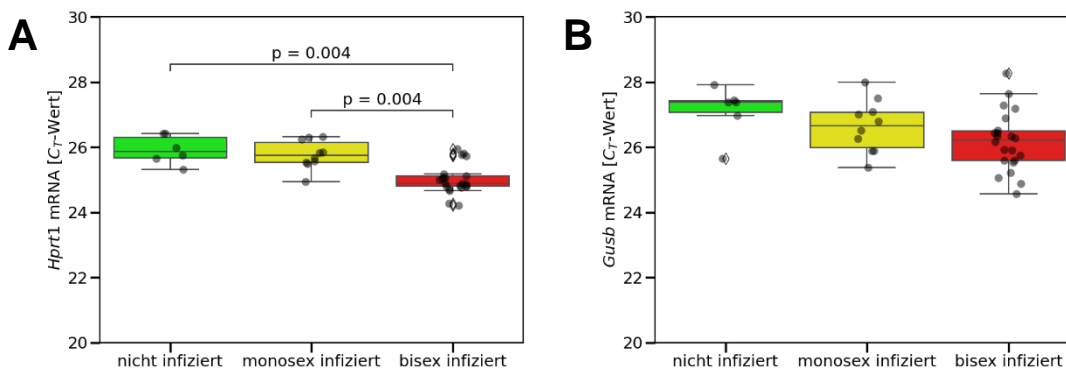


Abbildung 14: Ungeeignete Referenzgene *Hprt1* und *Gusb*

(A) Die hepatische *Hprt1*-Expression weist sowohl Gruppenunterschiede über allen Gruppen im Kruskal-Wallis-Test auf ($p < 0,001$), als auch zwischen bisex und monosex, sowie monosex und nicht infizierten Hamstern. (B) Die *Gusb*-Expression zeigt keine statistisch-relevanten Gruppenunterschiede (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,059$).

1.3.1.2.3. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (HepG2-Zellen)

Als Basis für die Quantifizierung der mRNA-Expression der HepG2-Zellen *in vitro* wurden die Gene *ACTB*, *GAPDH*, *TUBB*, *RPS18*, *GUSB* und *SRSF4* getestet. Auch hier erwies sich *SRSF4* als das am besten geeignete Referenzgen (Abbildung 27, Anhang).

1.3.2. *S. mansoni*-induzierte Leberschädigung und hepatische Eilast

Im folgenden Abschnitt wird die Abhängigkeit der hepatischen Immunantwort, des Metabolismus und des oxidativen Stresses von der Eibelastung der Leber dargestellt.

1.3.2.1. Immunantwort

Um die Immunantwort im Rahmen einer *S. mansoni*-Infektion zu charakterisieren, wurden im Lebergewebe der infizierten Hamster die mRNA-Spiegel verschiedener Zytokine quantifiziert.

1.3.2.1.1. Eilast-unabhängige Steigerung der T_H1-Immunantwort

Zu Beginn der Infektion mit *S. mansoni* kommt es im Wirtsorganismus i.d.R. zu einer T_H1-Antwort, die sich typischerweise durch das Auftreten des Zytokins IFN- γ auszeichnet. Deshalb wurde die *Ifng*-Expression in den drei Versuchsgruppen ermittelt.

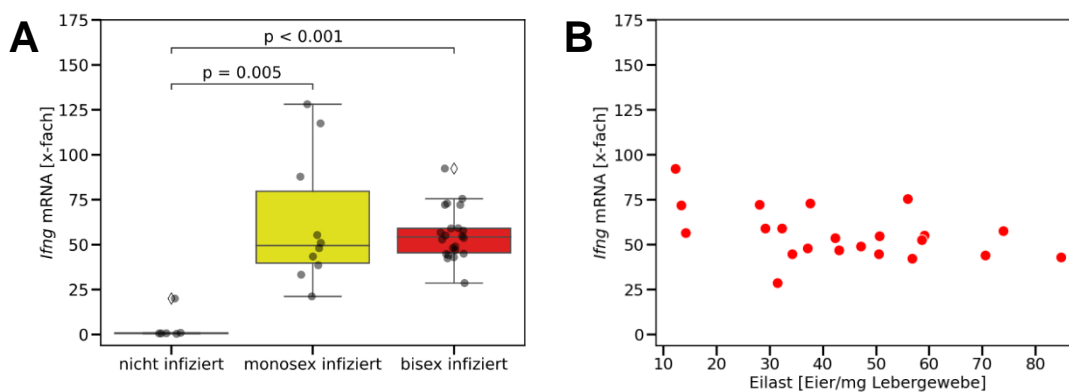


Abbildung 15: Eilast-unabhängige hepatische Expression des T_H1-Zytokins IFN- γ

(A) Gesteigerte *Ifng*-Expression in Lebern der monosex (n = 10) und bisex *S. mansoni*-infizierten Hamster (n = 22). (B) Keine Regression zwischen *Ifng*-Expression und der Eilast. Nach Durchführung der qRT-PCR erfolgte die Auswertung mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe (n = 6). Es wurden drei technische Replikate durchgeführt und deren Mittelwerte bestimmt. Die Gleichverteilung der Expressionswerte zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,001$) geprüft (A). Bei den Regressionsanalysen diente die Eilast als unabhängige und die *Ifng* mRNA als abhängige Größe. (B).

Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe ist die *Ifng*-Expression in der monosex (ms) und bisex (bs) infizierten Gruppe deutlich erhöht (Abbildung 15A). Während sich der Median beider Gruppen kaum unterscheidet (ms 49,5; bs 54,2), weisen die Werte der monosex infizierten Gruppe eine deutlich größere Streuung auf. Wird die *Ifng*-Expression der bisex infizierten Gruppe gegen die Eilast aufgetragen, kann kein Zusammenhang zwischen beiden Größen abgeleitet werden (Abbildung 15B).

1.3.2.1.2. Inverser Zusammenhang zwischen T_H2-Immunantwort und Eilast

Zum Zeitpunkt der Eiablage geht die T_H1-Immunantwort in eine T_H2-Antwort über. Die daran beteiligten Zytokine sind vor allem IL-4 und IL-13. Deren mRNA-Spiegel wurden in den Leberproben der bisex, monosex und nicht infizierten Tiere bestimmt.

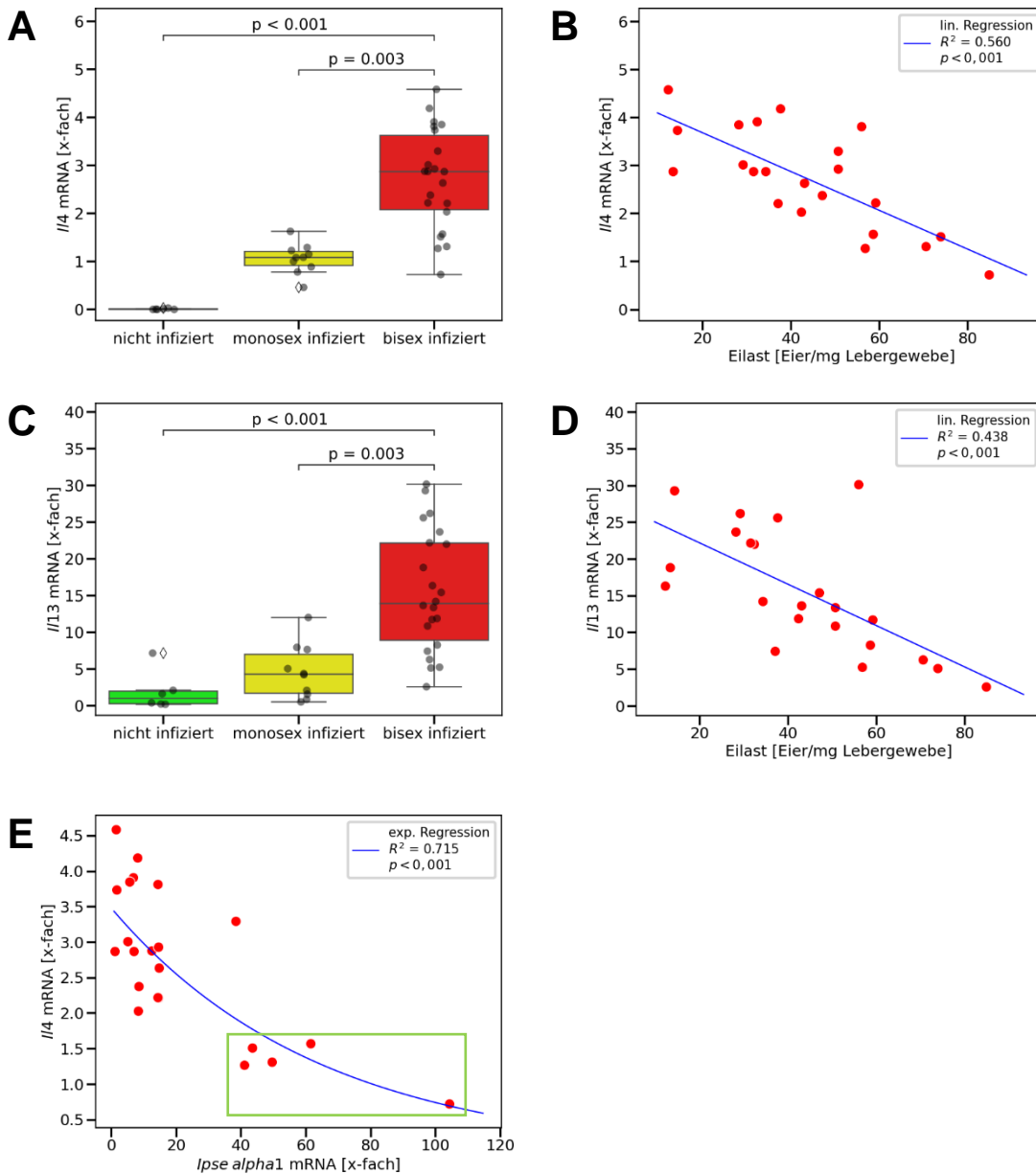


Abbildung 16: Eilast-abhängige inverse Regression der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13

(A, C) Gesteigerte mRNA-Expression von *//4* (A) und *//13* (C) bei infizierten Hamstern. (B, D) Negative Regression zwischen *//4* (B) bzw. *//13* mRNA (D) und jeweils der Eilast, sowie ein negativ exponentieller Zusammenhang zwischen *//4* und *Ipse/α1* mRNA (E). Besonders hohe *Ipse/α1*-Spiegel gehen mit niedriger *//4*-Expression einher (E; grüner Kasten). Die relative Quantifizierung wurde mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode aus qRT-PCR-Daten berechnet und auf die monosex (A, B, E), bzw. nicht infizierte Gruppe (C, D) normalisiert. Die Normalisierung von *Ipse/α1* erfolgte auf die Expression mitgeführter Ei-Lysate. Aus je drei technischen Replikaten wurden Mittelwerte gebildet. Bisex infiziert ($n = 22$), monosex infiziert ($n = 10$) und nicht infiziert ($n = 6$). Die Gleichverteilung der Expressionswerte zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test überprüft (A: $p < 0,001$; C: $p < 0,001$). Die Regression wurde durch lineare (B, D) bzw. exponentielle (E) Regressionsanalysen ermittelt.

Sowohl *Il4*, als auch *Il13*, werden in den Gruppen unterschiedlich stark exprimiert (Abbildung 16A und Abbildung 16C). In der nicht infizierten Kontrollgruppe ist die mRNA kaum nachweisbar. Eine leichte Zytokin-Expression ist in der monosex infizierten Gruppe zu messen, wohingegen die bisex infizierte Gruppe im Vergleich dazu bis zu 4,6-fach (*Il4*) bzw. 30-fach (*Il13*) erhöhte mRNA-Spiegel aufweist. Wird die Beziehung der mRNA-Spiegel zur Eilast in Regressionsanalysen untersucht, zeigt sich eine inverse lineare Abhängigkeit der Zytokin-Expression von der Eilast (Abbildung 16B und Abbildung 16D). Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt bei 0,560 (*Il4*) und 0,438 (*Il13*). Wird der Zusammenhang zwischen *Il4* und *Ipse/α1* mRNA betrachtet, fällt eine negative exponentielle Abhängigkeit auf (Abbildung 16E; $R^2 = 0,715$). Insbesondere die fünf Tiere mit sehr hohen *Ipse/α1* mRNA-Spiegeln zeigen besonders niedrige *Il4*-Spiegel (Abbildung 16E, grüner Kasten).

1.3.2.1.3. *Il10*-Expression und Eilast

Im Entzündungsgeschehen gilt das Zytokin IL-10 als wichtiger Modulator. Es kann sowohl die T_H1 - als auch die T_H2 -Antwort supprimieren und beugt einer überschießenden Immunantwort vor. Besonders im chronischen Stadium spielt IL-10 eine bedeutende Rolle. Die hepatische mRNA von bisex, monosex und nicht infizierten Hamstern wurde auf *Il10* mRNA untersucht.

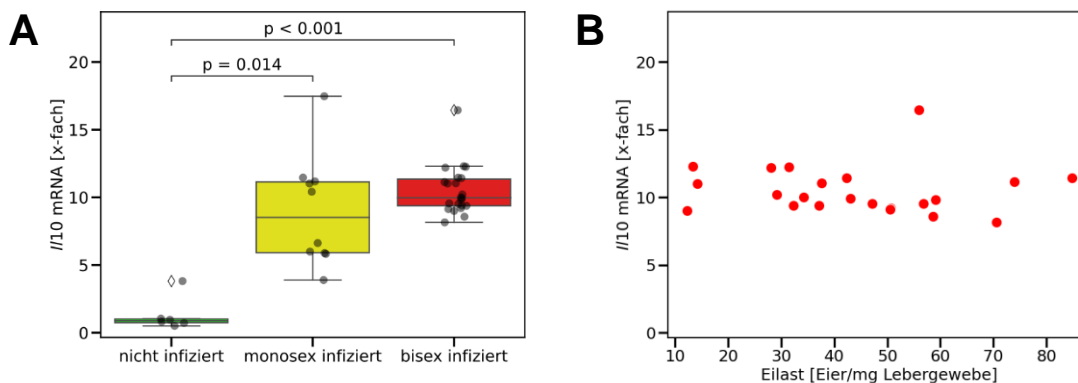


Abbildung 17: Eilast-unabhängige hepatische Expression des Zytokins IL-10

(A) Gesteigerte mRNA-Expression von *Il10* in Lebern der monosex und bisex infizierten Hamster. (B) Keine Korrelation zwischen *Il10* und der Eilast. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Normalisierung auf nicht infizierte Gruppe). Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die Gleichverteilung der Expressionswerte zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test getestet (A; $p < 0,001$). Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast als unabhängige und *Il10* als abhängige Größe (B).

Abbildung 17A zeigt die Verteilung der gemessenen *Il10* mRNA für jede Gruppe. Sowohl die Lebern monosex als auch bisex infizierter Tiere weisen im Vergleich zur Superkontrolle erhöhte Spiegel auf. Die Streuung innerhalb der monosex infizierten Gruppe ist groß, die Spannweite reicht von 3,9- bis 17,5-fachen Werten im Vergleich zur

nicht infizierten Gruppe. Die *//10*-Expression innerhalb der bisex infizierten Gruppe ist relativ konstant und beträgt im Median das 10-fache der Referenzgruppe. Eine Regressionsanalyse zeigt keinen Zusammenhang zwischen der *//10*-Expression und der Eilast (Abbildung 17B).

1.3.2.1.4. *//6*-Expression und Eilast

Auch das proinflammatorische Zytokin IL-6 wird im Verlauf einer Schistosomen-Infektion exprimiert. Es fördert die IL-10-Produktion und trägt zur Eindämmung der Entzündungsreaktion bei.

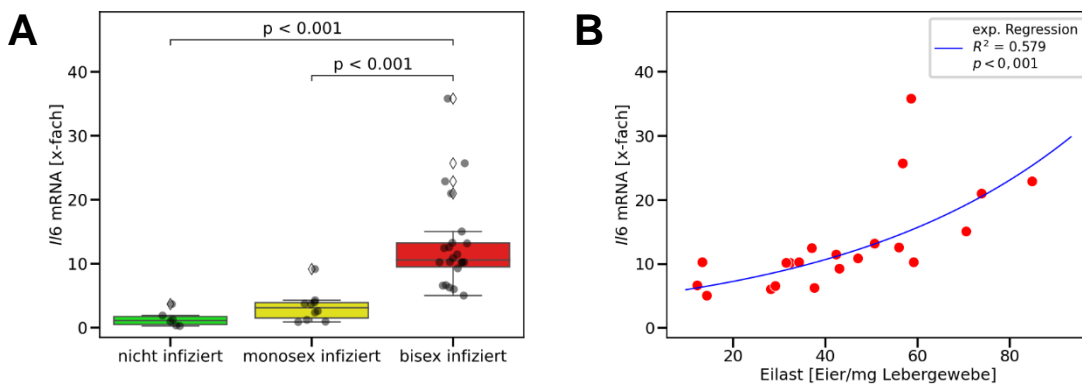


Abbildung 18: Eilast-abhängige hepatische Expression des Zytokins IL-6

(A) Gesteigerte Expression von *//6* in Lebern der bisex infizierten Hamster. (B) Positiver exponentieller Zusammenhang zwischen der *//6*-Expression und der Eilast. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Normalisierung auf nicht infizierte Gruppe). Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die Gleichverteilung der Expressionswerte zwischen den Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test getestet (A; $p < 0,001$). Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast als unabhängige und *//6* als abhängige Größe (B).

Die relative Quantifizierung der *//6* mRNA in allen drei Versuchsgruppen zeigt eine stark gesteigerte Zytokin-Expression in der bisex infizierten Gruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (Abbildung 18A). Im Verhältnis zur nicht infizierten Gruppe sind die Werte um das 5- bis 36-fache erhöht. Auch die monosex infizierten Tiere weisen 3,1-fach erhöhte *//6* mRNA-Spiegel auf (Median), wobei statistisch kein Unterschied zur nicht infizierten Kontrollgruppe besteht ($p = 1,000$). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen *//6* mRNA-Spiegel und der Eilast zu untersuchen, erfolgte eine Regressionsanalyse. Abbildung 18B zeigt die statistische Abhängigkeit der gemessenen *//6*-Expression von der Eilast. Es besteht eine exponentielle Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,579$.

1.3.2.2. Metabolischer Stress

Nicht nur die Expression der Zytokine wird durch eine *S. mansoni*-Infektion beeinflusst, auch Enzyme wichtiger Stoffwechselwege der Leber erfahren eine Regulation. In dieser Arbeit wurden deshalb die Expression des Enzyms FAS (Lipidstoffwechsel) und die Expression dreier Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels untersucht. Außerdem wurde der hepatische Glykogengehalt quantifiziert. Das Lebergewebe bisex infizierter Hamster wurde mit hepatischem Gewebe monosex und nicht infizierter Tiere verglichen.

1.3.2.2.1. Negativer Zusammenhang zwischen *Fasn*-Expression und Eilast

Die FAS ist ein dimeres multifunktionelles Enzym, das im Zytosol der Hepatozyten vorkommt. Mit seinen Domänen katalysiert es fast alle Reaktionen der FS-Synthese¹²². Damit liefert es Substrate für die Lipogenese und trägt zum Aufbau der TAG-Energiespeicher der Leber bei¹²². Es wird durch das Gen *Fasn* codiert. Die hepatische *Fasn*-Expression wurde für bisex, monosex und nicht infizierte Hamster mit Hilfe qRT-PCR-Analysen quantifiziert.

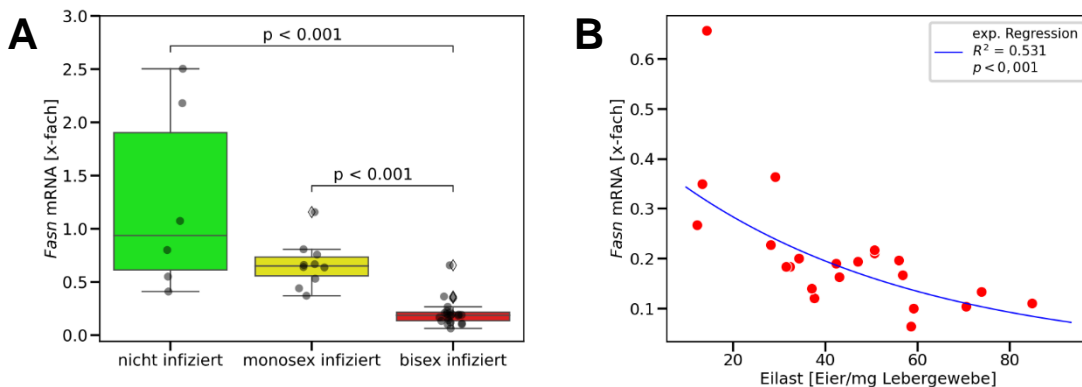


Abbildung 19: Inverse Regression zwischen hepatischer Fettsäuresynthaseexpression und Eilast

(A) Reduzierte hepatische Expression von *Fasn* in bisex infizierten Hamstern. (B) Negative exponentielle Regression zwischen *Fasn*-Expression und der Eilast. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe. Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (A; $p < 0,001$). Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast als unabhängige und *Fasn* als abhängige Größe (B).

Abbildung 19A bildet die *Fasn*-Expression der untersuchten Gruppen ab. Im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen zeigt sich die Expression in der bisex infizierten Gruppe reduziert. Während die mRNA-Spiegel in der monosex infizierten Gruppen ebenfalls leicht vermindert sind (Median 0,65-fach), erreichen sie in der bisex infizierten Gruppe im Median nur die 0,19-fache Expression der gesunden Superkontrolle. Wird der Zusammenhang zwischen *Fasn* mRNA und der Eilast untersucht (Abbildung 19B), kann

dieser durch eine negative exponentielle Regressionskurve abgebildet werden ($R^2 = 0,531$).

1.3.2.2.2. Inverser Zusammenhang zwischen Glykogengehalt und Eilast

In der Leber finden wesentliche Teile des Kohlenhydrat-Metabolismus statt. Energie wird in Form von Glykogen gespeichert und kann bei Bedarf zu Glukose abgebaut werden. Diese kann über die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg in der Leber verwertet werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer *S. mansoni*-Infektion auf den Glykogengehalt der Leber und auf die hepatische Expression der Enzyme GyS, Pyruvatkinase M 1 und 2 (PKM1/2) und G6PD in den drei Tiergruppen untersucht. GyS katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykogensynthese und die PK ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, bei der Glukose zu Pyruvat abgebaut und dabei Energie generiert wird. Die Isoformen PKM 1 und PKM 2 werden durch dasselbe Gen transkribiert, für beide wurde ein gemeinsames Primer-Paar verwendet⁷. Beim Abbau der Glukose über den Pentosephosphatweg ist die G6PD das geschwindigkeitsbestimmende Enzym.

In Abbildung 20A wird der Glykogengehalt der 22 bisex infizierten Hamster gegen deren Eilast aufgetragen. Eine Zunahme der hepatischen Eilast geht mit der Abnahme des hepatischen Glykogens einher. Dieser Zusammenhang kann mit einer inversen Regressionskurve gut beschrieben werden ($R^2 = 0,766$). Bei der Untersuchung der Expression oben genannter Enzyme in Hamsterleberproben können ebenfalls Veränderungen in der bisex infizierten Gruppe beschrieben werden. Die mRNA des Enzyms GyS ist in den untersuchten Leberproben im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe auf das 0,7-fache (Median) reduziert (Abbildung 20B). Zur monosex infizierten Gruppe zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied. Im Gegensatz dazu ist die *Pkm*-Expression der bisex infizierten Tiere deutlich gesteigert messbar und unterscheidet sich mit $p < 0,001$ statistisch von beiden Kontrollgruppen (Abbildung 20C). Die mRNA-Spiegel sind im Median etwa 8,6-fach höher als die der nicht infizierten Gruppe. Die monosex und die nicht infizierte Gruppe unterscheiden sich nur leicht. Ebenfalls gesteigert sind die mRNA-Spiegel der G6PD in der bisex infizierten Gruppe (Abbildung 20D). Unterschiede gibt es im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, wobei der Unterschied zur nicht infizierten Gruppe statistisch relevanter ist ($p < 0,001$). Der Median der bisex Gruppe ist 3,1-mal so hoch wie der Median der nicht infizierten Kontrollen.

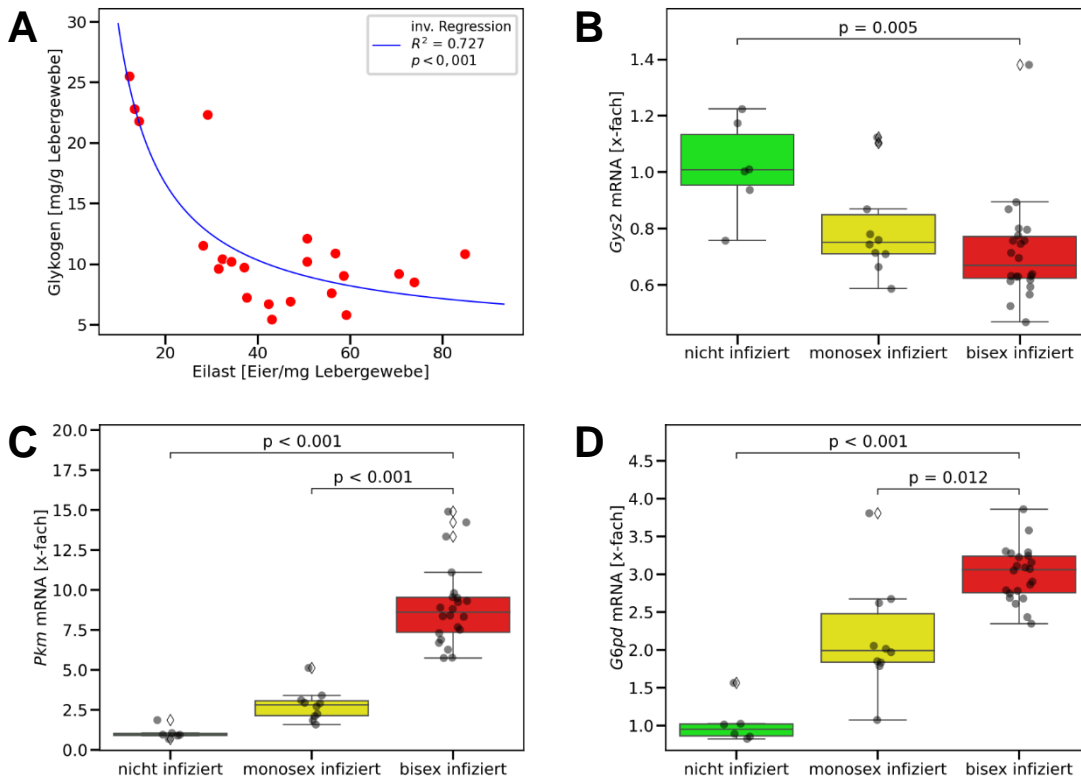


Abbildung 20: Inverse Regression zwischen hepatischem Glykogengehalt und Eilast und Expression der Enzyme Gys, PKM1/2 und G6PD

(A) Inverse Regression zwischen Glykogengehalt und Eilast der bisex infizierten Hamster. (B) Reduzierte Gys2-Expression nach bisex Infektion. (C, D) Gesteigerte Expression von *Pkm* und *G6pd*. Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast (aus KOH-Verdau) als unabhängige und der Glykogengehalt (aus Glykogen-Assay) als abhängige Größe (A). Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe. Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus je drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (B, $p = 0,005$; C; $p < 0,001$; D, $p < 0,001$).

1.3.2.3. Oxidativer Stress

Während einer Infektion mit *S. mansoni* kommt es vermehrt zur Bildung von ROS. Sobald mehr ROS entstehen als abgebaut werden können, entsteht oxidativer Stress. Deshalb sind antioxidative Mechanismen und Enzyme von großer Bedeutung.

1.3.2.3.1. Inverser Zusammenhang zwischen *Cat*-Expression und Eilast

Das Enzym Katalase katalysiert die Reaktion des schädlichen Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff und trägt so zu dessen Neutralisierung bei. Es wird durch das Gen *Cat* codiert. Die *Cat*-Expression wurde in hepatischem Gewebe bisex, monosex und nicht infizierter Hamster gemessen.

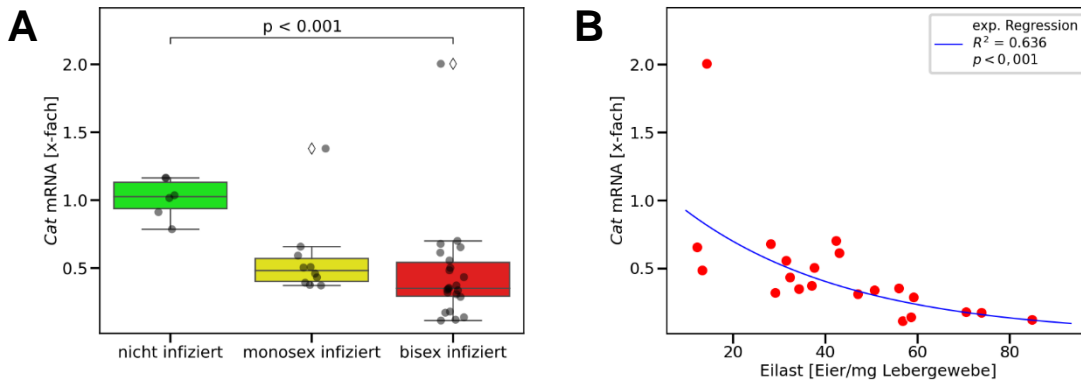


Abbildung 21: Inverse Regression zwischen hepatischer Katalaseexpression und Eilast

(A) Reduzierte *Cat*-Expression in Lebern der bisex infizierten Hamster. (B) Negative exponentielle Regression zwischen *Katalase*-Expression und hepatischer Eilast. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe. Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (A; $p < 0,001$). Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast als unabhängige und *Cat* mRNA als abhängige Größe (B).

Die *Cat*-Expression ist in der bisex infizierten Gruppe im Vergleich zur nicht infizierten Gruppe deutlich reduziert ($p = 0,001$), wie Abbildung 21A zeigt. Der Median beträgt 0,35. Die mRNA-Spiegel der bisex und monosex infizierten Tiere unterscheiden sich nicht wesentlich ($p = 0,326$). Wird die *Cat*-Expression der bisex infizierten Gruppe gegen die Eilast der Tiere aufgetragen, fällt ein negativ exponentieller Zusammenhang der beiden Größen auf (Abbildung 21, $R^2 = 0,636$).

1.3.2.3.2. Reduktion der *Katalase*-Expression in HepG2-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Reduktion der *Cat*-Expression tatsächlich direkt durch die parasitären Eier, bzw. daraus isoliertes SEA, verursacht wird. Eine humane Hepatomzelllinie (HepG2) wurde *in vitro* mit SEA stimuliert und anschließend die *CAT* mRNA quantifiziert. Als Kontrolle wurden Hepatomzellen mit dem SEA-Trägermedium PBS stimuliert.

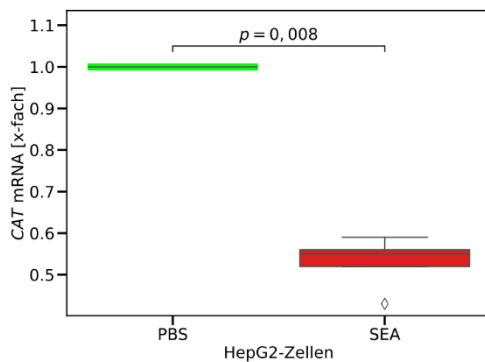


Abbildung 22: Expression des Enzyms Katalase in HepG2-Zellen

Reduzierte *CAT*-Expression in SEA-stimulierten HepG2-Zellen. HepG2-Zelllysate wurden sechs Stunden nach SEA-Stimulation lysiert und die mRNA isoliert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte HepG2-Zellen (PBS). Die relative mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die Kontrolle. Aus fünf technischen Replikaten wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,008$).

Abbildung 22 zeigt die quantifizierte *CAT* mRNA in der SEA-stimulierten Gruppe und in der Kontrollgruppe (PBS). Durch die Stimulation ist die *CAT*-Expression etwa um die Hälfte verringert (Median 0,55). Das Ergebnis bestätigt, dass die reduzierte Katalase-Expression direkt durch die löslichen Ei-Antigene verursacht wird.

1.3.2.4. Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen der Menge der parasitären Eier in der Leber und der Stärke der untersuchten hepatischen Effekte einer *S. mansoni*-Infektion. Die molekular- und zellbiologischen Analysen beziehen sich zum einen auf die Auswirkungen der Schistosomen-Eier auf Immunzellen bzw. deren Zytokin-Expression. Andererseits spiegeln sie die Effekte der Eier auf die Hepatozyten, deren Stoffwechsel und deren Reaktion auf oxidativen Stress wider. Die Abbildungen 23 und 24 bringen die Teilaspekte in einen Kontext und geben eine visuelle Zusammenfassung der Ergebnisse.

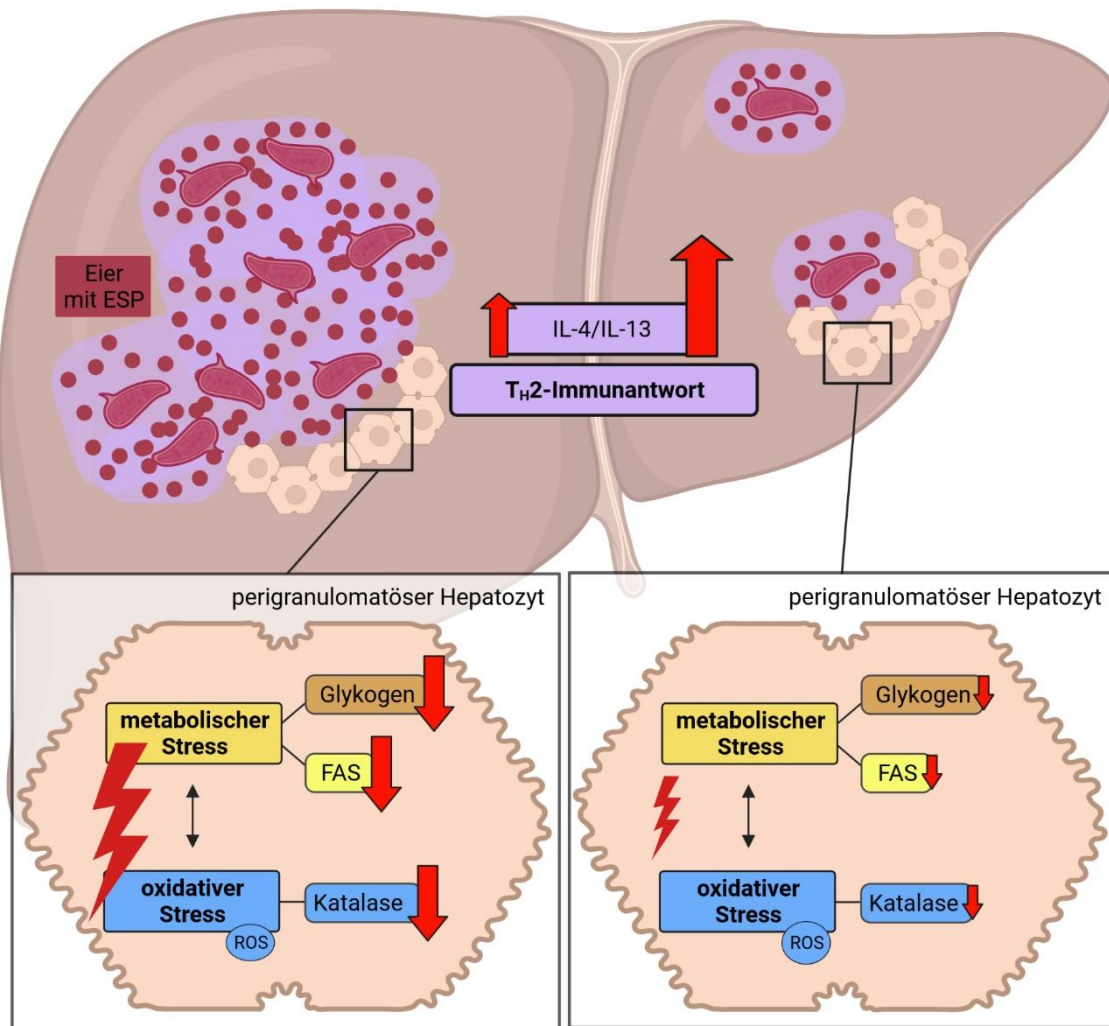


Abbildung 23: Graphische Kurzzusammenfassung der Ei-abhängigen hepatischen Stressfaktoren

Der obere Abschnitt zeigt Leberparenchym, das von *S. mansoni*-Eiern (dunkelrot) befallen ist. Die Eier sind von ihren ESP umgeben (rote Punkte). Die linke Seite der Leber repräsentiert stark Ei-belastetes Leberparenchym, die rechte Seite weist kaum Eier auf. Zu sehen ist das Eilast-abhängige Ausmaß der T_{H2}-Immunantwort (IL-4- und IL-13-Expression). Ist die Eilast hoch, ist die Expression niedrig (kleiner roter Pfeil). Ist die Eilast niedrig, ist die Interleukin-Expression hoch (großer roter Pfeil). Der untere Abschnitt zeigt die Auswirkungen des Eibefalls auf die perigranulomatoösen Hepatozyten. Eine hohe Eilast (perigranulomatoöser Hepatozyt links) führt zu einem hohen Maß an metabolischem Stress. Der Glykogengehalt der Hepatozyten nimmt deutlich ab und die FS-Synthese wird über die reduzierte Expression des Enzyms FAS herabreguliert. Trotz hohen Aufkommens von ROS (oxidativer Stress), nimmt die Expression des antioxidativen Enzyms Katalase stark ab. In Lebergewebe mit niedrigerer Eilast (rechter perigranulomatoöser Hepatozyt) sind die Effekte ebenfalls nachweisbar, aber deutlich schwächer ausgeprägt.

ESP, Ei-sezernierte Proteine; FAS, Fettsäuresynthase; ROS, reaktive Sauerstoffspezies. Eigene Abbildung erstellt mit Biorender.com.

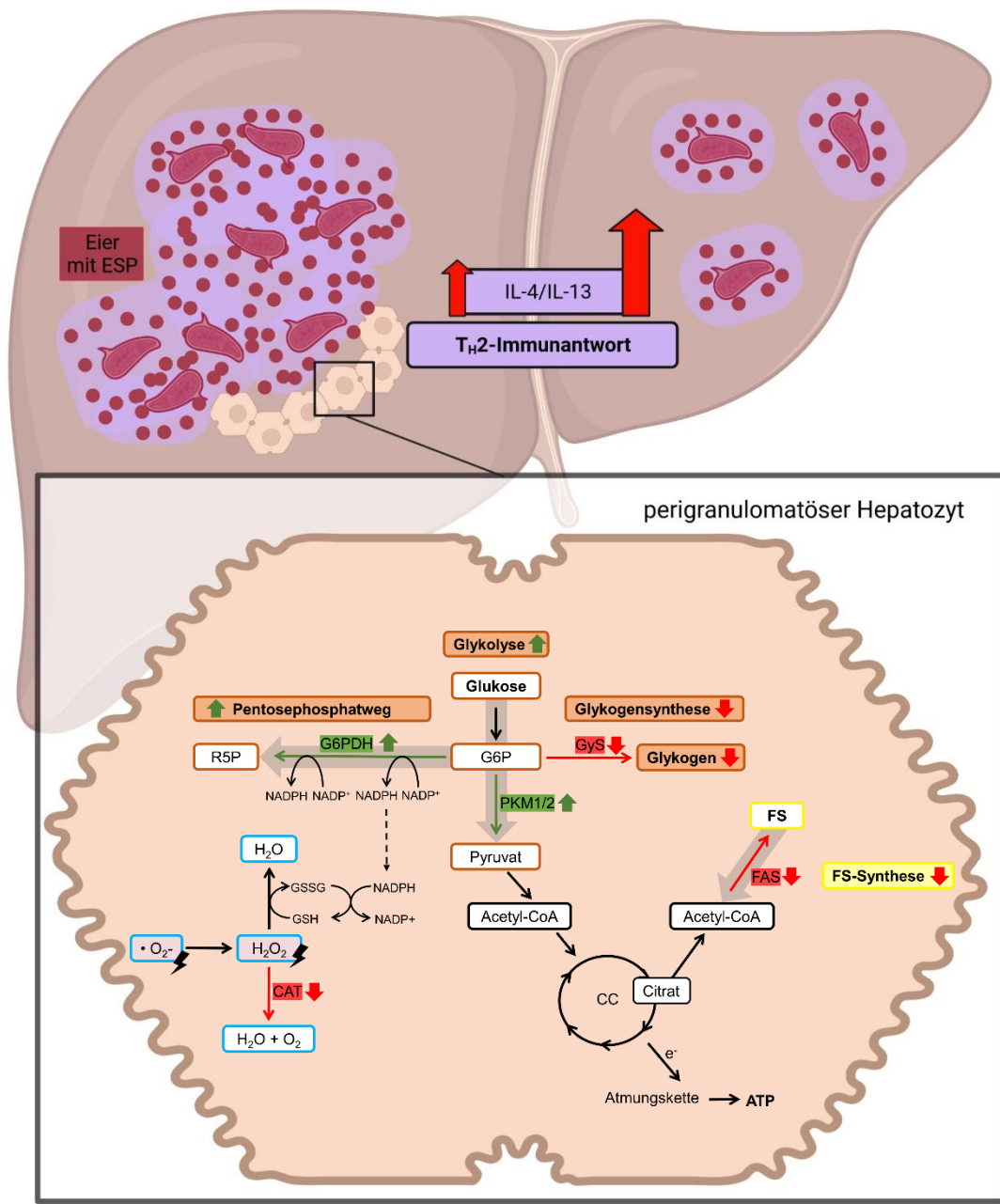


Abbildung 24: Graphische Kurzzusammenfassung des Ei-abhängigen metabolischen Stoffwechsels
 Der obere Abschnitt zeigt Leberparenchym, das von *S. mansoni*-Eiern (dunkelrot) befallen ist. Die Eier sind von ihren ESP umgeben (rote Punkte). Zu sehen ist das Ausmaß der T_H2-Immunantwort (IL-4- und IL-13-Expression). Ist die Eilast hoch, ist die Expression niedrig (kleiner roter Pfeil). Ist die Eilast niedrig, ist die Interleukin-Expression hoch (großer roter Pfeil). Der untere Abschnitt zeigt die Folgen der Infektion auf die perigranulomatösen Hepatozyten. Die Eier beeinflussen den Kohlenhydratstoffwechsel (braune Kästen) und den Lipidstoffwechsel (gelbe Kästen). Die antioxidativen Reaktionen (blaue Kästen) sind über den Pentosephosphatweg und NADPH mit dem Metabolismus verknüpft. Über sie werden ROS (Blitze) neutralisiert. Der Metabolismus wird zugunsten einer katabolen Stoffwechsellaage umprogrammiert (graue Pfeile): Glykolyse (PKM1/2) und Pentosephosphatweg (G6PD) sind hochreguliert (grüne Pfeile), Glykogensynthese (GyS) und FS-Synthese (FAS) herabreguliert (rote Pfeile). Der Glykogengehalt nimmt ab (roter Pfeil). Trotz erhöhten Aufkommens von ROS wird die antioxidative Katalase vermindert exprimiert. G6P, Glukose-6-Phosphat; GyS, Glykogensynthase; R5P, Ribose-5-Phosphat; G6PD, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; PKM1/2, Pyruvatkinase M1/2; CC, Citratzyklus; FAS, Fettsäuresynthase; FS, Fettsäuren; e⁻, Elektronen; ATP, Adenosinriphosphat; •O₂⁻: Superoxidanion; H₂O, Wasser; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; CAT, Katalase; GSH, Glutathion (reduziert); GSSG: Glutathiondisulfid (oxidiert); NADPH, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert); NADP⁺: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert). Eigene Abbildung in Teilen erstellt mit Biorender.com.

1.4. Diskussion

Die Infektion mit dem Parasiten *S. mansoni* stellt in endemischen Gebieten im subtropischen und tropischen Raum ein großes gesundheitliches und sozioökonomisches Problem dar⁸². Eine Ausbreitung des Parasiten nach Europa ist durch den wachsenden Tourismus und die stetig zunehmende Erderwärmung zu befürchten^{211,218}. Gelangen parasitäre Eier in die Leber, verursachen sie dort pathologische Veränderungen des Gewebes¹⁷⁶. Besonders im chronischen Stadium kann es zu schweren hepatischen Komplikationen – insbesondere der portalen Hypertension - kommen, die tödlich verlaufen können⁴⁴.

Ein parasitärer Befall löst zunächst eine T_H1- und anschließend eine T_H2-Immunantwort aus¹⁷⁶. Des Weiteren kommt es im hepatischen Gewebe zu einer metabolischen Umprogrammierung und zur Entstehung von ROS^{24,150}. Durch diese pathologischen Prozesse werden Hepatozyten geschädigt. In vielen Studien wird dafür die Aktivierung von Immunzellen verantwortlich gemacht⁶¹. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Hepatotoxizität direkt durch die Parasiteneier vermittelt wird². Deshalb wird in dieser Arbeit der Einfluss der Eimenge von *S. mansoni* auf den Schweregrad assoziierter pathologischer Prozesse untersucht.

Der Fokus der vorliegenden tierexperimentellen Analyse liegt auf der Beeinflussung der Immunantwort, der Umprogrammierung der Stoffwechselwege und der Entstehung des oxidativen Stresses durch die Anzahl der Eier im Leberparenchym. Zur Beantwortung der Fragestellung erfolgte die Quantifizierung des Glykogengehalts und der Expression von Zytokinen und Enzymen aus Lebergewebe bisex *S. mansoni*-infizierter Hamster. Um die Effekte, die durch die Parasitenwürmer selbst induziert werden, abzugrenzen, wurden die Werte der einzelnen Parameter mit den Werten monosex infizierter Hamster verglichen. Die Gruppe nicht infizierter Hamster diente als Superkontrollgruppe. Nach Bestimmung der hepatischen Eilast der bisex infizierten Hamstergruppe wurde mittels statistischer Analysen ein Zusammenhang der pathologischen Parameter mit der jeweiligen Eilast überprüft. Zur Bestätigung der Ergebnisse erfolgte die Stimulation humaner HepG2-Zellen mit SEA.

Neben der Gewinnung neuer Erkenntnisse ermöglichte der Einsatz der qRT-PCR, präliminäre Befunde unserer Arbeitsgruppe aus Western-Blot-Analysen auf mRNA-Ebene zu überprüfen. Außerdem ermöglichte die Methode eine ressourcenschonende Steigerung der Stichprobengröße.

Die Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen Eilast und T_H2-Immunantwort, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel und der Expression antioxidativer Enzyme. Eine

Korrelation der Eilast mit der T_H1-Antwort konnte demgegenüber nicht dokumentiert werden. Zusammenfassend beeinflusst die Menge an parasitären Eiern das Ausmaß der hepatischen Schädigung in spezifischen, aber nicht allen untersuchten inflammatorischen und metabolischen Prozessen.

1.4.1. Validierung der quantitativen Bestimmung der hepatischen Eilast

Um den Zusammenhang zwischen der Ausprägung pathologieassoziiierter Parameter und der hepatischen Eilast der bisex infizierten Tiere zu untersuchen, wurde die Eilast mit Hilfe des KOH-Verdaus quantifiziert. Die Eibelastung der 22 Tiere wurde miteinander verglichen. Die Eier waren bei stark unterschiedlicher Eibelastung (12 bis 85 Eier/mg Lebergewebe) im Gewebe sehr homogen verteilt (Abbildung 1). Dies ist eine gute Voraussetzung für Regressionsanalysen der abhängigen Parameter, da die Werte auf der Abszisse eine gleichmäßige Verteilung aufweisen. Die analysierten Teile der Leber wurden zufällig ausgewählt. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung der Eier innerhalb der Leber wurden Schnitte von Leberlappen histologisch gefärbt. Die Eier waren in den Stichproben gleichmäßig über das gesamte Parenchym verteilt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Eilast des zufällig gewählten Lebergewebsstücks in etwa der tatsächlichen mittleren Eilast der gesamten Leber entspricht.

Lebende Eier sezernieren Proteine, von denen das Glykoprotein IPSE/ α 1 einen großen Teil ausmacht¹³¹. mRNA aus infiziertem Lebergewebe enthält neben Wirts- auch *Ipse/ α 1* mRNA. Zwischen der ermittelten Eilast und der *Ipse/ α 1*-Expression besteht ein positiver Zusammenhang mit einem hohen Bestimmtheitsmaß R² (Abbildung 12, R² = 0,862). Beide Parameter wurden durch unterschiedliche Methoden aus unterschiedlichen Bereichen der Lebern der Tiere bestimmt. Die hohe Übereinstimmung weist darauf hin, dass die ermittelte Eilast nahe an der tatsächlich vorliegenden Eilast liegt.

1.4.2. Immunantwort

1.4.2.1. Eilastunabhängige T_H1-Immunantwort bei *S. mansoni*-Infektion

Auf eine Infektion mit *S. mansoni* reagiert der Wirtsorganismus zunächst mit einer Immunantwort, die durch das Auftreten von T_H1-Lymphozyten und -Zytokinen wie IFN- γ gekennzeichnet ist¹⁷⁶.

Die hepatische *Ifng*-Expression der infizierten Tiere war auch in dieser Arbeit im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um ein Vielfaches gesteigert (Abbildung 15A). Die T_H1-Immunantwort wird bereits vor der Ablage parasitärer Eier durch Würmer ausgelöst¹⁷⁶. Das erklärt, warum die T_H1-Immunantwort besonders in der monosex infizierten Gruppe teilweise sehr hohe *Ifng*-Werte erreichte.

Auch die bisex infizierten Hamster enthalten Würmer und parasitäre Wurmvorstufen, sodass hier ein Anstieg der *Ifng*-Expression zu erwarten war. Studien weisen darauf hin, dass ESP-Bestandteile wie Lacto-N-Fucopentaose III (LNFP III) die IFN- γ -Produktion natürlicher Killerzellen und CD4⁺ T-Lymphozyten induzieren können^{125,222}. Diese spielen bei der Bildung früher Granulome eine Rolle^{125,222}. Dennoch zeigten die *Ifng*-Werte der bisex infizierten Gruppe weder eine positive noch eine negative Abhängigkeit von der Eilast (Abbildung 15B). Das bestätigt die Annahme, dass die Eier die nicht maßgeblichen Auslöser der T_H1-Antwort sind³².

Bisherige Studien zeigen, dass ab dem Zeitpunkt der Eiablage eine etablierte T_H2-Antwort sogar zur Rückbildung der T_H1-Zytokin-Spiegel führt²²². In dieser Untersuchung fand sich jedoch kein negativer, sondern ein positiver Zusammenhang zwischen der *Ifng*- und *Il4*-Expression (Abbildung 29, Anhang). Es könnte sich um eine Übergangsphase zwischen T_H1- und T_H2-Antwort handeln⁷¹.

1.4.2.2. Induktion der T_H2-Immunantwort bei bisex *S. mansoni*-Infektion

Im Verlauf der Infektion geht die T_H1-Immunantwort in eine T_H2-Antwort mit Zunahme der IL-4-, IL-5- und IL-13-Spiegel über¹⁷⁶. Die Expression dieser Zytokine war besonders in der bisex infizierten Gruppen stark erhöht (Abbildung 16A und Abbildung 16C; Abbildung 28A im Anhang). Diese Beobachtung steht im Einklang mit vielen weiteren Studien. Die Eier sind für den Übergang von einer T_H1- zu einer T_H2-Antwort verantwortlich und SEA stimuliert die IL-4- und IL-13-Produktion^{3,83,202}.

Eine moderate Steigerung der Zytokin-Expression zeigte auch die monosex infizierte Gruppe. Vermutlich handelt es sich dabei um eine frühe Bahnung der T_H2-Antwort, ausgelöst durch Wurmantigene¹⁵¹. Würmer und Eier besitzen Kreuzantigene, die nach der Eiablage eine schnelle Rekrutierung von CD4⁺ T-Lymphozyten ermöglichen¹⁵¹. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass eine Sensibilisierung des Wirts durch Wurmantigene sogar zwingend erforderlich ist, um nach der Eiablage Granulome ausbilden zu können¹¹⁶. Selbst larvale Vorstufen scheinen bereits in der Lage zu sein, die Reifung von CD4⁺-T-Lymphozyten in gewissem Maße zu fördern und T_H2-Zytokin-Spiegel zu erhöhen⁹⁶.

Dennoch muss betont werden, dass sich die T_H2-Immunantwort erst durch das Auftreten parasitärer Eier in vollem Umfang ausbildet⁸³.

1.4.2.3. Reduktion der T_H2-Immunantwort mit zunehmender Eilast

Bei der genaueren Untersuchung der bisex Gruppe zeigte sich erstaunlicherweise eine Reduktion der *Il4*- und *Il13*-Expression mit zunehmender Eilast (Abbildung 16B und Abbildung 16D). Dies wurde auch für *Il5* beobachtet (Abbildung 28B, im Anhang).

Leberproben mit besonders hohen *Igse/α1*-Spiegeln wiesen eine sehr niedrige *IL4*-Expression auf (Abbildung 16E). Der Zusammenhang zwischen einer Abnahme der T_H2 -Immunantwort bei zunehmender Eibelastung wurde unseres Wissens bisher noch nie beschrieben. Es ist möglich, dass sich der Wirtsorganismus bei starker Eilast durch eine Begrenzung der T_H2 -Antwort vor den negativen Schäden einer überschießenden Immunantwort schützen möchte. Aufgrund der regelmäßigen Konfrontation des Lebergewebes mit verschiedenen Krankheitserregern und Antigenen aus dem Pfortaderblut, besitzt die Leber im Allgemeinen eine hohe Fähigkeit zur Regulation ihrer Immunantwort²²³. So können Hypersensitivitätsreaktionen vermieden werden²²³. Auch der hohe selektive Druck auf Parasiten und ihren Wirt hat zur Koevolution von Schutzmechanismen geführt¹²⁵.

Eine Reduktion der T_H2 -Antwort kann im chronischen Stadium der Schistosomiasis-Infektion zum Schutz vor Gewebeschäden beobachtet werden⁸⁶. Dabei kommt es zur Ausbildung hyporesponsiver T-Lymphozyten bis hin zur T-Zell-Anergie und zu abnehmenden T_H2 -Zytokin-Spiegeln¹⁹⁴. Passend dazu zeigen epidemiologische Studien einen umgekehrten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von chronischer Schistosomiasis und Typ-I-Allergien^{12,149}. Da einer Typ-I-Allergie, wie z.B. der allergischen Rhinokonjunktivitis oder dem allergischen Asthma, eine T_H2 -vermittelte Hypersensitivitätsreaktion zugrunde liegt, wird deren Auftreten durch die Unterdrückung der T_H2 -Antwort reduziert¹²⁹.

Auch bei anderen chronischen Infektionen der Leber kann die Ausbildung einer Immuntoleranz beobachtet werden. Die chronische Hepatitis B und C oder Malaria gehen ebenfalls mit einer reduzierten Immunantwort einher²²³. Besonders bei hoher Antigenlast kommt es zu einer Erschöpfung der T-Lymphozyten¹⁴⁰. Eine Erschöpfung der T-Zellen durch hohe Antigenspiegel wäre auch als Erklärung des hier beobachteten Effekts denkbar. Allerdings fällt der Messzeitpunkt in dieser Studie in die akute Phase der Entzündung, während die klassische T-Zell-Ermüdung in der Regel erst im chronischen Stadium festgestellt werden kann¹³².

Denkbar wäre auch die Abnahme der T_H2 -Antwort durch Apoptose von T_H -Zellen. SEA kann *in vitro* die Apoptose von T_H -Zellen induzieren¹²⁵. Die T_H -Zellen infizierter Mäuse exprimierten den Apoptose-induzierenden Fas-Liganden^{124,125}. Im Mausmodell war eine Apoptose nach der Eiablage, noch vor dem chronischen Stadium, zu beobachten. Im Verlauf wurden etwa 20% der $CD4^+$ Zellen eliminiert^{124,125}.

Neben T-Lymphozyten produzieren auch basophile Zellen T_H2 -Zytokine. Wurden humane basophile Zellen mit SEA in ansteigender Konzentration stimuliert, nahm ihre *IL-4*-Produktion jedoch kontinuierlich zu⁶⁸. Das spricht gegen eine Beteiligung der basophilen Zellen an der beobachteten Regulation.

Umgekehrt könnte auch eine schwach ausgeprägte Immunantwort die Eiablage und -migration in das hepatische Gewebe begünstigen. Jedoch wurde bei *IL4*-depletierten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Wurm- oder Eilast festgestellt, sodass dies als Erklärung eher unwahrscheinlich scheint ¹¹².

Ebenfalls unklar bleibt, ob die akute Reduktion der T_H2 -Zytokin-Spiegel bei hoher Eilast eher einen Nutzen für den Parasit oder den Wirt hat. IL-4 und IL-13 gelten als wichtigste Zytokine für die Granulombildung ²²². Granulome schützen die umliegenden Hepatozyten vor den hepatotoxischen Eigenschaften der ESP ⁸⁶. Eine kombinierte *IL4*- und *IL13*-Depletion führte bei infizierten Mäusen neben einer enormen Leberzellschädigung zu beeinträchtigter Ei-Ausscheidung mit Endotoxämie und akuter Mortalität ⁷⁰, was weder Ziel des Wirts noch der Parasiten sein kann.

IL-13 wird eine profibrotische Wirkung zugeschrieben ⁸⁶. Seine Herabregulation könnte die exzessive Ausbildung fibrotischer Läsionen reduzieren, das Leberparenchym vor großflächigem Umbau schützen und so eine schwere Funktionsstörung der Leber verhindern. Patient:innen mit HSS – gekennzeichnet durch eine schwere periportale Fibrose – wiesen erhöhte IL-13-Spiegel auf, die mit dem Schweregrad der Fibrose korrelierten ¹⁴³. Verglichen wurde die Versuchsgruppe mit chronischen Schistosomiasis-Patient:innen ohne HSS ¹⁴³. Für IL-4 waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar ¹⁴³. Manche Studien bestätigen eine IL-13-Erhöhung in Zusammenhang mit einer HSS ^{8,97}, andere können keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen erhöhter T_H2 -Zytokin-Expression und einer HSS herstellen ^{28,136,144}. Das Auftreten und die Ausprägung von (fibrotischen) Langzeitfolgen einer Schistosomiasis-Infektion scheint von vielen Faktoren abzuhängen ¹⁵⁹. Ob die beobachtete Reduktion der T_H2 -Antwort im akuten Stadium vor schweren hepatischen Komplikationen schützen kann, bleibt offen.

Interessanterweise ist die Fortpflanzungsaktivität adulter Würmer von der T_H2 -Antwort abhängig und in Abwesenheit von $CD4^+$ T-Lymphozyten beeinträchtigt ⁴⁸. Denkbar wäre auch ein negativer Feedback-Mechanismus, bei dem eine hohe Eizahl die Neuproduktion parasitärer Eier hemmen und eine Überladung des Gewebes mit Eiern verhindern könnte. Eine derartige Regulation könnte sich als evolutiver Vorteil durchgesetzt haben.

Da es sich in dieser Arbeit ausschließlich um einen statistischen Zusammenhang zwischen den beiden Größen Eilast und T_H2 -Zytokin-Expression im Hamstermodell handelt, sind gezielte Studien zur weiteren Exploration erforderlich. Welcher Nutzen für den Wirt bzw. den Parasiten besteht und welcher Mechanismus für die T_H2 -Abnahme verantwortlich sein könnte, bleibt zunächst ungeklärt.

1.4.2.4. Keine Ei-abhängige Expression von IL-10

Auch das Zytokin IL-10 ist an der Regulation der T_H2-Immunantwort beteiligt³². Es spielt bei der akuten und bei der chronischen Schistosomiasis eine wichtige Rolle³².

Im Vergleich zur nicht infizierten Gruppe war seine Expression in beiden infizierten Gruppen deutlich erhöht (Abbildung 17A). Das ist nicht verwunderlich, da IL-10 sowohl an der T_H1-, als auch an der T_H2-Antwort beteiligt ist und in beiden Fällen eine exzessive Ausprägung verhindert⁹². So sollen Komplikationen wie Fibrose vermieden werden²⁷. Obwohl SEA in der Lage ist, die *IL10*-Expression zu stimulieren⁸⁵, zeigte sich in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen der Eilast und der *IL10* mRNA (Abbildung 17B). Im Gegensatz dazu, scheint *IL10* in den Proben unabhängig von der hepatischen Eimenge relativ gleichförmig exprimiert zu werden.

Die hepatische Eilast hat die *IL10*-Expression in unserem Modell nicht maßgeblich beeinflusst. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass IL-10 für die hier beobachtete Suppression der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 verantwortlich ist.

1.4.2.5. Schutz des Gewebes und Verstärkung der Zellproliferation durch IL-6?

IL-6 wird im Rahmen der T_H2-Antwort unter anderem von Makrophagen und T_H-Lymphozyten produziert¹¹¹.

In der vorliegenden Arbeit war die hepatische *IL6*-Expression der infizierten Hamster im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren deutlich erhöht (Abbildung 18A). Die IL-6-Produktion wird Ei-abhängig induziert¹¹¹. Passend dazu, nahm die *IL6*-Expression der infizierten Gruppe mit steigender Eibelastung des Lebergewebes zu (Abbildung 18B). Nach der Eiablage führt IL-6 zur Regulation der T_H1- und der T_H2-Antwort¹¹¹. Dies geschieht direkt über die Suppression von I κ B (T_H1-Antwort) und indirekt über die Stimulation der *IL10*-Expression (T_H1- und T_H2-Antwort)¹¹¹.

Daten aus Endemiegebieten weisen darauf hin, dass hohe IL-6- und IL-10-Spiegel im chronischen Stadium vor schweren Komplikationen, wie der HSS, schützen können¹⁴³. So könnte IL-6 bereits im akuten Stadium das Wirtsgewebe vor den schädlichen Auswirkungen einer starken Immunantwort schützen. Wenn die parasitären Eier die *IL6*-Expression verstärken und diese mit der Eizahl zunimmt, wäre für einen begleitenden Schutzmechanismus gesorgt, was dem Wirt und damit auch dem Parasiten zugutekommen würde.

Ei-assoziierte Proteine aktivieren nachweislich proliferative Signalwege in Hepatozyten¹⁶⁶. Da auch IL-6 eine positive proliferative Wirkung auf Hepatozyten hat, könnte IL-6 die Proliferation und Regeneration der Hepatozyten bei der hepatischen Schistosomiasis fördern⁷³.

Zusammenfassend weist die Untersuchung der von *S. mansoni* induzierten Immunantwort darauf hin, dass der Grad der hepatischen Eibelastung die Ausprägung der T_H2-Immunantwort – nicht jedoch der T_H1-Antwort - beeinflusst.

1.4.3. Stoffwechsel

Eine *S. mansoni*-Infektion und die begleitende Immunreaktion haben Auswirkungen auf den hepatischen Stoffwechsel des Wirts³⁰. Es wurde analysiert, ob das Ausmaß der Stoffwechseländerungen von der Anzahl hepatischer Eier abhängig ist. Untersucht wurden Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel.

1.4.3.1. Lipidstoffwechsel

1.4.3.1.1. Eilast-abhängige Reduktion der Fettsäuresynthese?

Der hepatische Lipidstoffwechsel verändert sich durch die Infektion mit *S. mansoni*^{24,190}. Die Auswirkungen auf die hepatische Fettsäuresynthese bisex infizierter Hamster wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Die relative Expression des Gens *Fasn* (codiert für FAS) war im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe um mehr als 50% reduziert (Abbildung 19A). Innerhalb der bisex infizierten Gruppe sank die *Fasn*-Expression umso stärker, je mehr Eier das Lebergewebe aufwies (Abbildung 19B). Weil das Enzym FAS beinahe alle Reaktionsschritte der FS-Synthese katalysiert, spricht dies für eine Eilast-abhängige Reduktion der FS-Synthese im betroffenen Gewebe¹²². Im Gruppenvergleich war auch die *Fasn*-Expression monosex infizierter Tiere tendenziell verringert, jedoch war die Reduktion hier viel schwächer ausgeprägt (Abbildung 19A). Es kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Würmer allein einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus haben.

Die transkriptionellen Daten der vorliegenden Studie bestätigen vorausgegangene Western-Blot-Analysen, die neben erniedrigten FAS-Spiegeln in den infizierten Tieren auch reduzierte ACC1-Spiegel präsentierten³⁰. ACC1 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der FS-Synthese¹²². Bei Studien mit *S. japonicum*-infizierten Mäusen wurde ebenfalls eine Reduktion der Enzyme der FS-Synthese beobachtet^{148,217}. Die Injektion von *S. mansoni*-SEA in adipöse Mäuse hatte den gleichen Effekt²⁴. Immunhistochemische Färbungen zeigen eine reduzierte FAS-Expression der Hepatozyten infizierter Hamster³⁰.

Die Abnahme der *Fasn*-Expression wird durch die Eier und ihre sezernierten Proteine induziert. Nach *in vitro* Stimulation von Hepatozyten mit SEA und dem Helminthenspezifischen Glykan LNFPIII reduziert sich die Expression der lipogenetischen Enzyme²⁴. LNFPIII bindet dabei an C-Typ-Lektin-Rezeptoren der Hepatozyten und

reguliert die nukleäre Enzymtranskription über die Erk-Ap1-Fxr- α -Achse²⁴. Keinen Einfluss auf die Enzymexpression hatte die Inkubation der Hepatozyten in Medium, das von LNFPIII-behandelten Makrophagen stammte²⁴. Unsere Zellkulturexperimente unterstreichen, dass die Eier die Expression lipogenetischer Enzyme unabhängig von Immunzellen und Faktoren wie Nährstoff- und Substratangebot oder Hormonen (z.B. Insulin oder Glukagon) beeinflussen^{30,122}.

Weshalb die hepatische FS-Synthese während der *S. mansoni*-Infektion reduziert ist, bleibt unklar. Da die Eier keine *de novo* FS-Synthese betreiben können^{22,29}, nehmen sie FS aus dem Wirtsgewebe auf und speichern sie als TAG^{23,30}. Dieser Nährstoffübergang von Wirt auf Parasit spiegelt sich in einem reduzierten hepatischen TAG-Gehalt bisex infizierter Tiere wider³⁰. Auch eine LNFPIII-Behandlung von Mäusen zeigte diesen Effekt²⁴. In Einklang mit einer reduzierten hepatischen Lipidsynthese und -speicherung weisen *S. mansoni*-infizierte Patient:innen niedrigere TAG- und *Low-Density-Lipoprotein* (LDL)-Werte des Serums auf^{50,210}. Die Eier können aus den FS keine Energie gewinnen, da sie nicht in der Lage sind, diese über β -Oxidation abzubauen²³. Statt als Energiespeicher, werden die Lipide zur Biosynthese von Phospholipiden und Membranen verwendet, weshalb sie für die Zellteilung und Reifung der Mirazidien wichtig sind^{23,197}. Möglicherweise könnte der Wirt durch die Limitierung der hepatischen FS-Synthese und gleichzeitig durch einen verstärkten FS-Abbau versuchen, das Substratangebot und damit das Parasitenwachstum zu begrenzen^{24,148,217}. Schließlich handelt es sich bei dem parasitären Befall der Leber um eine Fehlbesiedlung des Organs, die zu großen Schäden führen kann.

Zusammenfassend bleiben die Hintergründe der Regulation des hepatischen Lipidstoffwechsels offen. Die negativ exponentielle statistische Abhängigkeit der *Fasn*-Expression von der hepatischen Eibelastung und Literaturdaten aus Tier- und Zellkulturexperimenten sind starke Indikatoren dafür, dass die Eilast das Ausmaß der *Fasn*-Reduktion wesentlich beeinflussen kann.

1.4.3.2. Kohlenhydratstoffwechsel

1.4.3.2.1. Eilast-abhängige Reduktion des hepatischen Glykogen-Gehalts?

Dass *S. mansoni* auch den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflussen, ist bereits aus anderen Studien^{5,170,179} und aus Versuchen unserer Arbeitsgruppe bekannt³⁰. In dieser Arbeit wurde der Glykogengehalt des hepatischen Gewebes der infizierten Gruppe quantifiziert und eine mögliche Abhängigkeit von der Eilast überprüft. Je höher die Eibelastung des Gewebes, desto niedriger war dessen Glykogen-Gehalt (Abbildung 20A). Dieses Ergebnis suggeriert, dass die Eier eine hepatische Glykogenabnahme

bewirken können. Im Vergleich zu gesunden und zu monosex infizierten Tieren ist der hepatische Glykogengehalt bisex infizierter Tiere deutlich erniedrigt³⁰. Das weist darauf hin, dass die Produktion oder die Ablage der Eier bei der Reduktion des Glykogens eine wesentliche Rolle spielen. Sie sollte nicht allein auf die adulten Würmer zurückgeführt werden, obwohl diese Glykogen speichern und verstoffwechseln können¹⁹⁸.

Einen reduzierten hepatischen Glykogengehalt während einer Schistosomen-Infektion zeigten auch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen^{128,179,213}. In der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, dass die Eier neben TAG und FS auch Kohlenhydrate und Aminosäuren aus dem umliegenden Gewebe aufnehmen^{103,117,192}. Besonders unreife Eier nehmen im Verlauf ihrer Reifung enorm an Masse zu¹³. Sie sind dabei auf die Aufnahme von exogenen Nährstoffen angewiesen und können sich nicht unabhängig davon entwickeln^{13,103}. Lebergewebe ist durch die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Pfortaderblut sehr gehaltvoll. In einer Publikation von Lewert et al. ist zu sehen, dass Eier *in vitro* radioaktiv-markierte Glukose aufnahmen¹¹⁷. Vermutlich erfolgt die Nährstoffaufnahme durch kleine Poren in der Eierschale¹⁰². Wurde bei der Kultur von *S. japonicum*-Eiern glukosefreies Medium verwendet, fand keine Reifung der Eier statt¹⁰³. Die parasitären Eier verfügen über endogene Glykogenspeicher¹⁴. In einer histologischen Färbung kohlenhydrathaltiger Strukturen (*Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung) waren die Eier deutlich angefärbt³⁰. Das Leberparenchym wies im Vergleich zu Kontrollfärbungen jedoch einen stark verminderten Glykogengehalt auf³⁰.

Die Expression der GyS in der Leber infizierter Tiere war reduziert (Abbildung 20B), was auch auf Proteinebene nachgewiesen wurde³⁰. Eine verringerte Glykogensynthese könnte für die niedrigen hepatischen Glykogenwerte mitverantwortlich sein. Als Ursache denkbar wäre auch ein verstärkter intrazellulärer Glykogenabbau, jedoch wird auch eine verminderte Glykogenolyse beschrieben^{30,170}. Wird weniger abgebaut, steht den Eiern mehr Glykogen zur Aufnahme zur Verfügung. Möglicherweise ist ein evolutionäres Ziel dieser metabolischen Einflussnahme, große Energiespeicher anzulegen, von denen die Mirazidien nach dem Schlüpfen aus der Eischale und dem Verlassen des Wirts zehren können¹⁹². Im Mirazidien-Stadium ist der Metabolismus des Parasiten aufgrund von exogenem Nährstoffmangel auf den Abbau endogener Glykogenreserven angewiesen¹⁹⁷.

Zusammengenommen weisen die Daten auf einen Übergang der hepatischen Glykogenreserven auf Glykogenspeicher in den Eiern hin. Die Eilast scheint das Ausmaß der Veränderung des hepatischen Glykogengehalts zu bestimmen.

1.4.3.2.2. Verstärkter Abbau der hepatischen Glukose

Auch der hepatische Glukoseabbau über die Glykolyse und den Pentosephosphatweg ist in der Leber *S. mansoni*-infizierter Tiere verstärkt. Die *Pkm*- und *G6pd*-Expression nahm bei Infektion zu (Abbildung 20C und D). Diese Ergebnisse bestätigen Western-Blot-Analysen unserer infizierten Hamster³⁰ und Daten anderer Forschergruppen (s. 1.1.3.3.2.2). Ein Zusammenhang zwischen der Zunahme der mRNA-Expression und der Eibelastung des Gewebes wurde nicht festgestellt (Abbildung 30, Anhang). Jedoch zeigen Zellkultur-Experimente, dass die Enzymexpression durch SEA beeinflusst wird³⁰. Da sowohl die Glykogensynthese, als auch der Glykogenabbau herunterreguliert sind (s. 1.4.3.2.1), scheinen die bestehenden hepatischen Glykogenspeicher vom Rest des Kohlenhydratstoffwechsels abgekoppelt zu sein. Folglich dürfte den Hepatozyten kaum Glukose aus den Glykogenreserven zur Verfügung stehen. Die Glukose muss aus dem nährstoffreichen Pfortaderblut bezogen werden. Der verstärkte Abbau der gewonnenen Glukose und die fehlende Verfügbarkeit der Glykogenspeicher könnte die reduzierten Nüchtern-Glukosespiegel von Schistosomiasis-Patient:innen erklären²¹⁰.

Die vermehrte Expression der *Pkm* mRNA spricht für den Abbau der vorhandenen Glukose über die Glykolyse. Das Enzym PKM wurde ursprünglich aus Muskelgewebe isoliert, wird aber auch in anderen Gewebearten exprimiert⁷. Vor allem die Isoform PKM 2 wurde vermehrt in stark proliferierendem Gewebe wie z.B. Tumor- und Stammzellen nachgewiesen⁷. Glykolyse findet aerob oder anaerob zur Energiegewinnung statt¹⁴². Gleichzeitig generiert sie wichtige Substrate für andere Stoffwechselwege¹⁴². Interessanterweise deuten Studien darauf hin, dass der Citratzyklus und die Atmungskette der Hepatozyten infizierter Tiere negativ reguliert sind, sodass eine verstärkte aerobe ATP-Generierung über diesen Weg unwahrscheinlich scheint^{87,161,204}. Denkbar wäre stattdessen die Nutzung eines Mechanismus, der der *aeroben Glykolyse* (Warburg-Effekt) ähnlich ist: Schnell proliferierende Zellen lassen trotz ausreichendem Sauerstoffangebot verstärkt die „anaerobe Glykolyse“ ablaufen, um unter Laktat-Produktion den hohen Bedarf an Metaboliten für ihre Biosynthese aus den Zwischenprodukten zu decken¹²⁶. Im Falle der Schistosomiasis wäre es möglich, dass die Eier den Metabolismus der Hepatozyten zugunsten einer *aeroben Glykolyse* umprogrammieren. Sie könnten die reichlich entstehenden Glykolyse-Produkte aufnehmen und für ihren Stoffwechsel und ihr massives Wachstum nutzen. Tatsächlich wurde *in vitro* verfolgt, wie radioaktiv markierte Glukose aus Kulturmedium in bestimmte Aminosäuren von *S. japonicum*-Eiern eingebaut wurde¹⁰². Grundsätzlich dienen die Kohlenstoffatome der Glukose als Grundbausteine vieler Moleküle¹²⁶. Beispielsweise werden daraus neben Aminosäuren auch FS und Phospholipide synthetisiert, die unter anderem als Bausteine für Zellmembranen der Eier genutzt werden¹²⁶. Für die eigene

FS-Synthese der Hepatozyten werden die Moleküle vermutlich kaum verwendet, da diese herunterreguliert ist (s. 1.4.3.1.1).

Ein zweiter Pfad des Glukoseabbaus ist der Pentosephosphatweg, der ebenfalls verstärkt abläuft. Als Produkte entstehen hierbei Pentosen, die wichtig für die Nukleinsäuresynthese sind¹⁴². Außerdem wird NADPH/H⁺ als Reduktionsäquivalent gebildet, das bei der Vermeidung von oxidativem Stress an der Reduktion von oxidiertem Glutathion beteiligt ist¹⁴² (s.11.4.4).

Die eingewanderten Immunzellen in den Granulomen machen einen gewissen Anteil der verwendeten Leberlysate aus. Diese sind ebenfalls in der Lage, den Stoffwechsel der Leber zu modulieren⁴⁶. Der Metabolismus aktivierter Immunzellen – besonders der AAMs – weist nach Stimulation mit *S. japonicum*-SEA ähnliche Veränderungen des Stoffwechsels auf, wie die Hepatozyten^{161,217}. Die Enzyme PKM und G6PD werden in immunhistochemischen Färbungen der Leber infizierter Hamster sowohl in den Zellen der Granulome, als auch in den perigranulomatösen Hepatozyten stark exprimiert³⁰.

Im Vergleich zur Leber ist über die Regulation der Stoffwechselwege des Darms nur wenig bekannt. Immunhistochemische Färbungen humaner Kolonproben bilden Glykogen- und Lipid-Ansammlungen in den *S. mansoni*-Eiern ab³⁰. Eine Studie von Yang et al. beschreibt eine Steigerung kataboler und anaboler Stoffwechselwege bei *S. japonicum*, einschließlich der Glukoneogenese und der FS-Synthese²²⁰. Möglicherweise versucht der Wirt über den intestinalen Metabolismus, bei der Deckung seines Nährstoffbedarfs den Ausfall der Leber zu kompensieren²²⁰.

Werden der Lipid- und der Kohlenhydratmetabolismus gemeinsam betrachtet, deutet alles darauf hin, dass die parasitären Eier in der Leber eine katabole Stoffwechsellaage induzieren. Sie nehmen die Lipid- und Glykogenreserven sowie die entstehenden Stoffwechselprodukte des Wirts auf, um Energie und Substrate für ihre Biosynthese zu gewinnen. Der daraus resultierende Nährstoffmangel stimuliert vermutlich die katabolen Stoffwechselwege zusätzlich. Die Regulation findet nicht nur im Rahmen des Immunmetabolismus der eingewanderten Makrophagen statt, sondern wird durch die Parasiteneier in den Hepatozyten induziert. Möglicherweise schützt sich das Wirtsorgan gleichzeitig vor übermäßigem Ei-Befall und -wachstum, indem es die Neusynthese der Speichermoleküle (Glykogen und FS) Eilast-abhängig reduziert.

1.4.4. Oxidativer Stress

1.4.4.1. Eilast-abhängige Reduktion der hepatischen Katalase

Eine weitere Folge des *S. mansoni*-Befalls der Leber ist erhöhter oxidativer Stress, der sich durch das Auftreten von ROS auszeichnet^{30,79,150}. Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen Oxidantien (z.B. ROS) und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien verschoben wird¹⁸⁴. Im Lebergewebe infizierter Mäuse wurden ROS vor allem in unmittelbarer Nähe zu den Schistosomen-Eiern nachgewiesen¹. Besonders viele ROS enthalten die Ei-nahen Immunzellen der Granulome, die diese gezielt zur Parasitenabwehr freisetzen¹. Auch in den perigranulomatösen Hepatozyten sind ROS zu finden¹. Sie entstehen direkt durch den Einfluss von SEA, was Zellkultur-Experimente mit SEA-stimulierten HepG2-Zellen zeigten³⁰. Darüber hinaus fördert Ei-induzierter Nährstoffmangel (s. 1.4.3) ihre Entstehung^{75,30}. Cunha et al. beschreiben neben erhöhtem oxidativem Stress einen positiven Zusammenhang zwischen MDA-Spiegeln des Bluts und dem Infektionsgrad bei infizierten Patient:innen⁴⁹.

Um die Entstehung und Kompensation des oxidativen Stresses besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die antioxidativen Mechanismen der Hepatozyten genauer untersucht. Ein wichtiges Enzym, das ROS neutralisieren kann, ist die Katalase. Sie setzt H_2O_2 zu H_2O und O_2 um¹⁷¹. Interessanterweise war die *Cat*-Expression des Lebergewebes infizierter Hamster reduziert (Abbildung 21A), obwohl die Messwerte der MDA-Spiegel gleichzeitig einen erhöhten oxidativen Stress der Tiere anzeigten³⁰. Die Beobachtung bestätigt Ergebnisse aus Western-Blot-Analysen vorausgegangener Studien³⁰. Bei erhöhtem Aufkommen von ROS wäre jedoch eine Intensivierung antioxidativer Mechanismen der Hepatozyten zu erwarten gewesen²⁰⁷. Im Normalfall sollte das Ziel eine Neutralisierung der reaktiven Moleküle und damit die Verhinderung der daraus entstehenden negativen Folgen sein²⁰⁷. Die gegensätzliche Regulation war Kolleg:innen anderer Arbeitsgruppen ebenfalls aufgefallen^{79,150}. Erhöhter oxidativer Stress bei gleichzeitig reduzierter antioxidativer Enzymexpression wird auch für andere hepatische Erkrankungen beschrieben^{41,58}.

Die Reduktion der antioxidativen Enzyme wurde von Elsammak et al. auf die ausgeprägte $\text{T}_\text{H}2$ -Immunantwort und das damit ansteigende IL-4 zurückgeführt⁶¹. Allerdings wiesen *Il4*-depletierte Mäuse nach *S. mansoni*-Infektion deutlich erhöhte ROS-Spiegel und erniedrigte *Cat*-Spiegel im Vergleich zu infizierten Wildtyp-Mäusen auf¹¹². Ein letaler Verlauf der Infektion konnte durch eine Behandlung mit Antioxidantien meist verhindert werden¹¹². Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten einen positiven Zusammenhang zwischen *Il4*- und *Cat*-Expression an (Abbildung 31, Anhang). Eine Abhängigkeit kann nicht ausgeschlossen werden.

Es wurde *in vivo* vermutet und *in vitro* bestätigt, dass die parasitären Eier selbst die *Cat*-Expression der Hepatozyten reduzieren. Die Anzahl der Eier beeinflusste das Ausmaß der Reduktion der *Cat* mRNA im Lebergewebe infizierter Tiere. Nach SEA-Stimulation von HepG2-Zellen unter Zellkulturbedingungen war eine eindeutige Reduktion der CAT-Expression zu messen. Somit konnte durch diese Arbeit der direkte Einfluss der SEA auf das antioxidative Enzym bewiesen werden; getrennt von jeglichen Immunzellen und Zytokinen.

1.4.4.2. Alternative antioxidative Mechanismen

Es stellt sich die Frage, wie der Wirt überleben kann, wenn durch die Eier einerseits viele ROS generiert werden und andererseits eine Reduktion der *Cat*-Expression induziert wird. Denkbar wäre, dass ROS vermehrt über andere antioxidative Enzyme (SOD, GPx) abgebaut werden. Die SOD katalysiert die Reaktion von O_2^{\bullet} zu H_2O_2 ¹⁷¹. Die im Zytosol und Nukleus vorkommende SOD 2 wurde in dieser Studie verstärkt exprimiert nachgewiesen, die SOD 1 (Mitochondrien) hingegen vermindert (Abbildung 32A und B im Anhang) ¹⁷¹. Die GPx setzt unter GSH-Verbrauch H_2O_2 zu H_2O um ¹⁷¹. Obwohl über die SOD 2 vermehrt H_2O_2 anfallen müsste und weniger Katalase gebildet wird, scheint die GPx in diesem Experiment weder hoch-, noch herunterreguliert zu sein (Abbildung 32C im Anhang). Die Ergebnisse zur *Sod*- und *Gpx*-Regulation aus anderen Tierstudien sind widersprüchlich ^{150,79}. Dies könnte auf den Einfluss unterschiedlicher Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Darüber hinaus lässt die quantifizierte mRNA nicht sicher auf die endgültige Enzymaktivität schließen ⁷⁹. Neben gestörter Translation der mRNA können beispielsweise relevante Kofaktoren fehlen oder die Enzyme können inhibiert werden ⁷⁹. Möglicherweise sind auch noch weitere Enzyme an der Neutralisierung der ROS beteiligt ¹⁴⁵.

Dem Transkriptionsfaktor Nrf2 wird eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der antioxidativen Abwehr zugeschrieben ¹³⁹. Er bindet an das *antioxidant response element* (ARE) und aktiviert die Expression antioxidativer Enzyme (u.a. Katalase, SOD, GPx) ¹³⁹. Codiert wird Nrf2 durch das Gen *Nfe2l2*. Obwohl Almeer et al. eine reduzierte *Nfe2l2*-Expression bei *S. mansoni*-infizierten Mäusen beschreiben, nahm in dieser Studie die *Nfe2l2*-Expression bei Infektion zu und stieg mit der hepatischen Eilast der infizierten Tiere an (Abbildung 33, Anhang) ⁶. Dass die *Cat* mRNA trotzdem reduziert war, weist auf ihre Regulation durch weitere Faktoren hin. In Tumorzellen wurde nachgewiesen, dass Nrf2 auch die Enzymexpression von Stoffwechselwegen wie Glykolyse, Pentosephosphatweg und der Fettsäuresynthese beeinflussen kann ⁸⁸. Dadurch trägt es zur Bereitstellung von Substraten für das Tumorwachstum im Sinne des Warburg-Effekts bei ⁸⁸.

Darüber hinaus könnten auch nichtenzymatische Moleküle zum Einsatz kommen. Beispielsweise hat Bilirubin antioxidative Eigenschaften⁹⁵. Cunha et al. beschreiben erniedrigte Bilirubin-Werte bei Patient:innen und vermuten einen Verbrauch des Bilirubins als Antioxidans⁴⁹. Oliveira et al. ermittelten eine reduzierte nichtenzymatische antioxidative Kapazität in infiziertem Lebergewebe, die auf einen erhöhten Verbrauch zurückzuführen sein könnte¹⁵⁰.

Möglicherweise haben die reaktiven Sauerstoffmoleküle einen Nutzen für den Parasiten bzw. den Wirt. In Maßen sind ROS wichtig für die Zell-Kommunikation, -proliferation und -differenzierung²⁰⁷. Im Falle der Schistosomiasis reagiert der Wirt auf die Einwanderung der Eier mit der Freisetzung von ROS durch Immunzellen zur Bekämpfung der Parasiten⁴⁹. ROS fördern gleichzeitig die hepatische Granulombildung³⁹.

Dennoch sind schwere Erkrankungen und Morbidität oft mit hohen ROS-Niveaus verbunden. Beispiele hierfür sind der septische oder hämorrhagische Schock und Reperfusionstraumen¹¹². Die Stimulation von HepG2-Zellen mit SEA führte zu DNA-Schäden, die durch den Einsatz des Antioxidans GSH merklich abgeschwächt wurden³⁰. Auch die Aktivierung des Protoonkogens c-Jun wurde durch GSH reduziert³⁰. Eine Untersuchung humaner Leberproben von HCC-Patient:innen (Hepatitis B-assoziiert) ergab deutlich niedrigere CAT mRNA-Spiegel, verglichen mit tumorfremem Gewebe⁴⁰. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass oxidativer Stress die hepatische Fibrogenese fördern und so zur Entwicklung der periportalen Fibrose beitragen kann¹⁵⁸.

Zusammenfassend wird der oxidative Stress der Leber neben Immunzellen durch den direkten Einfluss der *S. mansoni*-Eier verursacht. Gleichzeitig sinkt Eilast-abhängig die Cat-Expression in infiziertem Hamstergewebe und nach SEA-Stimulation in humanen HepG2-Zellen. Die Eilast scheint diesen antioxidativen Mechanismus zu beeinflussen. Ob die Neutralisierung der ROS durch andere Enzyme oder nicht-enzymatische Moleküle kompensiert wird, bleibt unklar. Auch wenn ROS bis zu einem gewissen Grad nützlich für die Abwehr der Parasiten sind, überwiegen bei hoher ROS-Konzentration dennoch die negativen Folgen für den Wirt.

1.4.5. Fazit

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Ausmaß der hepatischen Akkumulation der *S. mansoni*-Eier die Stärke der Leberschädigung maßgeblich beeinflusst. Abhängig von der hepatischen Eilast wird eine T_H2-Immunantwort, hepatischer Nährstoffmangel mit Umprogrammierung des Hepatozyten-Metabolismus und oxidativer Stress ausgelöst. Zusätzlich beeinflussen und verstärken sich die Reaktionen gegenseitig.

Es handelt sich um ein sehr komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Zelltypen, Antigenen, Zytokinen und anderen Molekülen. Um die vollständigen Hintergründe und Zusammenhänge auf molekularbiologischer Ebene zu erforschen, müssen weitere Versuche im Tiermodell und an isolierten primären Leberzellen angeschlossen werden.

1.4.6. Ausblick

Zur Therapie der Schistosomiasis wird aktuell das Anthelminthikum Praziquantel eingesetzt ²¹¹. Es ist gut gegen die adulten Würmer wirksam und kann in endemischen Gebieten einer jahrelangen Wurmbesiedlung und damit einhergehenden chronischen Verläufen entgegenwirken ¹⁰⁸. Dennoch wächst die Angst vor möglichen Resistenzentwicklungen des breit eingesetzten Medikaments ⁸². Neben der Suche nach einem Impfstoff, ist die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten gegen *S. mansoni* dringend erforderlich ⁸².

Um die Erkenntnisse dieser Arbeit möglicherweise therapeutisch nutzen zu können, müssen zunächst weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Zu überprüfen gilt, ob die Abnahme der T_H2-Immunantwort mit zunehmender Eilast auf andere (Tier-)Modelle übertragbar ist. Interessant wäre, ob der Effekt auch in anderen Stadien der Infektion auftritt. *In vitro* könnte die Abhängigkeit der Zytokinproduktion untersucht werden, indem Immunzellen mit SEA unterschiedlicher Konzentration stimuliert werden. Neue Erkenntnisse könnten zur Entwicklung immunmodulatorischer Pharmaka beitragen.

Um die zugrundeliegenden Vorgänge der metabolischen Umprogrammierung und der antioxidativen Enzyme besser zu verstehen, könnten Knock-Out-Versuche oder Inhibierungsversuche unter Zellkulturbedingungen durchgeführt werden. Möglicherweise kann aufgeklärt werden, ob und wie die Nährstoffaufnahme der *S. mansoni*-Eier unterbunden werden kann. Gegebenenfalls kann so gezielt in die Regulation der Enzymexpression eingegriffen und hepatischer Nährstoffmangel, sowie oxidativer Stress verhindert werden.

Generell könnten die positiven Effekte einer *S. mansoni*-Infektion auch zur Therapie anderer Erkrankungen genutzt werden. Viele klinische Studien beschäftigen sich deshalb mit der Frage nach einem potenziellen therapeutischen Nutzen Schistosomen-assoziiierter Faktoren ⁴².

Zum einen stellt die Suppression der proinflammatorischen T_H1-Immunantwort bzw. die Suppression einer exzessiven T_H2-Antwort durch Schistosomen einen Therapieansatz für Allergien und Autoimmunerkrankungen dar ²⁰⁸. Zu den Krankheitsbildern zählen allergisches Asthma bronchiale, Multiple Sklerose, Typ-1-Diabetes mellitus und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) ²⁰⁸. Erfolgreich war eine klinische

Phase-2a-Studie mit CED-Patient:innen (Morbus Crohn). Durch die subkutane Injektion einer Glutathion-S-Transferase (P28GST) von *S. haematobium* wurde bei geringen Nebenwirkungen ein deutlicher Rückgang der T_H1-Antwort und der Erkrankungsaktivität beobachtet³³.

Zum anderen werden Helminthen-assoziierte Moleküle als Therapeutika gegen das metabolische Syndrom diskutiert¹⁶⁴. Infizierte Patient:innen wiesen reduzierte kardiovaskuläre Risikoprofile auf^{38,50,181,210}. Eine klinische 1b-Studie testet derzeit die Verträglichkeit der Verabreichung von Larven des Hakenwurms *Necator americanus* am Menschen¹⁵⁶. Möglicherweise zählen Faktoren von *S. mansoni* und anderen Parasiten schon bald zu den Therapieoptionen der Wohlstandserkrankungen in der westlichen Welt.

1.4.7. Limitationen

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine explorative Studie, die keine definitive Hypothese prüft. Die Aussagen der Studie basieren auf einer statistischen Beschreibung der Ergebnisse. Die Regressionsanalysen zeigen ausschließlich statistische Abhängigkeiten auf. Ob eine Kausalität gegeben ist, muss weitergehend in mechanistischen Experimenten untersucht werden. Teilweise wurden die Ergebnisse bereits in Zellkulturarbeiten bestätigt (s.1.3.2.3.2).

Für den Großteil der Versuche wurde das Tiermodell Hamster verwendet. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Aussagen dieser Arbeit vollständig auf den humanen Organismus übertragbar sind¹⁷⁶. Zu bedenken ist, dass es sich um eine Infektion immun-naiver Tiere handelt, wohingegen Menschen in endemischen Gebieten meist bereits *in utero* mit dem Parasiten in Kontakt kommen¹⁰⁷. Dennoch liefert die Untersuchung von Tieren wichtige Hinweise über die Pathophysiologie der Infektion¹⁷⁶. Humane Studien finden meist in Form von Querschnitts- oder Interventionsstudien in Endemiegebieten statt¹⁷⁶. Dabei beeinflussen Faktoren wie medizinische Vorgeschichte, Koinfektionen, Ernährungszustand, Herkunft oder Umweltfaktoren die Testergebnisse¹⁷⁶. Die Durchführung randomisierter kontrollierter Studien am Menschen ist nicht möglich; eine bisex Infektion gesunder Proband:innen und die Entnahme von Leberbiopsien zu Forschungszwecken ist ethisch nicht vertretbar¹⁷⁶. Es gibt inzwischen erste Studien mit monosex infizierten Proband:innen¹¹⁰. Jedoch lassen sich die Auswirkungen der parasitären Eier nur durch bisex Infektionen untersuchen¹⁷⁶.

Durch Versuche mit humanen Zelllinien und histologischen Färbungen kann eine mögliche Übertragung der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus überprüft werden.

In die vorliegende Studie eingeschlossen wurden ausschließlich weibliche Hamster. So konnte die Anzahl der Tiere aus ethischen Gründen klein gehalten werden. In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe erfolgte die Untersuchung möglicher geschlechtsspezifischer Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren (unveröffentlichte Daten).

Das untersuchte Gewebe wurde etwa 6,5 Wochen nach Infektion aus den Tieren gewonnen. Dabei handelt es sich um das akute Stadium einer Schistosomiasis kurz nach der Eiablage. Die gewonnenen Ergebnisse können nur Aussagen über diesen Zeitpunkt treffen.

An der Immunantwort, den Stoffwechselwegen und den antioxidativen Reaktionen sind viele verschiedene Moleküle beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurden stellvertretend einzelne Enzyme, Zytokine und Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Analyse weiterer Faktoren kann helfen, die Zusammenhänge noch besser zu verstehen und das Gesamtbild zu komplettieren.

2. Zusammenfassung

Schistosomiasis ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Trematoden der Gattung *Schistosoma spp.* verursacht wird und weltweit mehr als 250 Millionen Menschen betrifft. In den Tropen und Subtropen tritt die Erkrankung endemisch auf. Durch die Erderwärmung und den zunehmenden Tourismus ist eine weitere Ausbreitung zu befürchten. Die Spezies *S. mansoni* befällt den Gastrointestinaltrakt. Dabei gelangen parasitäre Eier in die Leber und schädigen das Leberparenchym. Die Eier induzieren eine T_H2 -Immunantwort mit der Bildung periovulärer Granulome. Gleichzeitig führen Ei-sekretierte Faktoren zu einer Umprogrammierung des hepatischen Metabolismus und der Entstehung oxidativen Stresses.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die Menge der parasitären Eier das Ausmaß der Leberpathologie *S. mansoni*-infizierter Hamster beeinflusst. Es erfolgte die Bestimmung der Eilast in Lebern infizierter Hamster und die Quantifizierung verschiedener Merkmale der Immunreaktion, des hepatischen Stoffwechsels und antioxidativer Mechanismen. Mit Regressionsanalysen wurde untersucht, ob das Ausmaß der Leberschädigung *in vivo* mit der hepatischen Eibelastung zusammenhängt. Eine Bestätigung der Beobachtungen erfolgte *in vitro* an SEA-stimulierten HepG2-Zellen.

Bei der Charakterisierung der hepatischen Immunantwort infizierter Hamster waren sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Zytokine nachweisbar. Überraschenderweise war ein negativer Zusammenhang zwischen den T_H2 -Zytokinen IL-4, bzw. IL-13 und der hepatischen Eilast festzustellen. Die regulativen Zytokine IL-6 und IL-10 wurden vermehrt exprimiert, die *Il6*-Expression nahm mit steigender Eizahl zu. Die Umprogrammierung des Stoffwechsels machte sich durch regulierte Enzyme (GyS, PKM1/2, G6PD, FAS) bemerkbar. Die *Fasn*-Expression und der Glykogengehalt der infizierten Tiere nahmen mit zunehmender Eibelastung ab. Auch die Expression des antioxidativen Enzyms Katalase zeigte eine inverse Abhängigkeit von der Eilast. Die SEA-Stimulation von HepG2-Zellen bestätigte die Ei-abhängige Abnahme der *CAT*-Expression.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die parasitären Eier die Immunantwort, die Umprogrammierung des hepatischen Metabolismus und den oxidativen Stress beeinflussen. Die statistischen Regressionsanalysen legen eine Abhängigkeit der *Il4*- und *Il13*-Expression, des hepatischen Glykogengehalts, der *Fasn*- und der *Cat*-Expression von der hepatischen Eibelastung nahe. Dass die Auswirkungen von SEA auf die *CAT*-Expression der Hepatozyten *in vitro* ohne den Einfluss von Immunzellen

messbar waren, bestätigt diese Vermutung. Die hepatische Eilast beeinflusst demnach das Ausmaß der Leberzellschädigung bei einer *S. mansoni*-Infektion.

3. Summary

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma spp.* and affects more than 250 million people worldwide. The disease is endemic in the tropics and subtropics. Further spread is feared due to global warming and increasing tourism. The species *S. mansoni* mostly affects the gastrointestinal tract. In this, parasitic eggs enter the liver and damage hepatic parenchyma. They induce a Th2 immune response including granuloma formation. At the same time, eggs lead to reprogramming of hepatic metabolism and development of oxidative stress.

In the present work, we examined whether the amount of parasitic eggs affects the extent of liver damage in *S. mansoni* infected hamsters. Determination of the egg load in liver tissue of infected hamsters and quantification of various features of the immune response, hepatic metabolism, and antioxidant mechanisms were performed. Regression analyses were used to investigate whether the extent of liver damage *in vivo* was related to the hepatic egg burden. Confirmation of the observations was made *in vitro* using SEA stimulated HepG2 cells.

In characterizing the hepatic immune response of infected hamsters, both Th1 and Th2 cytokines were detectable. Surprisingly, a negative correlation between Th2 cytokines IL-4 and IL-13, respectively, and hepatic egg load was observed. The regulatory cytokines IL-6 and IL-10 were increased, and *Il6* expression enhanced with increasing egg number. Metabolic reprogramming was reflected by regulation of the enzymes GyS, PKM1/2, G6PD and FAS. *Fasn* expression and glycogen content of infected animals decreased with rising egg load. The expression of the antioxidant enzyme catalase also showed an inverse dependency on hepatic egg load. SEA stimulation of HepG2 cells confirmed the egg-dependent decrease in *CAT* expression.

The results indicate that parasitic eggs affect immune response, reprogramming of hepatic metabolism, and oxidative stress. The statistical regression analysis suggests a dependency of *Il4* and *Il13* expression, hepatic glycogen content, *Fasn* and *Cat* expression on hepatic egg load. The effect of SEA on *CAT* expression in HepG2 cells *in vivo*, without the influence of immune cells, confirms this assumption. The hepatic egg load therefore influences the extent of hepatocellular damage during *S. mansoni* infection.

4. Abkürzungsverzeichnis

AAM	alternativ aktivierte Makrophagen
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ALT	Alanin-Aminotransferase
Aqua dest.	Aqua destillata
ARE	<i>antioxidant response element</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
B _{reg}	regulatorische B-Zellen
bs	bisex
C	Cytosin
CAM	klassisch aktivierte Makrophagen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
C _T	Threshold-Zyklus
CuZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
DCs	dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ESP	Ei-sezernierte Proteine
FAS	Fettsäuresynthase
FBS	filtriertes bovines Serum
FS	Fettsäuren
G	Guanin
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPx	Glutathion-Peroxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GyS	Glykogensynthase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus

HE-Färbung.....	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HK.....	Hexokinase
HSC	hepatische Sternzelle
HSS.....	hepatosplenische Schistosomiasis
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPSE.....	<i>interleukin-4 inducing principle from schistosome eggs</i>
JLU.....	Justus-Liebig-Universität
KOH	Kaliumhydroxid
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LNFP III.....	Lacto-N-Fucopentaose III
MDA.....	Malondialdehyd
M-MLV	Moloney Maus-Leukämie-Virus
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
mRNA	messenger RNA
ms	monosex
NADH/H ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
nT _{reg}	natürliche regulatorische T-Zellen
O ₂ ^{-•}	Superoxidradikalanion
OH [•]	Hydroxylradikal
PAS.....	Periodic Acid Schiff
PBS.....	phosphatgepufferte Salzlösung
PK	Pyruvatkinase
PKM1/2	Pyruvatkinase M1 und 2
qRT-PCR.....	quantitative Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ROX	Carboxy-Rhodamin-X
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SEA.....	lösliche Ei-Antigene
SmCKBP.....	<i>S. mansoni chemokine binding protein</i>

SOD Superoxiddismutase
TAG..... Triacylglyceride
T_{reg} regulatorische T-Zellen
UDG Uracil-DNA Glykosylase
WHO Weltgesundheitsorganisation

5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i>	3
Abbildung 2: Dynamik der Immunantwort nach einer <i>S. mansoni</i> - Infektion.....	6
Abbildung 3: Regulation des hepatischen Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus bei <i>S. mansoni</i> -Infektion.....	12
Abbildung 4: Entstehung und Abbau reaktiver Sauerstoffmoleküle.....	14
Abbildung 5: Die Wirkung von <i>S. mansoni</i> -Eiern auf Leberparenchym und Hepatozyten	17
Abbildung 6: Schistosomen-Eier nach KOH-Verdau unter dem Lichtmikroskop.....	27
Abbildung 7: Exemplarisches Amplifikationsdiagramm einer qRT-PCR des Enzyms FAS.....	34
Abbildung 8: Ablauf einer qRT-PCR mit Temperatur- und Zeitprofil.....	36
Abbildung 9: Prinzip des Glykogen-Assays	40
Abbildung 10: Spektrum der hepatischen Eilast der bisex infizierten Hamsterkohorte	44
Abbildung 11: Gleichmäßige Verteilung der Eier innerhalb eines Leberlappens	45
Abbildung 12: Exponentielle Regression der Eilast und <i>Ipse/α1</i>	46
Abbildung 13: Geeignetes Referenzgen <i>Srsf4</i>	47
Abbildung 14: Ungeeignete Referenzgene <i>Hprt1</i> und <i>Gusb</i>	48
Abbildung 15: Eilast-unabhängige hepatische Expression des T _H 1-Zytokins IFN-γ	49
Abbildung 16: Eilast-abhängige inverse Regression der T _H 2-Zytokine IL-4 und IL-13.	50
Abbildung 17: Eilast-unabhängige hepatische Expression des Zytokins IL-10.....	51
Abbildung 18: Eilast-abhängige hepatische Expression des Zytokins IL-6.....	52
Abbildung 19: Inverse Regression zwischen hepatischer Fettsäuresynthaseexpression und Eilast.....	53
Abbildung 20: Inverse Regression zwischen hepatischem Glykogengehalt und Eilast und Expression der Enzyme GyS, PKM1/2 und G6PD	55
Abbildung 21: Inverse Regression zwischen hepatischer Katalaseexpression und Eilast	56
Abbildung 22: Expression des Enzyms Katalase in HepG2-Zellen	57

Abbildung 23: Graphische Kurzzusammenfassung der Ei-abhängigen hepatischen Stressfaktoren	58
Abbildung 24: Graphische Kurzzusammenfassung des Ei-abhängigen metabolischen Stoffwechsels	59
Abbildung 25: Fehlender Zusammenhang zwischen <i>Srsf4</i> und Eilast.....	102
Abbildung 26: Ungeeignete Referenzgene <i>Actb</i> , <i>Rps18</i> und <i>Tubb</i>	102
Abbildung 27: Geeignetes Referenzgen <i>SRSF4</i>	103
Abbildung 28: Hepatische Expression des T _H 2-Zytokins IL-5	104
Abbildung 29: Regression zwischen <i>Il4</i> - und <i>Ifng</i> -Expression.....	104
Abbildung 30: Keine Regression zwischen Eilast und Expression der Enzyme GyS, PKM und G6PD	105
Abbildung 31: Regression zwischen <i>Il4</i> - und <i>Cat</i> -Expression	105
Abbildung 32: Hepatische Expression der Enzyme SOD1, SOD2 und GPx.....	106
Abbildung 33: Hepatische Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2	106

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide	18
Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 3: Kommerzielle Kits	21
Tabelle 4: Lösungen und Puffer.....	21
Tabelle 5: Zelllinie	21
Tabelle 6: Medien und Zusatzstoffe.....	22
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 8: Geräte.....	23

7. Literaturverzeichnis

- [1] Abdallahi OM, Hanna S, Reggi M de, Gharib B. 1999. Visualization of oxygen radical production in mouse liver in response to infection with *Schistosoma mansoni*. *Liver* 19(6):495–500. doi:10.1111/j.1478-3231.1999.tb00082.x.
- [2] Abdulla M-H, Lim K-C, McKerrow JH, Caffrey CR. 2011. Proteomic identification of IPSE/alpha-1 as a major hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. *PLoS neglected tropical diseases* 5(10):e1368. doi:10.1371/journal.pntd.0001368.
- [3] Acharya S, Da'dara AA, Skelly PJ. 2021. Schistosome immunomodulators. *PLoS pathogens* 17(12):e1010064. doi:10.1371/journal.ppat.1010064.
- [4] Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282(5739):615–6. doi:10.1038/282615a0.
- [5] Ahmed SA, Gad MZ. 1995. Effect of schistosomal infection and its treatment on some key enzymes of glucose metabolism in mice livers. *Arzneimittel-Forschung* 45(12):1324–8.
- [6] Almeer RS, El-Khadragy MF, Abdelhabib S, Abdel Moneim AE. 2018. *Ziziphus spina-christi* leaf extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma, fibrosis, and oxidative stress through *downregulation of fibrinogenic signaling in mice*. *PloS one* 13(10):e0204923. doi:10.1371/journal.pone.0204923.
- [7] Alquraishi M, Puckett DL, Alani DS, Humidat AS, Frankel VD, Donohoe DR, Whelan J, Bettaieb A. 2019. Pyruvate kinase M2: A simple molecule with complex functions. *Free radical biology & medicine* 143:176–92. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.007.
- [8] Alves Oliveira LF, Moreno EC, Gazzinelli G, Martins-Filho OA, Silveira AMS, Gazzinelli A, Malaquias LCC, LoVerde P, Leite PM, Correa-Oliveira R. 2006. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. *Infection and Immunity* 74(2):1215–21. doi:10.1128/IAI.74.2.1215-1221.2006.
- [9] Amaral ACdC, Aguiar LAK de, Souza MRdA, Toledo CF de, Borges DR. 2002. Elevação da gamma-glutamyltransferase sérica na hepatopatia esquistossomótica não se correlaciona com a carga parasitária e precede alterações ultra-sonográficas. *Arquivos de gastroenterologia* 39(1):27–31. doi:10.1590/s0004-28032002000100006.
- [10] Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64(15):5245–50. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- [11] Andrade ZA. 2004. Schistosomal hepatopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(5 Suppl 1):51–7. doi:10.1590/s0074-02762004000900009.
- [12] Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Solé D, Carvalho EM. 2000. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *International archives of allergy and immunology* 123(2):145–8. doi:10.1159/000024433.
- [13] Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA. 2001. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology* 122(03):329–38. doi:10.1017/s0031182001007351.

- [14] Axmann MC. 1947. Morphological studies on glycogen deposition in schistosomes and other flukes. *Journal of morphology* 80(3):321–43. doi:10.1002/jmor.1050800303.
- [15] Bärenbold O, Garba A, Colley DG, Fleming FM, Assaré RK, Tukahebwa EM, Kebede B, Coulibaly JT, N'Goran EK, Tchuem Tchuente L-A, Mwinzi P, Utzinger J, Vounatsou P. 2021. Estimating true prevalence of *Schistosoma mansoni* from population summary measures based on the Kato-Katz diagnostic technique. *PLoS neglected tropical diseases* 15(4):e0009310. doi:10.1371/journal.pntd.0009310.
- [16] Barron L, Wynn TA. 2011. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *European journal of immunology* 41(9):2509–14. doi:10.1002/eji.201141869.
- [17] Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. 2013. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. *Journal of advanced research* 4(5):433–44. doi:10.1016/j.jare.2013.01.005.
- [18] Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström M-L. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* 59(6):566–73. doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01440.x.
- [19] Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. 2006. Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 176(9):5374–87. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5374.
- [20] Bedard K, Krause K-H. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87(1):245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
- [21] Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. 1994. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology (Baltimore, Md.)* 19(5):1262–71.
- [22] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM. 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460(7253):352–8. doi:10.1038/nature08160.
- [23] Bexkens ML, Mebius MM, Houweling M, Brouwers JF, Tielens AGM, van Hellemond JJ. 2019. *Schistosoma mansoni* does not and cannot oxidise fatty acids, but these are used for biosynthetic purposes instead. *International journal for parasitology* 49(8):647–56. doi:10.1016/j.ijpara.2019.03.005.
- [24] Bhargava P, Li C, Stanya KJ, Jacobi D, Dai L, Liu S, Gangl MR, Harn DA, Lee C-H. 2012. Immunomodulatory glycan LNFP III alleviates hepatosteatosis and

- insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nature medicine* 18(11):1665–72. doi:10.1038/nm.2962.
- [25] Bio-Rad. iScript™ cDNA Synthesis Kit. Abrufbar unter: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228.pdf>. Letzter Zugriff am 21.01.2023.
- [26] Bittner S. 2006. When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino acids* 30(3):205–24. doi:10.1007/s00726-005-0298-2.
- [27] Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ileri E, Kazibwe F, Kemijumbi J, Kariuki C, Kimani G, Ouma JH, Kabatereine NB, Vennervald BJ, Dunne DW. 2004. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 172(2):1295–303. doi:10.4049/jimmunol.172.2.1295.
- [28] Brandt CT, Rino M, Da Pitta MGR, Muniz JS, Silveira DdO, Castro CMMB de. 2010. Evaluation of the cytokines IL-10 and IL-13 as mediators in the progression of Symmers fibrosis in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 37(5):333–7. doi:10.1590/S0100-69912010000500005.
- [29] Brouwers JF, Smeenk IM, van Golde LM, Tielens AG. 1997. The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88(1-2):175–85. doi:10.1016/s0166-6851(97)00091-1.
- [30] Bülow V von, Gindner S, Baier A, Hehr L, Buss N, Russ L, Wrobel S, Wirth V, Tabatabai K, Quack T, Haerberlein S, Kadesch P, Gerbig S, Wiedemann KR, Spengler B, Mehl A, Morlock G, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Falcone FH, Wilson RA, Bankov K, Wild P, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. 2023. Metabolic reprogramming of hepatocytes by *Schistosoma mansoni* eggs. *JHEP Reports* 5(2):100625. doi:10.1016/j.jhepr.2022.100625.
- [31] Bülow V von, Lichtenberger J, Grevelding CG, Falcone FH, Roeb E, Roderfeld M. 2021. Does *Schistosoma Mansoni* Facilitate Carcinogenesis? *Cells* 10(8):1982. doi:10.3390/cells10081982.
- [32] Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology* 31(4):163–76. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x.
- [33] Capron M, Béghin L, Leclercq C, Labreuche J, Dendooven A, Standaert A, Delbeke M, Porcherie A, Nachury M, Boruchowicz A, Dupas J-L, Fumery M, Paupard T, Catteau S, Deplanque D, Colombel J-F, Desreumaux P. 2019. Safety of P28GST, a Protein Derived from a Schistosome Helminth Parasite, in Patients with Crohn's Disease: A Pilot Study (ACROHNEM). *Journal of clinical medicine* 9(1). doi:10.3390/jcm9010041.
- [34] Carson JP, Ramm GA, Robinson MW, McManus DP, Gobert GN. 2018. Schistosome-Induced Fibrotic Disease: The Role of Hepatic Stellate Cells. *Trends in parasitology* 34(6):524–40. doi:10.1016/j.pt.2018.02.005.
- [35] Cheever AW. 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization* 39(2):328–31.

- [36] Cheever AW. 1970. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bulletin of the World Health Organization* 43(4):601–3.
- [37] Cheever AW, Macedonia JG, Mosimann JE, Cheever EA. 1994. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50(3):281–95. doi:10.4269/ajtmh.1994.50.281.
- [38] Chen Y, Lu J, Huang Y, Wang T, Xu Y, Xu M, Li M, Wang W, Li D, Bi Y, Ning G. 2013. Association of previous schistosome infection with diabetes and metabolic syndrome: a cross-sectional study in rural China. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98(2):E283-7. doi:10.1210/jc.2012-2517.
- [39] Chensue SW, Quinlan L, Higashi GI, Kunkel SL. 1984. Role of oxygen reactive species in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *Biochemical and biophysical research communications* 122(1):184–90. doi:10.1016/0006-291X(84)90457-1.
- [40] Cho M-Y, Cheong JY, Lim W, Jo S, Lee Y, Wang H-J, Han K-H, Cho H. 2014. Prognostic significance of catalase expression and its regulatory effects on hepatitis B virus X protein (HBx) in HBV-related advanced hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 5(23):12233–46. doi:10.18632/oncotarget.2625.
- [41] Chomarat P, Sipowicz MA, Diwan BA, Fornwald LW, Awasthi YC, Anver MR, Rice JM, Anderson LM, Wild CP. 1997. Distinct time courses of increase in cytochromes P450 1A2, 2A5 and glutathione S-transferases during the progressive hepatitis associated with *Helicobacter hepaticus*. *Carcinogenesis* 18(11):2179–90. doi:10.1093/carcin/18.11.2179.
- [42] Cleenewerk L, Garssen J, Hogenkamp A. 2020. Clinical Use of *Schistosoma mansoni* Antigens as Novel Immunotherapies for Autoimmune Disorders. *Frontiers in immunology* 11:1821. doi:10.3389/fimmu.2020.01821.
- [43] Colley DG, Andros TS, Campbell CH. 2017. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? *Infectious diseases of poverty* 6(1):63. doi:10.1186/s40249-017-0275-5.
- [44] Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. 2014. Human schistosomiasis. *The Lancet* 383(9936):2253–64. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
- [45] Congiu M, Slavin JL, Desmond PV. 2011. Expression of common housekeeping genes is affected by disease in human hepatitis C virus-infected liver. *Liver international official journal of the International Association for the Study of the Liver* 31(3):386–90. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02374.x.
- [46] Cortes-Selva D, Elvington AF, Ready A, Rajwa B, Pearce EJ, Randolph GJ, Fairfax KC. 2018. *Schistosoma mansoni* Infection-Induced Transcriptional Changes in Hepatic Macrophage Metabolism Correlate With an Athero-Protective Phenotype. *Frontiers in immunology* 9:2580. doi:10.3389/fimmu.2018.02580.
- [47] Cortes-Selva D, Gibbs L, Maschek JA, Nascimento M, van Ry T, Cox JE, Amiel E, Fairfax KC. 2021. Metabolic reprogramming of the myeloid lineage by *Schistosoma mansoni* infection persists independently of antigen exposure. *PLoS pathogens* 17(1):e1009198. doi:10.1371/journal.ppat.1009198.
- [48] Costain AH, MacDonald AS, Smits HH. 2018. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Frontiers in immunology* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.03042.

- [49] Cunha GMM, Silva VMA, Bessa KDG, Bitencourt MAO, Macêdo UBO, Freire-Neto FP, Martins RR, Assis CF, Lemos TMAM, Almeida MG, Freire ACG. 2012. Levels of oxidative stress markers: correlation with hepatic function and worm burden patients with schistosomiasis. *Acta parasitologica* 57(2):160–6. doi:10.2478/s11686-012-0026-5.
- [50] Da Martins Fonseca CS, Pimenta Filho AA, dos Santos BS, da Silva CA, Domingues ALC, Owen JS, Lima VLdM. 2014. Human plasma lipid modulation in schistosomiasis mansoni depends on apolipoprotein E polymorphism. *PLoS one* 9(7):e101964. doi:10.1371/journal.pone.0101964.
- [51] Dalton JP, Day SR, Drew AC, Brindley PJ. 1997. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. *Parasitology* 115 (Pt 1):29–32. doi:10.1017/s0031182097001091.
- [52] Dessein AJ, Hillaire D, Elwali NE, Marquet S, Mohamed-Ali Q, Mirghani A, Henri S, Abdelhameed AA, Saeed OK, Magzoub MM, Abel L. 1999. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *American Journal of Human Genetics* 65(3):709–21. doi:10.1086/302526.
- [53] deWalick S, Tielens AGM, van Hellemond JJ. 2012. *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Experimental Parasitology* 132(1):7–13. doi:10.1016/j.exppara.2011.07.018.
- [54] Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37(1):112-4, 116, 118-9. doi:10.2144/04371RR03.
- [55] Doenhoff MJ, Stanley RG, Griffiths K, Jackson CL. 2002. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology* 125(Pt 5):415–21. doi:10.1017/S0031182002002275.
- [56] Doherty JF, Moody AH, Wright SG. 1996. Katayama fever: an acute manifestation of schistosomiasis. *BMJ British Medical Journal* 313(7064):1071–2. doi:10.1136/bmj.313.7064.1071.
- [57] Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. 2015. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1250:77–93. doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_5.
- [58] Đorđević V, Stanković Đorđević D, Kocić B, Dinić M, Sokolović D, Pešić Stanković J. 2021. The Impact of Hepatitis C Virus Genotypes on Oxidative Stress Markers and Catalase Activity. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2021:6676057. doi:10.1155/2021/6676057.
- [59] Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. 2012. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of fluorescence* 22(4):1189–99. doi:10.1007/s10895-012-1059-8.
- [60] Elbaz T, Esmat G. 2013. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *Journal of advanced research* 4(5):445–52. doi:10.1016/j.jare.2012.12.001.
- [61] Elsammak MY, Al-Sharkaweey RM, Ragab MS, Amin GA, Kandil MH. 2008. IL-4 and reactive oxygen species are elevated in Egyptian patients affected with schistosomal liver disease. *Parasite immunology* 30(11-12):603–9. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01061.x.

- [62] Engels D, Zhou X-N. 2020. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious diseases of poverty* 9(1):10. doi:10.1186/s40249-020-0630-9.
- [63] Esser K-H, Marx WH, Lisowsky T. 2006. maxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods* 3(1):i-ii.
- [64] European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. Communicable disease threats report, 5-11 July 2015, week 28. Abrufbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/communicable-disease-threats-report-5-11-july-2015-week-28>. Letzter Zugriff am 06.11.2022.
- [65] Everts B, Hussaarts L, Driessen NN, Meevissen MHJ, Schramm G, van der Ham AJ, van der Hoeven B, Scholzen T, Burgdorf S, Mohrs M, Pearce EJ, Hokke CH, Haas H, Smits HH, Yazdanbakhsh M. 2012. *Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor*. *The Journal of experimental medicine* 209(10):1753-67, S1. doi:10.1084/jem.20111381.
- [66] Ezeamama AE, Friedman JF, Acosta LP, BELLINGER DC, Langdon GC, Manalo DL, Olveda RM, Kurtis JD, McGarvey ST. 2005. Helminth infection and cognitive impairment among Filipino children. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 72(5):540-8.
- [67] Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Correa-Oliveira R. 1998. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite immunology* 20(10):447-54. doi:10.1046/j.1365-3024.1998.00166.x.
- [68] Falcone FH, Dahinden CA, Gibbs BF, Noll T, Amon U, Hebestreit H, Abrahamsen O, Klaucke J, Schlaak M, Haas H. 1996. Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *European journal of immunology* 26(5):1147-55. doi:10.1002/eji.1830260528.
- [69] Fäldt J, Wernstedt I, Fitzgerald SM, Wallenius K, Bergström G, Jansson J-O. 2004. Reduced exercise endurance in interleukin-6-deficient mice. *Endocrinology* 145(6):2680-6. doi:10.1210/en.2003-1319.
- [70] Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. 2000. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 164(5):2585-91. doi:10.4049/jimmunol.164.5.2585.
- [71] Fallon PG, Smith P, Dunne DW. 1998. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *European journal of immunology* 28(4):1408-16. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199804)28:04<1408:AID-IMMU1408>3.0.CO;2-H.
- [72] Fan PC, Kang YC. 2003. Egg production capacity of one-pair worms of *Schistosoma japonicum* in albino mice. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 34(4):708-12.
- [73] Fazel Modares N, Polz R, Haghghi F, Lamertz L, Behnke K, Zhuang Y, Kordes C, Häussinger D, Sorg UR, Pfeffer K, Floss DM, Moll JM, Piekorz RP, Ahmadian MR, Lang PA, Scheller J. 2019. IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 70(6):2075-91. doi:10.1002/hep.30774.
- [74] Ferru I, Roye O, Delacre M, Auriault C, Wolowczuk I. 1998. Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Schistosoma mansoni*: demonstration of the

- participation of B cells in granuloma modulation. *Scandinavian journal of immunology* 48(3):233–40. doi:10.1046/j.1365-3083.1998.00376.x.
- [75] Filomeni G, Zio D de, Cecconi F. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation* 22(3):377–88. doi:10.1038/cdd.2014.150.
- [76] Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal biotechnology* 9(1):67–78. doi:10.1080/10495399809525893.
- [77] Friedman JF, Kanzaria HK, Acosta LP, Langdon GC, Manalo DL, Wu H, Olveda RM, McGarvey ST, Kurtis JD. 2005. Relationship between *Schistosoma japonicum* and nutritional status among children and young adults in Leyte, the Philippines. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 72(5):527–33.
- [78] Fulford AJ, Butterworth AE, Ouma JH, Sturrock RF. 1995. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. *Parasitology* 110 (Pt 3):307–16. doi:10.1017/s0031182000080896.
- [79] Gharib B, Abdollahi OMS, Dessein H, Reggi M de. 1999. Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of hepatology* 30(4):594–602. doi:10.1016/s0168-8278(99)80189-5.
- [80] Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. 2002. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57(9):765–70. doi:10.1136/thorax.57.9.765.
- [81] Glauert AM, Butterworth AE, Sturrock RF, Houba V. 1978. The mechanism of antibody-dependent, eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro: a study by phase-contrast and electron microscopy. *Journal of cell science* 34:173–92. doi:10.1242/jcs.34.1.173.
- [82] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet* 368(9541):1106–18. doi:10.1016/S0140-6736(06)69440-3.
- [83] Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 146(4):1322–7.
- [84] Haas LF. 1997. Theodor Bilharz (1825-62). *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 63(6):718. doi:10.1136/jnnp.63.6.718.
- [85] Haerberlein S, Obieglo K, Ozir-Fazalalikhani A, Chayé MAM, Veninga H, van der Vlugt LEPM, Voskamp A, Boon L, Haan JMM den, Westerhof LB, Wilbers RHP, Schots A, Schramm G, Hokke CH, Smits HH. 2017. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. *PLoS pathogens* 13(7):e1006539. doi:10.1371/journal.ppat.1006539.
- [86] Hams E, Aviello G, Fallon PG. 2013. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Frontiers in immunology* 4:89. doi:10.3389/fimmu.2013.00089.
- [87] Harvie M, Jordan TW, La Flamme AC. 2007. Differential liver protein expression during schistosomiasis. *Infection and Immunity* 75(2):736–44. doi:10.1128/IAI.01048-06.

- [88] He F, Antonucci L, Karin M. 2020. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis* 41(4):405–16. doi:10.1093/carcin/bgaa039.
- [89] Hendriks-Balk MC, Michel MC, Alewijnse AE. 2007. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic research in cardiology* 102(3):195–7. doi:10.1007/s00395-007-0649-0.
- [90] Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F. 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20(5):623–35. doi:10.1016/s1074-7613(04)00107-4.
- [91] Hernandez HJ, Wang Y, Stadecker MJ. 1997. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 158(10):4832–7.
- [92] Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. 2000. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 164(12):6406–16. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6406.
- [93] Hurdal R, Ndlovu HH, Revaz-Breton M, Parihar SP, Nono JK, Govender M, Brombacher F. 2017. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2-controlled diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(40):E8430-E8439. doi:10.1073/pnas.1708125114.
- [94] Husaarts L, García-Tardón N, van Beek L, Heemskerk MM, Haerberlein S, van der Zon GC, Ozir-Fazalikhah A, Berbé JFP, van Willems Dijk K, van Harmelen V, Yazdanbakhsh M, Guigas B. 2015. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *The FASEB Journal* 29(7):3027–39. doi:10.1096/fj.14-266239.
- [95] Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y. 2016. Bilirubin as an important physiological modulator of oxidative stress and chronic inflammation in metabolic syndrome and diabetes: a new aspect on old molecule. *Diabetology international* 7(4):338–41. doi:10.1007/s13340-016-0288-5.
- [96] Jenkins SJ, Mountford AP. 2005. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. *Infection and Immunity* 73(1):395–402. doi:10.1128/IAI.73.1.395-402.2005.
- [97] Jesus AR de, Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, Jesus AA de, Silva A, Santana LB, Pearce E, Carvalho EM. 2004. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity* 72(6):3391–7. doi:10.1128/IAI.72.6.3391-3397.2004.
- [98] Jin S, White E. 2007. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3(1):28–31. doi:10.4161/auto.3269.
- [99] Jong EC. 2012. Schistosomiasis, in: Jong EC, Stevens DL (Hrsg.), *Netter's Infectious diseases*, Philadelphia: Elsevier/Saunders:516–21. doi:10.1016/B978-1-4377-0126-5.00085-9.

- [100] Karanja DM, Colley DG, Nahlen BL, Ouma JH, Secor WE. 1997. Studies on schistosomiasis in western Kenya: I. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 56(5):515–21. doi:10.4269/ajtmh.1997.56.515.
- [101] Kaur I, Schramm G, Everts B, Scholzen T, Kindle KB, Beetz C, Montiel-Duarte C, Blindow S, Jones AT, Haas H, Stolnik S, Heery DM, Falcone FH. 2011. Interleukin-4-inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs contains a functional C-terminal nuclear localization signal necessary for nuclear translocation in mammalian cells but not for its uptake. *Infection and Immunity* 79(4):1779–88. doi:10.1128/IAI.01048-10.
- [102] Kawanaka M, Hayashi S, Carter CE. 1986. Uptake and excretion of amino acids and utilization of glucose by *Schistosoma japonicum* eggs. *Japanese journal of medical science & biology* 39(5-6):199–206. doi:10.7883/yoken1952.39.199.
- [103] Kawanaka M, Hayashi S, Ohtomo H. 1983. Nutritional requirements of *Schistosoma japonicum* eggs. *The Journal of Parasitology* 69(5):857–61.
- [104] Kibbe WA. 2007. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. Abrufbar unter: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Letzter Zugriff am 19.10.2022.
- [105] King CH. 2010. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. *Acta tropica* 113(2):95–104. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.012.
- [106] King CH, Dangerfield-Cha M. 2008. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic illness* 4(1):65–79. doi:10.1177/1742395307084407.
- [107] King CL, Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW. 1998. B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 160(7):3578–84.
- [108] Kokaliaris C, Garba A, Matuska M, Bronzan RN, Colley DG, Dorkenoo AM, Ekpo UF, Fleming FM, French MD, Kabore A, Mbonigaba JB, Midzi N, Mwinzi PNM, N'Goran EK, Polo MR, Sacko M, Tchuem Tchuente L-A, Tukahebwa EM, Uvon PA, Yang G, Wiesner L, Zhang Y, Utzinger J, Vounatsou P. 2022. Effect of preventive chemotherapy with praziquantel on schistosomiasis among school-aged children in sub-Saharan Africa: a spatiotemporal modelling study. *The Lancet. Infectious Diseases* 22(1):136–49. doi:10.1016/S1473-3099(21)00090-6.
- [109] Kolářová L, Horák P, Skírnisson K, Marečková H, Doenhoff M. 2013. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clinical reviews in allergy & immunology* 45(1):63–74. doi:10.1007/s12016-012-8334-y.
- [110] Koopman JPR, Driciru E, Roestenberg M. 2021. Controlled human infection models to evaluate schistosomiasis and hookworm vaccines: where are we now? *Expert review of vaccines* 20(11):1369–71. doi:10.1080/14760584.2021.1951244.
- [111] La Flamme AC, MacDonald AS, Pearce EJ. 2000. Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 164(5):2419–26. doi:10.4049/jimmunol.164.5.2419.
- [112] La Flamme AC, Patton EA, Bauman B, Pearce EJ. 2001. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 166(3):1903–11. doi:10.4049/jimmunol.166.3.1903.

- [113] Lang G. 2013. Histologische Färbung, in: Lang G (Hrsg.), *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 2. Aufl., Wien: Springer Verlag:169–250. doi:10.1007/978-3-7091-1190-1_10.
- [114] Leite LAC, Pimenta Filho AA, Da Martins Fonseca CS, Santana dos Santos B, Ferreira RdCdS, Montenegro SML, Lopes EP, Domingues ALC, Owen JS, Lima VLdM. 2013. Hemostatic dysfunction is increased in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni and advanced periportal fibrosis. *PLoS neglected tropical diseases* 7(7):e2314. doi:10.1371/journal.pntd.0002314.
- [115] Leo GA de, Stensgaard A-S, Sokolow SH, N’Goran EK, Chamberlin AJ, Yang G-J, Utzinger J. 2020. Schistosomiasis and climate change. *BMJ*:m4324. doi:10.1136/bmj.m4324.
- [116] Leptak CL, McKerrow JH. 1997. Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 158(1):301–7. doi:10.4049/jimmunol.158.1.301.
- [117] Lewert RM, Para J, Ozcel MA. 1970. Miracidial Uptake of Glucose in Intact Eggs of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 56(6):1250. doi:10.2307/3277577.
- [118] Linder E. 2017. The Schistosome Egg in Transit. *Annals of Clinical Pathology* 5(3):1110.
- [119] Liu J-Y, Li L-Y, Yang X-Z, Li J, Zhong G, Wang J, Li L-J, Ji B, Wu Z-Q, Liu H, Yang X, Liu P-M. 2011. Adoptive transfer of dendritic cells isolated from helminth-infected mice enhanced T regulatory cell responses in airway allergic inflammation. *Parasite immunology* 33(10):525–34. doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01308.x.
- [120] Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4):402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [121] Lo NC, Bezerra FSM, Colley DG, Fleming FM, Homeida M, Kabatereine N, Kabole FM, King CH, Mafe MA, Midzi N, Mutapi F, Mwanga JR, Ramzy RMR, Satrija F, Stothard JR, Traoré MS, Webster JP, Utzinger J, Zhou X-N, Danso-Appiah A, Eusebi P, Loker ES, Obonyo CO, Quansah R, Liang S, Vaillant M, Murad MH, Hagan P, Garba A. 2022. Review of 2022 WHO guidelines on the control and elimination of schistosomiasis. *The Lancet. Infectious Diseases* 22(11):e327-e335. doi:10.1016/S1473-3099(22)00221-3.
- [122] Löffler G, Graeve L. 2022. Lipogenese und Lipolyse – Bildung und Verwertung der Fettspeicher, in: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, et al. (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 10. Aufl., Berlin/Heidelberg: Springer Verlag:337–62. doi:10.1007/978-3-662-60266-9_21.
- [123] Löffler G, Müller M. 2022. Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren und Nucleotide – Bausteine des Lebens, in: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, et al. (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 10. Aufl., Berlin/Heidelberg: Springer Verlag:33–65. doi:10.1007/978-3-662-60266-9_3.
- [124] Lundy SK, Lerman SP, Boros DL. 2001. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL(+) T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity* 69(1):271–80. doi:10.1128/IAI.69.1.271-280.2001.

- [125] Lundy SK, Lukacs NW. 2013. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in immunology* 4:39. doi:10.3389/fimmu.2013.00039.
- [126] Lunt SY, Vander Heiden MG. 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology* 27:441–64. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
- [127] MacDonald AS, Straw AD, Dalton NM, Pearce EJ. 2002. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 168(2):537–40. doi:10.4049/jimmunol.168.2.537.
- [128] Magzoub M, Adam SE. 1974. Experimental infection and hepatic changes in mice infested with *Schistosoma mansoni* (Sudan strain). *The Journal of pathology* 113(1):47–52. doi:10.1002/path.1711130106.
- [129] Maizels RM. 2005. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. *Current opinion in immunology* 17(6):656–61. doi:10.1016/j.coi.2005.09.001.
- [130] Mathew RC, Boros DL. 1986. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity* 54(3):820–6. doi:10.1128/iai.54.3.820-826.1986.
- [131] Mathieson W, Wilson RA. 2010. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *International journal for parasitology* 40(5):617–28. doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.014.
- [132] McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. 2019. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annual review of immunology* 37:457–95. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055318.
- [133] Meevissen MHJ, Driessen NN, Smits HH, Versteegh R, van Vliet SJ, van Kooyk Y, Schramm G, Deelder AM, Haas H, Yazdanbakhsh M, Hokke CH. 2012. Specific glycan elements determine differential binding of individual egg glycoproteins of the human parasite *Schistosoma mansoni* by host C-type lectin receptors. *International journal for parasitology* 42(3):269–77. doi:10.1016/j.ijpara.2012.01.004.
- [134] Miao J, Wang J, Robl N, Guo H, Song S, Peng Y, Wang Y, Huang S, Li X. 2020. Validation of Stable Housekeeping Genes for Quantitative Real Time PCR in Golden Syrian Hamster. *Indian Journal of Animal Research(Of)*. doi:10.18805/IJAR.B-1237.
- [135] Moore DV, Sandground JH. 1956. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 5(5):831–40. doi:10.4269/ajtmh.1956.5.831.
- [136] Morais CNL de, Carvalho BdM, Melo WG de, Melo FL de, Lopes EPdA, Domingues ALC, Jucá N, Martins JRM, Diniz GTN, Montenegro SML. 2010. Correlation of biological serum markers with the degree of hepatic fibrosis and necroinflammatory activity in hepatitis C and schistosomiasis patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(4):460–6. doi:10.1590/s0074-02762010000400018.
- [137] Moser C, Gatto P, Moser M, Pindo M, Velasco R. 2004. Isolation of Functional RNA From Small Amounts of Different Grape and Apple Tissues. *Molecular biotechnology* 26(2):95–100. doi:10.1385/MB:26:2:95.

- [138] Mouser EE, Pollakis G, Smits HH, Thomas J, Yazdanbakhsh M, Jong EC de, Paxton WA. 2019. Schistosoma mansoni soluble egg antigen (SEA) and recombinant Omega-1 modulate induced CD4+ T-lymphocyte responses and HIV-1 infection in vitro. *PLoS pathogens* 15(9):e1007924. doi:10.1371/journal.ppat.1007924.
- [139] Mu S, Yang W, Huang G. 2021. Antioxidant activities and mechanisms of polysaccharides. *Chemical biology & drug design* 97(3):628–32. doi:10.1111/cbdd.13798.
- [140] Mueller SN, Ahmed R. 2009. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(21):8623–8. doi:10.1073/pnas.0809818106.
- [141] Mulindwa J, Namulondo J, Kitibwa A, Nassuuna J, Nyangiri OA, Kimuda MP, Boobo A, Nerima B, Busingye F, Candia R, Namukuta A, Ssenyonga R, Ukumu N, Ajal P, Adriko M, Noyes H, Dood CJ de, Corstjens PLAM, van Dam GJ, Elliott AM, Matovu E. 2022. High prevalence of Schistosoma mansoni infection and stunting among school age children in communities along the Albert-Nile, Northern Uganda: A cross sectional study. *PLoS neglected tropical diseases* 16(7):e0010570. doi:10.1371/journal.pntd.0010570.
- [142] Müller M, Löffler G. 2022. Glucose – Schlüsselmolekül des Kohlenhydratstoffwechsels, in: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, et al. (Hrsg.), Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 10. Aufl., Berlin/Heidelberg: Springer Verlag:241–60. doi:10.1007/978-3-662-60266-9_14.
- [143] Mutengo MM, Mduluzi T, Kelly P, Mwansa JCL, Kwenda G, Musonda P, Chipeta J. 2018. Low IL-6, IL-10, and TNF- α and High IL-13 Cytokine Levels Are Associated with Severe Hepatic Fibrosis in Schistosoma mansoni Chronically Exposed Individuals. *Journal of Parasitology Research* 2018:9754060. doi:10.1155/2018/9754060.
- [144] Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford AJ, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW. 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 160(4):1992–9. doi:10.4049/jimmunol.160.4.1992.
- [145] Nathan C, Cunningham-Bussell A. 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature reviews. Immunology* 13(5):349–61. doi:10.1038/nri3423.
- [146] Nation CS, Da'dara AA, Marchant JK, Skelly PJ. 2020. Schistosome migration in the definitive host. *PLoS neglected tropical diseases* 14(4):e0007951. doi:10.1371/journal.pntd.0007951.
- [147] National Center for Biotechnology Information. 2022. Datenbank für Nukleotide. Abrufbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. Letzter Zugriff am 19.10.2022.
- [148] Ni Y, Xu Z, Li C, Zhu Y, Liu R, Zhang F, Chang H, Li M, Sheng L, Li Z, Hou M, Chen L, You H, McManus DP, Hu W, Duan Y, Liu Y, Ji M. 2021. Therapeutic inhibition of miR-802 protects against obesity through AMPK-mediated regulation of hepatic lipid metabolism. *Theranostics* 11(3):1079–99. doi:10.7150/thno.49354.

- [149] Nyan OA, Walraven GE, Banya WA, Milligan P, van der Sande M, Ceesay SM, Del Prete G, McAdam KP. 2001. Atopy, intestinal helminth infection and total serum IgE in rural and urban adult Gambian communities. *Clinical and experimental allergy journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 31(11):1672–8. doi:10.1046/j.1365-2222.2001.00987.x.
- [150] Oliveira RB de, Senger MR, Vasques LM, Gasparotto J, dos Santos JPA, Pasquali MAdB, Moreira JCF, Silva FP, Gelain DP. 2013. *Schistosoma mansoni* infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and tau levels in multiple organs in mice. *International journal for parasitology* 43(5):371–9. doi:10.1016/j.ijpara.2012.12.006.
- [151] Oliveira Fraga LA de, Torrero MN, Tocheva AS, Mitre E, Davies SJ. 2010. Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. *The Journal of infectious diseases* 201(3):464–72. doi:10.1086/649841.
- [152] Park S-H, Reherrmann B. 2014. Immune Responses to HCV and Other Hepatitis Viruses. *Immunity* 40(1):13–24. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.010.
- [153] Pascal M, Abdallahi OM, Elwali N-EM, Mergani A, Qurashi M-A, Magzoub M, Reggi M de, Gharib B. 2000. Hyaluronate levels and markers of oxidative stress in the serum of Sudanese subjects at risk of infection with *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94(1):66–70. doi:10.1016/s0035-9203(00)90443-7.
- [154] Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. 2009. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS pathogens* 5(4):e1000371. doi:10.1371/journal.ppat.1000371.
- [155] Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26(6):509–15. doi:10.1023/b:bile.0000019559.84305.47.
- [156] Pierce D, Merone L, Lewis C, Rahman T, Croese J, Loukas A, McDonald M, Giacomini P, McDermott R. 2019. Safety and tolerability of experimental hookworm infection in humans with metabolic disease: study protocol for a phase 1b randomised controlled clinical trial. *BMC endocrine disorders* 19(1):136. doi:10.1186/s12902-019-0461-5.
- [157] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017:8416763. doi:10.1155/2017/8416763.
- [158] Poli G, Parola M. 1997. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free radical biology & medicine* 22(1-2):287–305. doi:10.1016/s0891-5849(96)00327-9.
- [159] Prata A. 1992. Influence of the host related factors in the development of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 Suppl 4:39–44. doi:10.1590/s0074-02761992000800005.
- [160] Qiagen. 2019. RNeasy® Mini Handbook. Abrufbar unter: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>. Letzter Zugriff am 21.01.2023.
- [161] Qian X-Y, Ding W-M, Chen Q-Q, Zhang X, Jiang W-Q, Sun F-F, Li X-Y, Yang X-Y, Pan W. 2020. The Metabolic Reprogramming Profiles in the Liver Fibrosis of Mice Infected with *Schistosoma japonicum*. *Inflammation* 43(2):731–43. doi:10.1007/s10753-019-01160-5.

- [162] Reichling JJ, Kaplan MM. 1988. Clinical use of serum enzymes in liver disease. *Digestive diseases and sciences* 33(12):1601–14. doi:10.1007/BF01535953.
- [163] Reinard T. 2018. *Molekularbiologische Methoden 2.0*, 2. Aufl., Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- [164] Rennie C, Fernandez R, Donnelly S, McGrath KC. 2021. The Impact of Helminth Infection on the Incidence of Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Endocrinology* 12:728396. doi:10.3389/fendo.2021.728396.
- [165] Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. 2014. Glutathione and mitochondria. *Frontiers in pharmacology* 5:151. doi:10.3389/fphar.2014.00151.
- [166] Roderfeld M, Padem S, Lichtenberger J, Quack T, Weiskirchen R, Longerich T, Schramm G, Churin Y, Irunbam K, Tschuschner A, Windhorst A, Grevelding CG, Roeb E. 2020. Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 72(2):626–41. doi:10.1002/hep.30192.
- [167] Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. 2007. Katayama syndrome. *The Lancet Infectious Diseases* 7(3):218–24. doi:10.1016/S1473-3099(07)70053-1.
- [168] Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. 2002. Schistosomiasis. *The New England journal of medicine* 346(16):1212–20. doi:10.1056/NEJMra012396.
- [169] Rutitzky LI, Hernandez HJ, Stadecker MJ. 2001. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(23):13243–8. doi:10.1073/pnas.231258498.
- [170] Saleh S, Abdel-Aziz MT, El-Sayed HM, Khayyal MT. 1976. Effect of antischistosomal drugs on some aspects of carbohydrate metabolism in mice. *Pharmacological research communications* 8(4):359–68. doi:10.1016/0031-6989(76)90036-9.
- [171] Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(12):2985–3011. doi:10.1089/ars.2009.2513.
- [172] Schmittgen TD, Zakrajsek BA. 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46(1-2):69–81. doi:10.1016/S0165-022X(00)00129-9.
- [173] Schramm G, Gronow A, Knobloch J, Wippersteg V, Grevelding CG, Galle J, Fuller H, Stanley RG, Chiodini PL, Haas H, Doenhoff MJ. 2006. IPSE/alpha-1: a major immunogenic component secreted from Schistosoma mansoni eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 147(1):9–19. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.01.003.
- [174] Schramm G, Hamilton JV, Balog CIA, Wuhrer M, Gronow A, Beckmann S, Wippersteg V, Grevelding CG, Goldmann T, Weber E, Brattig NW, Deelder AM, Dunne DW, Hokke CH, Haas H, Doenhoff MJ. 2009. Molecular characterisation of kappa-5, a major antigenic glycoprotein from Schistosoma mansoni eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 166(1):4–14. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.02.003.

- [175] Schramm G, Mohrs K, Wodrich M, Doenhoff MJ, Pearce EJ, Haas H, Mohrs M. 2007. Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 178(10):6023–7. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6023.
- [176] Schwartz C, Fallon PG. 2018. *Schistosoma* "Eggs-Iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in immunology* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02492.
- [177] Schwartz C, Oeser K, Da Prazeres Costa C, Layland LE, Voehringer D. 2014. T cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. 1950) 193(7):3590–9. doi:10.4049/jimmunol.1401155.
- [178] Shadel GS, Horvath TL. 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell* 163(3):560–9. doi:10.1016/j.cell.2015.10.001.
- [179] Shaheen AA, Ebeid FA, Fahim AT. 1989. Effect of praziquantel on some aspects of carbohydrate metabolism in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Pharmacological research* 21(3):263–70. doi:10.1016/s1043-6618(89)80004-0.
- [180] Shaker Y, Samy N, Ashour E. 2014. Hepatobiliary Schistosomiasis. *Journal of clinical and translational hepatology* 2(3):212–6. doi:10.14218/JCTH.2014.00018.
- [181] Shen S-W, Lu Y, Li F, Shen Z-H, Xu M, Yao W-F, Feng Y-B, Yun J-T, Wang Y-P, Ling W, Qi H-J, Tong D-X. 2015. Potential long-term effects of previous schistosome infection may reduce the atherogenic index of plasma in Chinese men. *International journal for parasitology* 45(5):289–94. doi:10.1016/j.ijpara.2015.01.001.
- [182] Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW. 1990. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(1):61–5. doi:10.1073/pnas.87.1.61.
- [183] SIB Swiss Institute of Bioinformatics. 2022. ExpASy: Translate tool. Abrufbar unter: <https://web.expasy.org/translate/>. Letzter Zugriff am 19.10.2022.
- [184] Sies H. 2016. The Concept of Oxidative Stress After 30 Years, in: Gelpi, R, Boveris, A, Poderoso, J (Hrsg.), *Biochemistry of Oxidative Stress: Advances in Biochemistry in Health and Disease*, 16. Aufl., Cham: Springer Verlag:3–11. doi:10.1007/978-3-319-45865-6_1.
- [185] Sigma-Aldrich. 2018. Product Information: Glucose (HK) Assay Kit. Abrufbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/211/614/gahk20bul.pdf>. Letzter Zugriff am 21.01.2023.
- [186] Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 7:33. doi:10.1186/1471-2199-7-33.
- [187] Smith P, Fallon RE, Mangan NE, Walsh CM, Saraiva M, Sayers JR, McKenzie ANJ, Alcami A, Fallon PG. 2005. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *The Journal of experimental medicine* 202(10):1319–25. doi:10.1084/jem.20050955.

- [188] Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology* 25:101084. doi:10.1016/j.redox.2018.101084.
- [189] St. Symmers WC. 1904. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia hæmatobia*. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 9(2):237–9. doi:10.1002/path.1700090211.
- [190] Stanley RG, Jackson CL, Griffiths K, Doenhoff MJ. 2009. Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice. *Atherosclerosis* 207(1):131–8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.037.
- [191] Stinccone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning N-M, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M. 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 90(3):927–63. doi:10.1111/brv.12140.
- [192] Stjernholm RL, Warren KS. 1974. *Schistosoma mansoni*: utilization of exogenous metabolites by eggs in vitro. *Experimental Parasitology* 36(2):222–32. doi:10.1016/0014-4894(74)90061-7.
- [193] Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF. 2006. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* 108(7):2420–7. doi:10.1182/blood-2006-04-015933.
- [194] Taylor JJ, Krawczyk CM, Mohrs M, Pearce EJ. 2009. Th2 cell hyporesponsiveness during chronic murine schistosomiasis is cell intrinsic and linked to GRAIL expression. *The Journal of clinical investigation* 119(4):1019–28. doi:10.1172/JCI36534.
- [195] Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 176(10):5839–47. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5839.
- [196] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, Borman B de, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* 75(2-3):291–5. doi:10.1016/s0168-1656(99)00163-7.
- [197] Tielens AG, van de Pas FA, van den Heuvel JM, van den Bergh SG. 1991. The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46(1):181–4. doi:10.1016/0166-6851(91)90211-n.
- [198] Tielens AG, van den Heuvel JM, van den Bergh SG. 1990. Substrate cycling between glucose 6-phosphate and glycogen occurs in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 39(1):109–16. doi:10.1016/0166-6851(90)90013-c.
- [199] Valdameri G, Trombetta-Lima M, Worfel PR, Pires ARA, Martinez GR, Noletto GR, Cadena SMSC, Sogayar MC, Winnischofer SMB, Rocha MEM. 2011. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. *Chemico-biological interactions* 193(2):180–9. doi:10.1016/j.cbi.2011.06.009.
- [200] van der Kleij D, Latz E, Brouwers JFHM, Kruize YCM, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, Jong EC de, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AGM, Yazdanbakhsh M. 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. *Schistosomal lyso-*

phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *The Journal of biological chemistry* 277(50):48122–9. doi:10.1074/jbc.M206941200.

- [201] Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7):RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- [202] Vella AT, Hulsebosch MD, Pearce EJ. 1992. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen-responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 149(5):1714–22.
- [203] Vlas SJ de, Gryseels B, van Oortmarsen GJ, Polderman AM, Habbema J. 1993. A pocket chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitology Today* 9(8):306–7. doi:10.1016/0169-4758(93)90132-Y.
- [204] Wang Y, Holmes E, Nicholson JK, Cloarec O, Chollet J, Tanner M, Singer BH, Utzinger J. 2004. Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(34):12676–81. doi:10.1073/pnas.0404878101.
- [205] Warren KS, Mahmoud AA, Cummings P, Murphy DJ, Houser HB. 1974. *Schistosomiasis mansoni* in Yemeni in California: duration of infection, presence of disease, therapeutic management. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 23(5):902–9. doi:10.4269/ajtmh.1974.23.902.
- [206] Weinstock JV. 1992. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the schistosome ova and the host. *Immunological investigations* 21(5):455–75. doi:10.3109/08820139209069384.
- [207] Wellen KE, Thompson CB. 2010. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molecular cell* 40(2):323–32. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.004.
- [208] Wiria AE, Djuardi Y, Supali T, Sartono E, Yazdanbakhsh M. 2012. Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe? *Seminars in immunopathology* 34(6):889–901. doi:10.1007/s00281-012-0358-0.
- [209] Wissozky N. 1876. Ueber das Eosin als Reagens auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugethier- und Hühnerembryonen. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 13:479–96.
- [210] Wolde M, Berhe N, Medhin G, Chala F, van Die I, Tsegaye A. 2019. Inverse Associations of *Schistosoma mansoni* Infection and Metabolic Syndromes in Humans: A Cross-Sectional Study in Northeast Ethiopia. *Microbiology Insights* 12:1178636119849934. doi:10.1177/1178636119849934.
- [211] World Health Organization. 2023. Schistosomiasis Fact Sheet. Abrufbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Letzter Zugriff am 22.02.2023.
- [212] World Health Organization. 27.01.2023. 34th meeting of the International Task Force for Disease Eradication, 19–20 September 2022. *Weekly Epidemiological Record*:41–50. Abrufbar unter: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/365721>. Letzter Zugriff am 16.03.2023.

- [213] Wu J, Xu W, Ming Z, Dong H, Tang H, Wang Y. 2010. Metabolic changes reveal the development of schistosomiasis in mice. *PLoS neglected tropical diseases* 4(8). doi:10.1371/journal.pntd.0000807.
- [214] Xie F, Wang J, Zhang B. 2023. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Functional & integrative genomics* 23(2):125. doi:10.1007/s10142-023-01055-7.
- [215] Xie F, Wang J, Zhang B. 2023. RefFinder. Abrufbar unter: <https://www.heartcure.com.au/reffinder/>. Letzter Zugriff am 28.02.2023.
- [216] Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*. doi:10.1007/s11103-012-9885-2.
- [217] Xu Z-P, Chang H, Ni Y-Y, Li C, Chen L, Hou M, Ji M-J. 2019. *Schistosoma japonicum* infection causes a reprogramming of glycolipid metabolism in the liver. *Parasites & vectors* 12(1):388. doi:10.1186/s13071-019-3621-6.
- [218] Yang G-J, Bergquist R. 2018. Potential Impact of Climate Change on Schistosomiasis: A Global Assessment Attempt. *Tropical medicine and infectious disease* 3(4). doi:10.3390/tropicalmed3040117.
- [219] Yang S, Lian G. 2020. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and cellular biochemistry* 467(1-2):1–12. doi:10.1007/s11010-019-03667-9.
- [220] Yang X, Ding W, Qian X, Jiang P, Chen Q, Zhang X, Lu Y, Wu J, Sun F, Pan Z, Li X, Pan W. 2021. *Schistosoma japonicum* Infection Leads to the Reprogramming of Glucose and Lipid Metabolism in the Colon of Mice. *Frontiers in veterinary science* 8:645807. doi:10.3389/fvets.2021.645807.
- [221] Zaghoul MS, Zaghoul TM, Bishr MK, Baumann BC. 2020. Urinary schistosomiasis and the associated bladder cancer: update. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 32(1):44. doi:10.1186/s43046-020-00055-z.
- [222] Zheng B, Zhang J, Chen H, Nie H, Miller H, Gong Q, Liu C. 2020. T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in immunology* 11:61. doi:10.3389/fimmu.2020.00061.
- [223] Zheng M, Tian Z. 2019. Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. *Frontiers in immunology* 10:2525. doi:10.3389/fimmu.2019.02525.
- [224] Zhu J, Xu Z, Chen X, Zhou S, Zhang W, Chi Y, Li W, Song X, Liu F, Su C. 2014. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasites & vectors* 7:122. doi:10.1186/1756-3305-7-122.

8. Anhang

8.1. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (Hamsterleber)

8.1.1. Zusammenhang zwischen *Srsf4* und Eilast

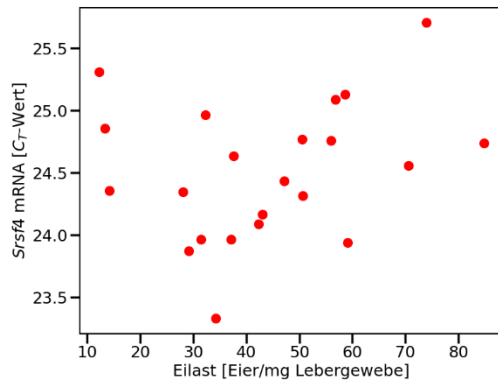


Abbildung 25: Fehlender Zusammenhang zwischen *Srsf4* und Eilast

Die Expression des Referenzgens *Srsf4* der bisex infizierten Gruppe (n = 22) wurde mittels qRT-PCR analysiert. Es ist kein statistischer Zusammenhang zwischen hepatischer Eilast und *Srsf4* zu ermitteln. Die Eilast diente als unabhängige und *Srsf4* als abhängige Größe. Die Eilast wird in Eier/mg Lebergewebe und *Srsf4* als Ct-Wert angegeben.

8.1.2. *Actb*, *Rps18* und *Tubb* als ungeeignete Referenzgene

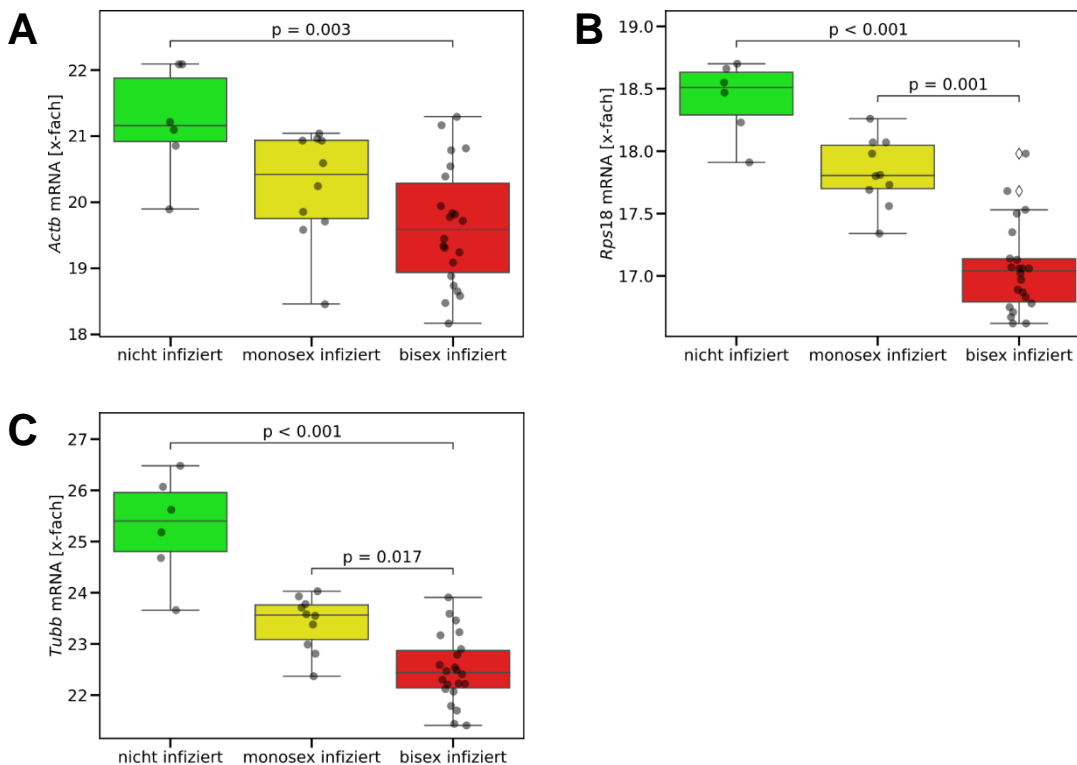


Abbildung 26: Ungeeignete Referenzgene *Actb*, *Rps18* und *Tubb*

Die hepatische Expression der Gene *Actb*, *Rps18* und *Tubb* weisen Gruppenunterschiede über alle Gruppen, sowie zwischen bisex und monosex bzw. nicht infizierten Hamstern auf (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,004$ (A) und $p < 0,001$ (B, C).

8.2. Bestimmung des Referenzgens für qRT-PCR (HepG2-Zellen)

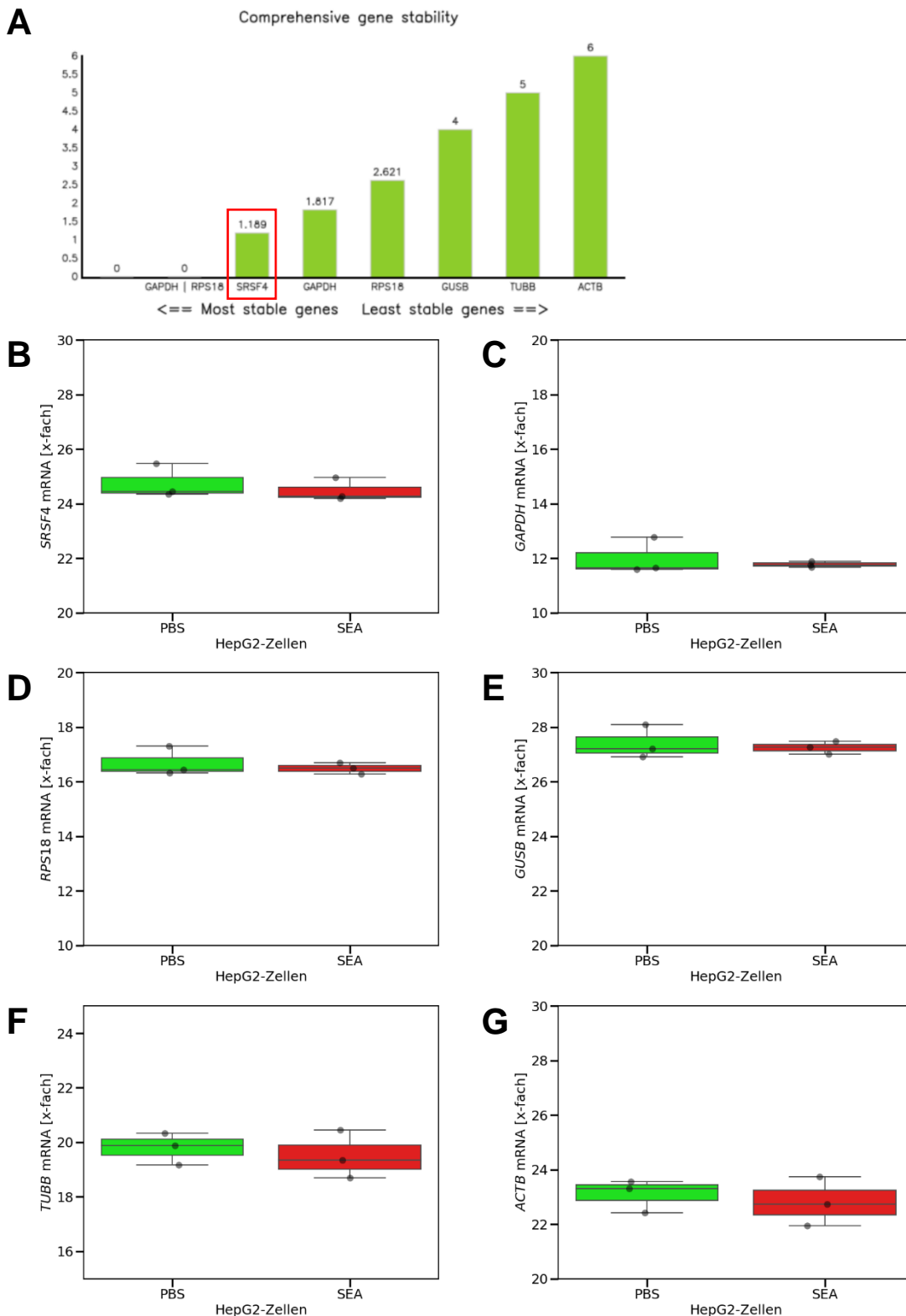


Abbildung 27: Geeignetes Referenzgen *SRSF4*

(A) *SRSF4* (roter Rahmen) zeigt bei der Analyse durch RefFinder die stabilste Expression ($n = 6$). (B) Die *SRSF4*-Expression weist keine Verteilungsunterschiede der C_T -Werte zwischen SEA-stimulierten HepG2-Zellen ($n = 3$) und der Kontrollgruppe (PBS, $n = 3$) auf. Verwendet wurde der Mann-Whitney-U-Test ($p = 0,4$). (C-G) Die Expression der Housekeeping-Gene *GAPDH*, *RPS18*, *GUSB*, *TUBB* und *ACTB* zeigen ebenfalls keine Gruppenunterschiede.

8.3. Expression des T_H2-Zytokins IL-5

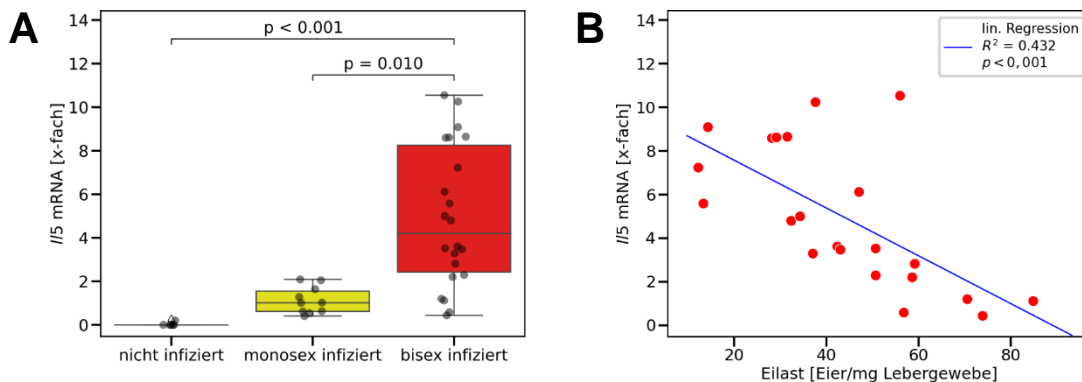


Abbildung 28: Hepatische Expression des T_H2-Zytokins IL-5

(A) Erhöhte hepatische *Il5*-Expression in bisex infizierten Hamstern (B) Negative lineare Regression zwischen *Il5*-Expression und der Eilast. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die monosex infizierte Gruppe. Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (A; $p < 0,001$). Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast als unabhängige und *Il5* als abhängige Größe (B).

8.4. Zusammenhang zwischen *Il4*- und *Ilng*-Expression

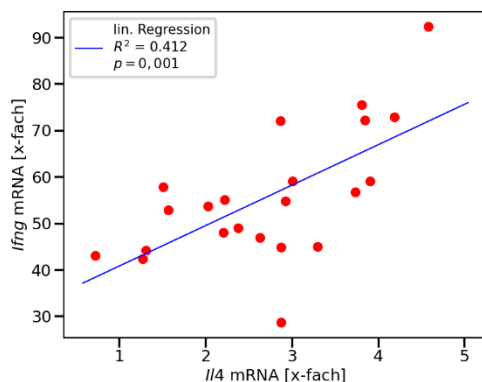


Abbildung 29: Regression zwischen *Il4*- und *Ilng*-Expression

Exponentielle Regression zwischen hepatischer *Il4*- und *Ilng*-Expression der bisex infizierten Tiere. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Als Referenzgruppe diente die nicht (*Ilng*), bzw. die monosex infizierte Gruppe (*Il4*). Die bisex infizierte Gruppe umfasste 22 Tiere. Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Bei der Regressionsanalyse diente die *Il4* als unabhängige und die *Ilng* mRNA als abhängige Größe.

8.5. Zusammenhang zwischen der Eilast und GyS, PK und G6PD

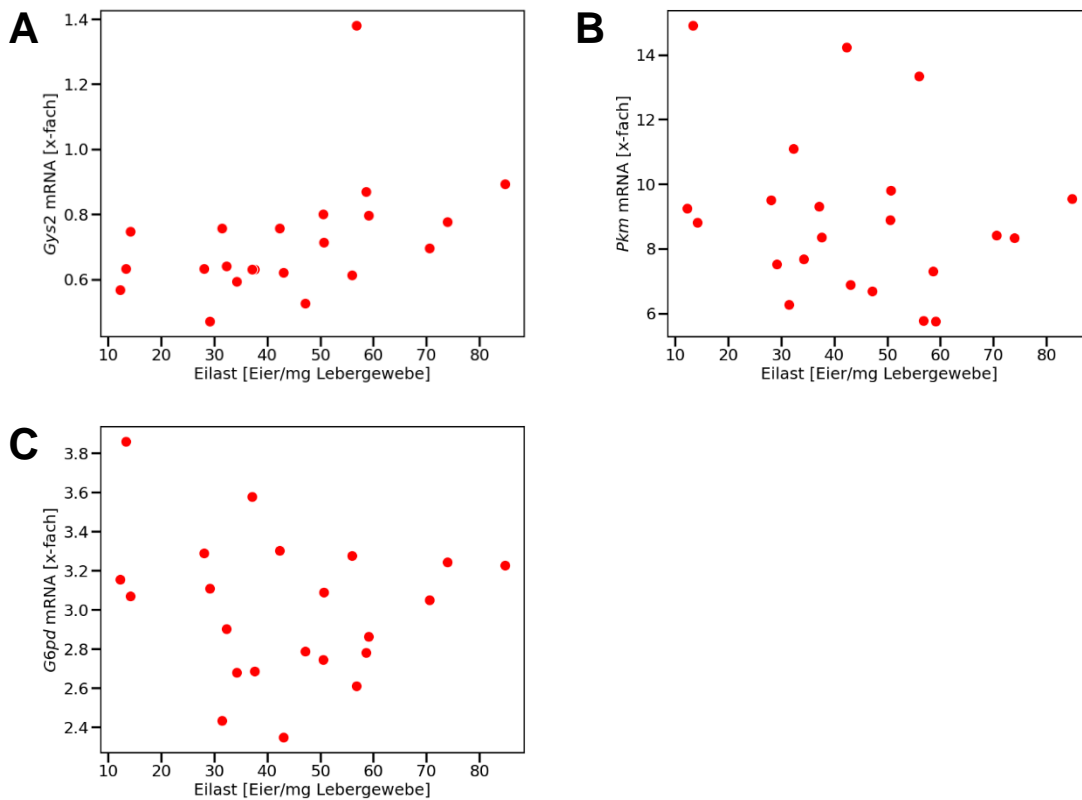


Abbildung 30: Keine Regression zwischen Eilast und Expression der Enzyme GyS, PKM und G6PD
(A-C) Keine Regression zwischen Eilast der bisex infizierten Hamster und der Expression von *Gys2*, *Pkm* und *G6pd*. Bei den Regressionsanalysen dienten die Eilast (aus KOH-Verdau) als unabhängige und die Expression der Enzyme als abhängige Größe. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe. Die bisex infizierte Gruppe umfasste 22 Tiere. Aus je drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet.

8.6. Zusammenhang zwischen *Ii4*- und *Cat*-Expression

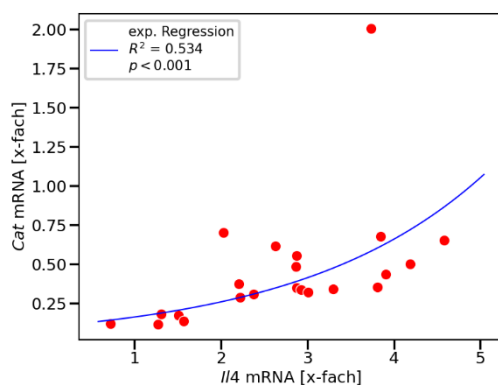


Abbildung 31: Regression zwischen *Ii4*- und *Cat*-Expression

Exponentielle Regression zwischen hepatischer *Ii4*- und *Cat*-Expression der bisex infizierten Tiere. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht (*Cat*), bzw. die monosex infizierte Gruppe (*Ii4*). Die getestete Gruppe umfasste 22 Tiere. Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Bei der Regressionsanalyse diente die *Ii4* als unabhängige und die *Cat* mRNA als abhängige Größe.

8.7. Modulation weiterer antioxidativer Enzyme

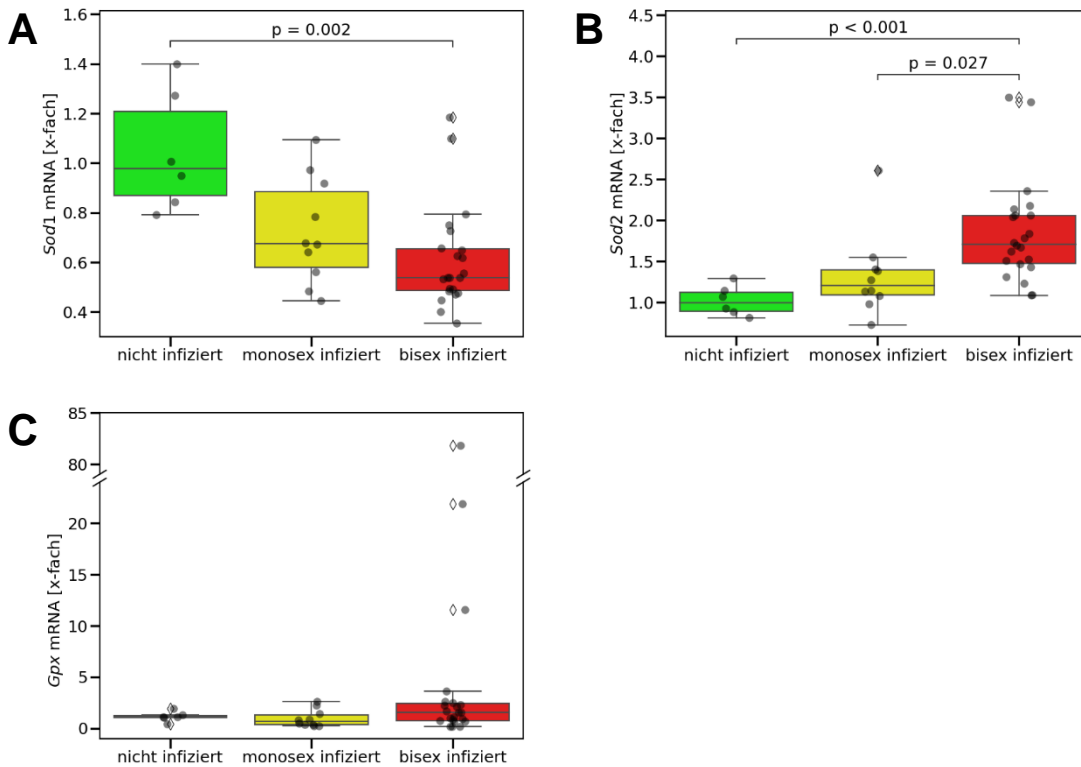


Abbildung 32: Hepatische Expression der Enzyme SOD1, SOD2 und GPx

Reduzierte Expression von *Sod1* (A) und erhöhte Level der *Sod2* mRNA (B) in Lebern der bisex infizierten Hamster. Unveränderte Expression von *GPx* in infizierten Tieren (C). Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe. Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus je drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (A, $p = 0,003$; B, $p < 0,001$; C, $p = 0,220$).

8.8. Regulation des Transkriptionsfaktors Nrf2

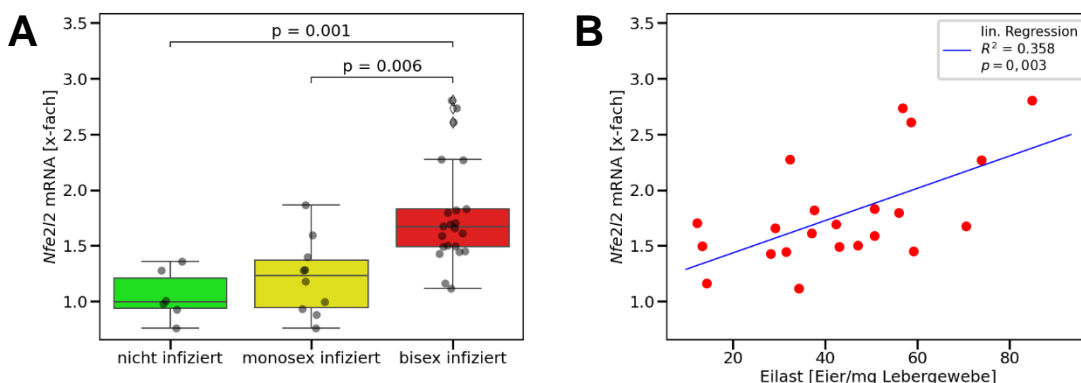


Abbildung 33: Hepatische Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2

(A) Reduzierte Expression von *Nfe2l2* (Gen codiert Nrf2) (B) Lineare Regression zwischen *Nfe2l2*-Expression und der Eilast. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels qRT-PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode, als Referenzgruppe diente die nicht infizierte Gruppe. Die Gruppen umfassten 22 (bisex), 10 (monosex) und 6 Tiere (nicht infiziert). Aus drei Wiederholungen wurden Mittelwerte gebildet. Die statistische Überprüfung auf Verteilungsunterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test (A; $p < 0,001$). Bei der Regressionsanalyse diente die Eilast als unabhängige und *Nfe2l2* als abhängige Größe (B).

9. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

von Bülow V, Gindner S, Baier A, Hehr L, Buss N, **Russ L**, Wrobel S, Wirth V, Tabatabai K, Quack T, Haeberlein S, Kadesch P, Gerbig S, Wiedemann KR, Spengler B, Mehl A, Morlock G, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Falcone FH, Wilson RA, Bankov K, Wild P, Greveling CG, Roeb E, Roderfeld M. 2022.

Metabolic reprogramming of hepatocytes by *Schistosoma mansoni* eggs. JHEP Reports 5(2):100625. doi: 10.1016/j.jhepr.2022.100625

von Bülow V, Schneider M, Dreizler D, **Russ L**, Baier A, Buss N, Lichtenberger J, Härle L, Müller H, Tschuschner A, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Longerich T, Greveling CG, Roeb E, Roderfeld M. 2023.

Schistosoma mansoni-induced oxidative stress triggers hepatocellular proliferation. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. Doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.08.014.

Publizierte Abstracts:

Russ L, von Bülow V, Hehr L, Wirth V, Tabatabai K, Tschuschner A, Müller H, Straßmann, J, Quack T, Greveling CG, Roderfeld M, Roeb E. 2021.

Schistosoma mansoni-Eier reduzieren die hepatische Katalase im Hamstermodell. Zeitschrift für Gastroenterologie 59(08): e211. Abstract, Vortrag DGVS 2021. doi: 10.1055/s-0041-1733623.

Russ L, von Bülow V, Hehr L, Wrobel S, Wirth V, Tabatabai K, Schramm G, Quack T, Greveling CG, Roderfeld M, Roeb, E. 2022.

Th2 immune response correlates inversely with the egg load in *S. mansoni* infection. Zeitschrift für Gastroenterologie 60(01): e44. Abstract, Vortrag GASL 2022. doi: 10.1055/s-0041-1740796.

Wrobel S, **Russ L**, von Bülow V, Quack T, Greveling CG, Roderfeld M, Roeb E. 2022. Infection grade determines intestinal immune reaction in Schistosomiasis. Zeitschrift für Gastroenterologie 60(01): e41. doi: 10.1055/s-0041-1740786.

Manuskripte:

Russ L, von Bülow V, Wrobel S, Stettler F, Schramm G, Falcone FH, Greveling CG, Roderfeld M, Roeb E. Inverse correlation of Th2-specific cytokines with hepatic egg burdens in *S. mansoni*-infected hamsters. Paper in Vorbereitung für die Einreichung.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Traunstein, den 31.07.2024

Ort/Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Frau Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe. Ich danke ihr für die Überlassung des interessanten und umfangreichen Themas, ihr entgegengebrachtes Vertrauen sowie die hervorragende Betreuung, Förderung und die stetigen wertvollen Anregungen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld für seine ausgezeichnete Betreuung und seine Ideen, für seine fortwährende Diskussionsbereitschaft und seine hilfreichen Anregungen und Korrekturen bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

Auch den anderen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe, Dr. rer. nat. Verena von Bülow, Annette Tschuschner, Heike Müller, Victoria Wirth, Laura Hehr (†) und Kuscha Tabatabai gilt mein herzlicher Dank. Vielen Dank für die gründliche und ausführliche Einarbeitung, den regelmäßigen fachlichen Austausch und eure Hilfestellung bei Problemen und Fragen jeder Art. Ihr habt mich auch an langen Labortagen motiviert und die gemeinsamen Mittagspausen habe ich sehr genossen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann und Dr. Dr. Daniel Leufkens aus dem Institut für Medizinische Informatik für die fachkundige Beratung und die Beantwortung meiner statistischen Fragen.

Besonders danken möchte ich meinem Vater für seine Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Diagramme sowie für die inhaltlichen Diskussionen bei der Ausarbeitung der Dissertation. Vielen Dank an meine beiden Eltern für das sorgfältige Korrekturlesen.

Ein ganz großes Dankeschön gebührt meiner großen Familie für die großzügige und bedingungslose Unterstützung. Ihr habt mir mein Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht, wart für mich da und habt immer an mich geglaubt!

Auch bei meinem tollen Freundeskreis möchte ich mich herzlich bedanken. Euer offenes Ohr, eure Tipps und euer Zuspruch haben mich stets bestärkt.