

**Replikationsstress, oxidativer Stress und
DNA-Reparaturmechanismen
bei *Schistosoma mansoni* Infektion**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Buß, Nicola

aus Lich

Gießen 2021

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. Sommer

Tag der Disputation: 15.07.2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Hepatische Pathophysiologie bei <i>S. mansoni</i> Infektion	3
2.2 Oxidativer Stress	4
2.2.1 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies	4
2.2.2 Antioxidative Mechanismen	5
2.2.3 Malondialdehyd als Indikator für oxidativen Stress	6
2.2.4 Oxidativer Stress bei <i>S. mansoni</i> Infektion	6
2.3 Replikationsstress	7
2.4 Karzinogene Mechanismen bei <i>S. mansoni</i> Infektion	7
2.5 DNA-Schäden und DNA-Reparaturmechanismen	8
2.5.1 Physiologische und pathologische Bedeutung des Histons H2AX.....	9
2.5.2 Regulation des Zellzyklus durch die Serin/Threonin-Kinase CHK1/2.....	10
2.6 Hepatozelluläre Karzinogenese bei <i>S. mansoni</i> Infektion	10
2.7 Ziele der Arbeit	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Geräte und Materialien	13
3.1.1 Geräte.....	13
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	14
3.1.4 Puffer und Lösungen	15
3.1.5 Antikörper	17
3.1.6 Kommerzielle Kits	19
3.1.7 Zelllinie.....	19
3.1.8 Medien, Inhibitoren und Zusatzstoffe	19
3.1.9 Versuchstiere (Hamster).....	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Zellkultur mit HepG2 Zellen	21

3.2.1.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen	21
3.2.1.2 Stimulations- und Inhibitionsversuche	22
3.2.2 Konservierung des Hamsterlebergewebes nach Perfusion.....	22
3.2.3 Photometrische Methoden.....	23
3.2.3.1 Messung des Biomarkers Malondialdehyd	23
3.2.3.1.1 Vorbereitung des Standards und der Proben	23
3.2.3.1.1.1 Gewinnung der Hamsterleberstandards und -proben.....	23
3.2.3.1.1.2 Gewinnung der Zellkulturstandards und -proben.....	24
3.2.3.1.2 Thiobarbitursäure Zugabe und photometrische Auswertung	24
3.2.3.2 Bestimmung der Katalase-Aktivität	24
3.2.3.2.1 Herstellung der Proben.....	25
3.2.3.2.2 Photometrische Auswertung.....	25
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden	25
3.2.4.1 Western Blot Analyse.....	25
3.2.4.1.1 Gewinnung von Lysaten	26
3.2.4.1.2 Proteinseparation durch SDS-Page	27
3.2.4.1.2.1 Herstellung des Gels.....	27
3.2.4.1.2.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.2.4.1.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	28
3.2.4.1.4 Immunchemischer Nachweis der spezifischen Proteine	28
3.2.5 Immunfluoreszierende Methoden	29
3.2.5.1 Comet-Assay.....	29
3.2.5.1.1 Gewinnung der Zellen	30
3.2.5.1.2 Auftragung des Agarosegels	31
3.2.5.1.3 Lyse und Inkubation der Zellen	31
3.2.5.1.4 Durchführung der Gel-Elektrophorese	31
3.2.5.1.5 Einfärbung und Auswertung der Zellen und Fragmente.....	31
3.2.5.2 Immunfluoreszierende Gewebeschnitte.....	32
3.2.5.2.1 Vorbereitung und Einfärbung der Schnitte	32

3.2.5.2.2 Lichtmikroskopische Auswertung	33
3.2.6 Statistische Auswertung	33
4 Ergebnisse.....	36
4.1 <i>S. mansoni</i> induziert oxidativen Stress	36
4.1.1 Anstieg der hepatischen Malondialdehyd Konzentration.....	36
4.1.2 Normalisierung der durch SEA induzierten Malondialdehyd Spiegel mittels reduzierten Glutathions und JNK2-Inhibition	37
4.1.3 Steigerung der hepatischen Katalase-Aktivität.....	39
4.1.4 Reduktion der hepatischen Katalaseexpression	40
4.1.5 Reduzierung der durch SEA induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalwege und Zellzykluskontrollen mittels reduzierten Glutathions	43
4.2 <i>S. mansoni</i> beeinflusst die Zellzyklusregulationen	47
4.2.1 Aktivierung der Zellzykluskontrollmarker p27 und p53	47
4.2.2 Aktivierung des DNA-Replikationsmarkers PCNA.....	49
4.2.3 Aktivierung der Transkriptionsmarker p44/42 (ERK1/2)	51
4.2.4 Steigerung der Zellzykluskontrolle (CHK1 Expression).....	54
4.2.5 Simultane Aktivierung von MCM2 und p-H2AX in Gewebeschnitten	55
4.2.6 Simultane Aktivierung von Ki67 und p-H2AX in Gewebeschnitten.....	56
4.3 <i>S. mansoni</i> reduziert die Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression.....	58
4.4 <i>S. mansoni</i> induziert eine DNA-Schädigung	60
4.4.1 Steigerung der p-H2AX Expression.....	60
4.4.2 Normalisierung der SEA induzierten DNA-Schäden im Comet-Assay mittels reduzierten Glutathions.....	62
5 Diskussion.....	65
5.1 Hepatischer oxidativer Stress ausgelöst durch parasitäre Erkrankungen und speziell durch SEA	66
5.2 Allgemeine therapeutische Ansätze bei oxidativem Stress, GSH als therapeutischer Ansatz bei <i>S. mansoni</i> Infektion	67
5.3 <i>S. mansoni</i> Infektion und Karzinogenese	69

5.3.1 Zusammenhang des oxidativen Stresses und der MAPK/JNK Signalweg Aktivierung bei <i>S. mansoni</i> Infektion.....	70
5.3.2 Bedeutung der neuen Erkenntnisse vor dem Hintergrund HCC & <i>S. mansoni</i> Infektion	71
5.4 <i>S. mansoni</i> Infektion und epigenetische Regulationen.....	72
5.4.1 Regulation der Replikation / DNA-Reparaturmechanismen (p53, ACSS2, p-H2AX, CHK1) bei <i>S. mansoni</i> Infektion.....	72
5.4.2 Replikationsstress bei <i>S. mansoni</i> Infektion	73
5.5 Translationale Anwendbarkeit	75
5.6 Limitationen der Arbeit.....	75
6 Zusammenfassung	77
7 Summary.....	78
8 Abkürzungsverzeichnis.....	80
9 Abbildungsverzeichnis.....	82
10 Tabellenverzeichnis.....	84
11 Literaturverzeichnis / Quellenangaben.....	84
12 Anhang.....	93
13 Publikationsverzeichnis	94
14 Ehrenwörtliche Erklärung	96
15 Danksagung	97

1 Einleitung

Schistosomiasis ist eine parasitäre Tropenerkrankung, die auch als Bilharziose bekannt ist und durch Trematoden der Gattung *Schistosoma* übertragen wird (Colley et al. 2014; Eppinger 1937). Die Parasiten kommen hauptsächlich im Süßwasser vor und infizieren den Hauptwirt, wie z.B. den Menschen, über die Haut. Hier wandern sie nach dem Eindringen gegen den Blutstrom durch Lunge und Herz bis zur Leber. Die Würmer besiedeln die Mesenterialvenen bzw. im Falle von *Schistosoma haematobium* die Harnblase (Colley and Secor 2014). Es kommt im Verlauf zur Ausreifung der Würmer, Paarung und Produktion von Eiern, die nach Ausscheidung über Harn und Kot des Hauptwirtes den Zwischenwirt, eine Süßwasserschnecke, infizieren können. Werden die Eier mit dem Blutstrom im Körper verteilt, können sie in Kapillargefäßen steckenbleiben und granulomatöse Entzündungen in Leber, Darm und anderen Organen initiieren (Niedrig et al. 2006). Zu den human pathogenen Erregern der Schistosomiasis zählen *S. haematobium*, *S. mansoni* und *S. japonicum* (Gryseels et al. 2006).

Schistosomiasis ist vor allem in Afrika (ca. 90%), Südamerika und Südostasien verbreitet (Turner et al. 2020). Hinter Malaria ist Schistosomiasis eine der häufigsten parasitären Erkrankungen der Welt mit schätzungsweise 250 Millionen Infizierten nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Gasparotto et al. 2017). Jährlich sterben bis zu 200.000 Menschen an Schistosomiasis vor allem in subtropischen und tropischen Gebieten Afrikas (World Health Organization 2016). Die WHO klassifiziert Schistosomiasis als „neglected tropical diseases“ (Pisarski 2019). Besonders die in Armut lebenden Bevölkerungsschichten sind betroffen, da die Menschen nur über geringe sanitäre Einrichtungen verfügen (Tchuem Tchuente et al. 2017). Die Schistosomiasis stellt sowohl medizinisch als auch sozioökonomisch eine große Belastung für die Bevölkerung dar (Löscher and Burchard 2010; Sacolo, Chimbari, and Kalinda 2018). Durch Immigration, Globalisierung und die damit verbundene Mobilität verbreitet sich die Bilharziose auch in Europa und anderen gemäßigten Breitengraden (Drudge-Coates and Turner 2013; De Laval et al. 2014). Infizierte Süßwasserschnecken wurden auf der französischen Insel Korsika bereits 2013 beschrieben (Oleaga et al. 2019). Damit ist eine Ausbreitung auch in Europa zu beobachten.

Neben der akuten Erkrankung stellen vor allem die chronischen Verläufe ein großes Problem dar (Gryseels et al. 2006). Es kommt unter anderem zu fibrotischem Umbau der Leber und den damit verbundenen Langzeitfolgen wie portaler Hypertension, Aszites, Nieren- und Leberversagen (Wynn et al. 2004). Darüber hinaus wurde in

diversen Studien ein Zusammenhang zwischen *S. haematobium* und dem Plattenepithelkarzinom der Harnblase festgestellt (Palumbo 2007). Eine Assoziation zwischen den Erregern *S. mansoni* und *S. japonicum*, dem Hepatozellulären Karzinom (HCC) und Hepatitis B und C ist ebenfalls beschrieben worden (Costain, MacDonald, and Smits 2018). Die Aktivierung diverser Karzinogenese-assoziiierter Signalwege, sowie erhöhte Proliferations- und Apoptosemarker in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roeb der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) gezeigt (Roderfeld et al. 2020). Diese Ergebnisse sind in Zellkulturversuchen mit *S. mansoni* produzierten löslichen Ei-Antigenen (SEA) bestätigt worden (Roderfeld et al. 2020). Die Ergebnisse zeigen eine Beeinträchtigung der Zellzyklusregulation durch Schistosomiasis.

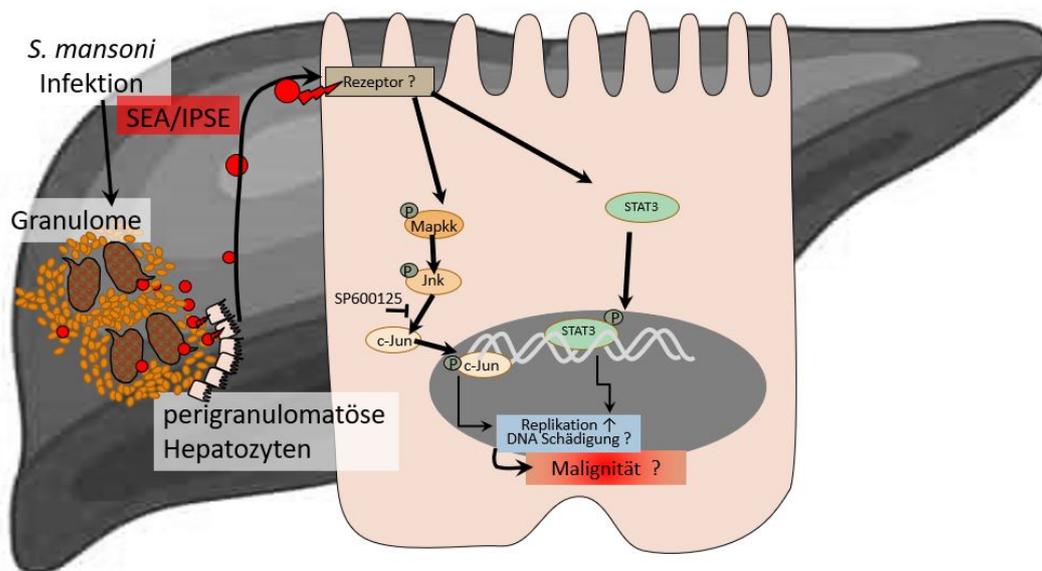


Abbildung 1: Stand der Erkenntnisse zwischen *S. mansoni* Infektion und Karzinogenese zu Beginn der vorliegenden Arbeit. Dargestellt ist die hepatische Pathologie der *S. mansoni* Infektion. Die eingespülten *S. mansoni* Eier bleiben in Kapillargefäßen stecken und initiieren eine inflammatorische Granulombildung. Lösliche *S. mansoni* Ei Antigenen (SEA) und das Glykoprotein „IL-4 inducing principle of schistosome eggs“ (IPSE) führen in den angrenzenden Hepatozyten zu einer Aktivierung der Mitogen-activated protein (MAP) Kinase/JNK und STAT3 Signalwege. Dies sind Karzinogenese-assoziierte Signalwege. Eine direkte DNA-Schädigung und eine Karzinogenese durch *S. mansoni* sind bisher noch nicht erforscht. Eigene Darstellung.

Zunächst unklar blieb die Frage des Zusammenhangs zwischen der aktivierten HCC-assoziierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) und der Zellzyklusregulation bei *S. mansoni* Infektionen. Zum Verständnis der molekularen Zusammenhänge zwischen der Schistosomen-Infektion und Karzinogenese-Induktion sind weitere Untersuchungen erforderlich. Der Frage des Zusammenhangs und der potentiellen Auslöser der Karzinogenese-Induktion wird in der vorliegenden Arbeit nachgegangen.

Schwerpunktmäßig untersucht die Studie die Auswirkungen der *S. mansoni* Infektion auf den Zellzyklus, mit dem Focus auf DNA-Replikation, DNA-Schädigung und DNA-Reparaturmechanismen. Zudem sollen therapeutische Konzepte analysiert werden. Da in verschiedenen Studien *S. mansoni*-induzierter oxidativer Stress beschrieben wird (de Oliveira et al. 2013), soll das therapeutische Potential des reduzierten Glutathions (GSH) untersucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Hepatische Pathophysiologie bei *S. mansoni* Infektion

Es gibt drei unterschiedliche Pathologien, die durch Schistosomiasis ausgelöst werden: die lokale, akute und chronische Form der Erkrankung. Nach der Einwanderung der Zerkarien durch die Haut kann es lokal nach einigen Stunden in Folge einer Zerkarien-Dermatitis zu Juckreiz und lokaler Rötung kommen (Barsoum, Esmat, and El-Baz 2013).

Über die Blutbahn wandern die Egel gegen den Blutstrom in die Mesenterialvenen ein und paaren sich dort (Colley et al. 2014). Etwa vier bis fünf Wochen nach Beginn der Infektion produzieren sie dort mehrere hundert Eier pro Tag (Wynn et al. 2004). Ziel des Parasiten ist es die Eier über das Darmlumen auszuscheiden und eine weitere Verbreitung des Parasiten zu ermöglichen. Einige Eier gelangen über die Portalvene in die Leber, wo sie in den Sinusoiden steckenbleiben und eine Immunreaktion auslösen (Anthony, Ramm, and McManus 2012). Es kommt zur inflammatorischen hepatischen Granulombildung (Colley et al. 2014). Die akute Form der Schistosomiasis, die rasch nach dem Eindringen der Würmer auftritt, bezeichnet man auch als Katayama-Fieber (McManus et al. 2018). Es tritt eine systemische Hypersensitivitätsreaktion auf, die sich klinisch durch schnellen Fieberanstieg, Myalgien, Husten und Kopfschmerzen bemerkbar macht (Ross et al. 2007). Durch Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen kann es zu Hepatosplenomegalie und Glomerulonephritis kommen (Niedrig et al. 2006).

Im chronischen Verlauf der Schistosomen-Infektion sind die Symptome auf die Verstopfung der Kapillaren durch die Eier und die damit einhergehenden reaktiven, inflammatorischen und fibrosierenden Granulome zurückzuführen (Niedrig et al. 2006). Die durch Schistosomeneiner induzierten Antigene spielen bei der Pathogenese ebenfalls eine Rolle (Costain et al. 2018). Bei erhaltener Leberfunktion treten Symptome wie Oberbauchschmerz, portalvenöser Hochdruck und Aszites auf (Souza, Toledo, and Borges 2000). Der erhöhte Druck in der Pfortader führt zu portokavalen

Kollateralausbildungen und Ösophagusvarizen, deren Blutungen heute noch eine der Hauptkomplikationen darstellen (Gryseels et al. 2006).

2.2 Oxidativer Stress

Sauerstoff wird von Pflanzen, Tieren und Menschen für die Energiebereitstellung verwertet. Beim Menschen findet diese Verwertung in den Mitochondrien statt. Als natürliches Nebenprodukt entstehen dabei Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die physiologisch direkt weiter umgesetzt werden (Kelly et al. 1998). Kommt es zu einer Dysbalance zwischen Entstehung und Abbau der ROS, bezeichnet man das Produkt des gestörten Gleichgewichts als oxidativen Stress (Sies, Berndt, and Jones 2017).

2.2.1 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Die Gruppe der ROS besteht aus heterogenen sauerstoffhaltigen Molekülen. Durch Reduktionsschritte und Protonierung kann es zum Beispiel in den Mitochondrien während der Atmungskette zu radikalischen und nichtradikalischen Sauerstoffderivaten kommen (Halliwell, B., Gutteridge 1999). Zu diesen Sauerstoffderivaten zählen das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Halliwell 2015). $\text{OH}\cdot$ entsteht im Körper unter verschiedenen stressbedingten Auslösern und führt zu oxidativen Zellschäden wie zum Beispiel bei neurodegenerativen oder kardiovaskulären Erkrankungen (Ayala, Muñoz, and Argüelles 2014). Bei der Lipidperoxidation sind ebenfalls $\text{OH}\cdot$ beteiligt. In der Leber gibt es mehrere Enzyme, die Sauerstoff zu $\text{O}_2^{\cdot-}$ reduzieren und auch im Darm entstehen $\text{O}_2^{\cdot-}$ durch die Xanthin-Oxidase. Die schädigende Wirkung des nur schwach oxidierenden Wasserstoffperoxids täuscht, da durch Bildung von hochreaktivem $\text{OH}\cdot$ aus H_2O_2 eine enorme Schädigung der Proteine, Zellmembranen, Enzyme und DNA auftreten können (Kelly et al. 1998). Die Bildung von ROS nutzt der Körper allerdings auch in positiver Hinsicht: ROS werden für die Immunreaktion der Leukozyten und die Synthese der Arachidonsäurederivate benötigt (Delves and Roitt 2000; Halliwell 2015).

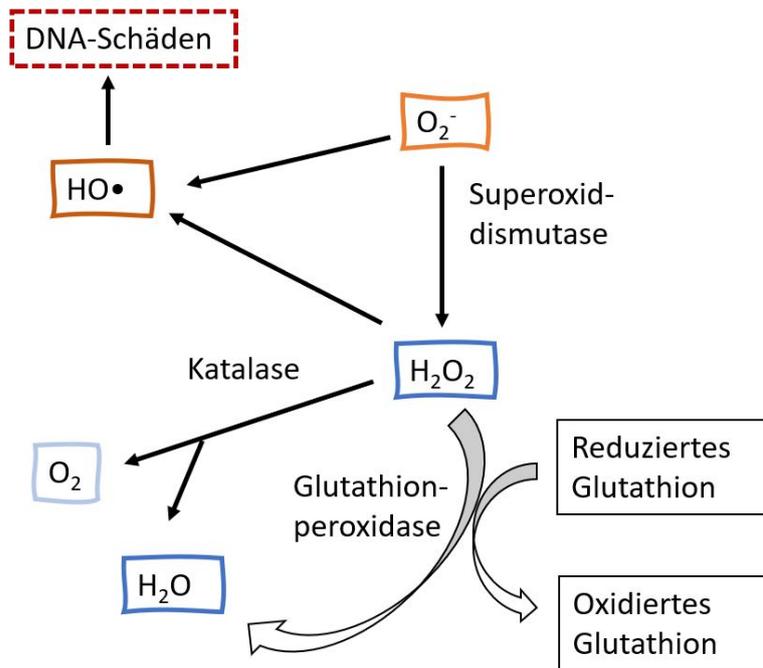


Abbildung 2: Schäden und Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies. Zu sehen sind Abbau und exemplarische Auswirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies Hydroxylradikal (OH•), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Superoxidradikalanion (O₂^{•-}). Die Superoxid-Dismutase führt zur Umwandlung des O₂^{•-} in H₂O₂. Sauerstoffperoxid wird dann durch die Katalase in Wasser und Sauerstoff umgewandelt und unschädlich gemacht. Diese Umwandlung kann auch die Glutathionperoxidase durchführen. Reduziertes Glutathion wird dabei als Reduktionsmittel verwendet. Es kann ohne die Reduktion zur Entstehung von HO• kommen, welches DNA-Schäden verursachen kann. Modifiziert nach (Kelly et al. 1998; Sies 2017).

2.2.2 Antioxidative Mechanismen

Um sich vor den reaktiven Sauerstoffmolekülen zu schützen, nutzt der Körper Enzyme, Proteine und andere endogene und exogene niedermolekulare Substanzen. Zu den enzymatischen Abbaumöglichkeiten der Eukaryonten zählen die Superoxid-Dismutase (SOD), die Katalase und die Glutathion-Peroxidase (Kelly et al. 1998). Letztere verwendet als Substrat das nicht enzymatische Antioxidans GSH. Es wird zu oxidiertem Glutathion umgesetzt (Eisenbrand, Schuhmacher, and Gölzer 1995). GSH ist unter anderem im Blut enthalten, um die Erythrozyten vor oxidativem Stress zu schützen (Ozden et al. 2002). Wie in Kelly et al. beschrieben, zählen Vitamin C und Vitamin E zu den exogenen Radikalfängern. Sie werden aus der Nahrung über den Darm aufgenommen und können im Blut ROS abfangen und neutralisieren. Das lipophile Vitamin E schützt vor allem Fette wie die Membranlipide vor oxidativem Stress. Viele Studien deuten an, dass die endogenen Stoffe Bilirubin und Harnsäure ebenfalls in der Lage sind oxidativen Stress, durch Abfangen der ROS, zu minimieren (Glantzounis et al. 2005; Inoguchi, Sonoda, and Maeda 2016).

2.2.3 Malondialdehyd als Indikator für oxidativen Stress

Die Reaktion von Lipiden mit ROS wird allgemein Lipidperoxidation genannt. Malondialdehyd (MDA) ist ein hoch reaktives Abbauprodukt der oxidativen Reaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Da MDA als Produkt der Lipidperoxidation entsteht, dient es weitläufig als Biomarker für oxidativen Stress (Matés, Pérez-Gómez, and Núñez de Castro 1999). Durch Zugabe von Thiobarbitursäure (TBA) entsteht ein photometrisch messbarer Komplex, TBA reactive substances (TBARS). Wie bei Tsikas beschrieben, reagiert ein MDA Molekül in saurem Milieu bei hohen Temperaturen (95°C) über eine Stunde mit zwei TBA Molekülen. Dies führt zu einem quantifizierbaren und reproduzierbaren rot gefärbten Addukt, welches bei einer Absorption von 532nm gemessen werden kann (Tsikas 2017).

2.2.4 Oxidativer Stress bei *S. mansoni* Infektion

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine große Rolle für die Pathogenese der *S. mansoni* Infektion. Bisher ist bekannt, dass als Reaktion auf die parasitäre Erkrankung hauptsächlich die Leukozyten Aktivierung zu erhöhtem oxidativen Stress führt (Elsammak et al. 2008). Es kommt im Verlauf der Infektion zu einer Rekrutierung der Eosinophilen. Diese haben eine hohe Peroxidase-Aktivität, was zu einer Verschiebung der Reduktionsäquivalente führt (Gharib et al. 1999). Es kommt zu einem gestörten Gleichgewicht des Redoxsystems, per Definition also zu oxidativem Stress. Durch den Verbleib der *S. mansoni* Eier im Gewebe bleibt eine konstante Infektion bestehen, gegen die Immunzellen mit dem H₂O₂/Peroxidase System ankämpfen (Abdallahi et al. 1999). Interleukin 4 gilt als wichtiges Zytokin zur Aktivierung der Immunzellen. In Versuchen mit IL-4^{-/-} Mäusen, wurde ein Zusammenhang zwischen der fehlenden inflammatorischen Reaktion, dem erhöhten oxidativen Stress und den daraus resultierenden hepatischen Organschäden durch *S. mansoni* Infektion beschrieben (La Flamme et al. 2001). La Flamme et al. weisen IL-4 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der antioxidativen Schutzmechanismen zu. Sie zeigen, dass eine fehlende Immunantwort bei einer *S. mansoni* Infektion zu einer Zunahme der ROS und hepatischen Pathologie führt (La Flamme et al. 2001).

In Tierversuchen mit *S. mansoni* infizierten Mäusen konnte ein Ungleichgewicht des Redoxsystems festgestellt werden (de Oliveira et al. 2013). Hierbei konnten de Oliveira et al. in Leber, Herz und Nieren eine Regulation der enzymatischen antioxidativen Abwehrmechanismen, wie der Katalase- oder der Superoxid-Dismutase-Aktivität,

zeigen. Bis heute gilt ausschließlich die Immunzellantwort als Auslöser des hepatischen oxidativen Stresses während der *S. mansoni* Infektion.

2.3 Replikationsstress

In der S-Phase des Zellzyklus kommt es zur Verdopplung (Replikation) der Histone, DNA und Regulationsproteine (Lüllmann-Rauch 2012). Die Doppelhelix wird aufgewunden und ein neuer DNA-Strang durch die DNA-Polymerase gebildet. Letztere fertigt eine Kopie der ursprünglichen Matrize an (von der Saal 2020). Die Replikation ist streng reguliert, da Fehler zu Mutationen oder dem Abbruch der Replikation führen können.

Das Eingreifen in die Replikation oder auch Behindern durch unterschiedliche Bedingungen, die mit DNA-Schäden einhergehen, wird als Replikationsstress bezeichnet (Gaillard, García-Muse, and Aguilera 2015). Hierbei bleibt der Komplex aus Proteinen und aufgewundener DNA (=Replikationsgabel) länger bestehen und die Synthese wird verlangsamt. Gaillard et al. bezeichnen den Replikationsstress als Hauptgrund für die Instabilität des Erbguts. Die zentrale Rolle des Replikationsstress bei der Entstehung vieler Tumore wird von Macheret und Halazonetis und Taylor und Lindsay bestätigt (Macheret and Halazonetis 2015; Taylor and Lindsay 2016). Durch ein funktionierendes Kontrollsystem und die Aktivierung der Reparaturmechanismen, kann die damit einhergehende Instabilität des Erbguts bis zu einem bestimmten Punkt noch kontrolliert werden (Bartkova et al. 2005). Misslingt die Kontrolle der Replikation und damit auch die DNA-Reparatur, kann dies zu bleibenden DNA-Schäden führen.

2.4 Karzinogene Mechanismen bei *S. mansoni* Infektion

Als Schlüsselement der neoplastischen Veränderungen bei chronischer *S. mansoni* Infektion gilt die chronische Inflammation (Vennervald and Polman 2009). Die chronische Entzündung führt in der Umgebung der Schistosomeneier zu genotoxischen Faktoren, die DNA-Schäden und veränderte DNA-Reparaturmechanismen mit sich bringen (Markowitz and Bertagnolli 2009). Zu diesen Faktoren zählen ebenfalls ROS wie das Hydroxylradikal (OH•) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Eine Veränderung der Cytochrom P450 Expression und der NADPH-Reduktase wird bei *S. mansoni* Infektion beschrieben, die indirekt zu einem erhöhten Krebsrisiko führen (Vennervald and Polman 2009). *S. mansoni* Ei Antigene (SEA) können eine Gruppe der T-Helferzellen modifizieren und somit in das Immunsystem modulierend eingreifen (van Tong et al. 2017).

Im klinischen Kontext vergleichen Madbouly et al. 60 ägyptische Darmkrebs Patienten in einer Studie, die 40 Patienten mit Schistosoma Colitis assoziierten Darmkrebs (engl. schistosomal colitis-associated colorectal cancer; SCC) und 20 Patienten mit Kolorektalem Karzinom ohne *S. mansoni* Infektion einschließt. Assoziationen zwischen der *S. mansoni* Infektion und Darmkrebs zeigen sich durch ein früheres Auftreten der multizentrischen Karzinomform, die gesteigerte p53 Expression und der signifikant jüngeren Patientengruppe der SCC-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe (Madbouly et al. 2007).

Weiterhin wird auch in anderen Studien vermutet, dass Onkogene als Angriffspunkte bei *S. mansoni* Infektion eine Rolle spielen: van Tong et al. beschreiben in ihrem Review, der sechs Publikationen zu *S. mansoni* und Karzinogenese zusammenfasst, eine veränderte p53 Expression, Mutationen der Onkogene und das Eingreifen in die Regulation der Immunantwort als entscheidende Schlüsselfaktoren bei der Entwicklung eines Kolorektalen Karzinoms bei Vorliegen einer *S. mansoni* Infektion. Diese Faktoren führen unter Anderem zur veränderten Expression der Proteine c-myc, Bcl-2 und zu einer Aktivierung weiterer Karzinogenese-assoziiierter Signalwege. Metabolischer und oxidativer Stress werden als Auslöser für DNA-Schädigung, Mutationen und Onkogenaktivierung vermutet (van Tong et al. 2017). Für das Vorkommen des genotoxischen Stresses spielen sowohl die parasitär gebildeten Antigene, die Inflammation als auch die mechanische Schädigung inklusive hepatischer Fibrose und portaler Hypertension eine Rolle.

2.5 DNA-Schäden und DNA-Reparaturmechanismen

Ausgelöst durch ROS, ionisierende Strahlung oder chemische Noxen treten chemische Veränderungen der DNA auf, die als DNA-Schäden bezeichnet werden.

Die Schädigung der DNA und deren Reparatur können auf drei Arten beeinflusst werden. Dazu zählen Doppelstrangbrüche (DSB), ROS und der Umbau des Chromatins (Turgeon, Perry, and Poulgiannis 2018). Histonmodifikationen wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung führen zu einer Veränderung der Genexpression und Bindung der Reparaturproteine (Attwood, Yung, and Richardson 2002; Miller and Grant 2013). Diese Modifikationen werden zum Beispiel durch das Vorkommen von Acetyl-CoA beeinflusst. OH• gilt als starker oxidativer Stressor für die DNA (von der Saal 2020). Die Doppelhelix wird sowohl an den Basen, als auch an ihrem Gerüst manipuliert. Es kommt zu Fragmenten, Auflösung der Ringstruktur und letztlich DNA-Einzelstrangbrüchen, die durch verschiedene Reparaturmechanismen,

wie der Basen- oder Nucleotidexzisionsreparatur behoben werden können (Kelly et al. 1998).

Zellen sind in der Lage mittels „DNA damage response“ (DDR) Schäden des Erbguts zu erfassen und darauf zu reagieren (Turgeon et al. 2018): Reparaturmechanismen können aktiviert werden, die Replikation gestoppt werden oder bei irreparablen Schäden die Apoptose eingeleitet werden. Die Aktivierung der Proteine „Ataxia telangiectasia and Rad3 related“ (ATR) und „Ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) führt zu einer Signaltransduktion, die eine Stabilisierung der Replikationsgabel und Aktivierung von CHK auslösen kann (siehe Kapitel 2.5.2). Eine zentrale Rolle spielt dabei das Protein p53, da eine Mutation des Proteins den Zellen eine Umgehen der Apoptose ermöglichen kann (Taylor and Lindsay 2016). ATR und ATM aktivieren neben p53 laut Yang et al. auch „mitogen-activated protein kinases“ (MAPKs), zu denen „c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase“ (JNK) und „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) gehören. Deren Aktivierung führt zu einer Translokation in den Zellkern und anschließenden Phosphorylierung von Zielproteinen wie Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressoren (Yang et al. 2004). Falls es nicht zur Reparatur kommt, entstehen bleibende Schäden am Erbgut. Dies führt zu fehlerhafter Replikation und damit Mutagenese der Zellen.

2.5.1 Physiologische und pathologische Bedeutung des Histons H2AX

Wenn es im Laufe der Replikation zu einem Doppelstrangbruch der DNA kommt, wird das Histon H2AX phosphoryliert und damit aktiviert. Dies geschieht unter anderem durch die Kinasen ATM und ATR (Kuo and Yang 2008). Die aktivierte Form, γ -H2AX, gilt als sensitiver Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (Dickey et al. 2009).

Typischerweise tritt γ -H2AX verstärkt in der Nähe der DSB auf. γ -H2AX führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung der DNA-Reparaturmechanismen. Darüber hinaus besteht eine Kommunikation zwischen Kontrollpunkten des Zellzyklus und γ -H2AX (Downey and Durocher 2006). In Versuchen mit Mäusen, die kein H2AX besitzen, konnte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Strahlung und eine weniger effiziente DSB-Reparatur beschrieben werden (Bassing et al. 2002; Celeste et al. 2002).

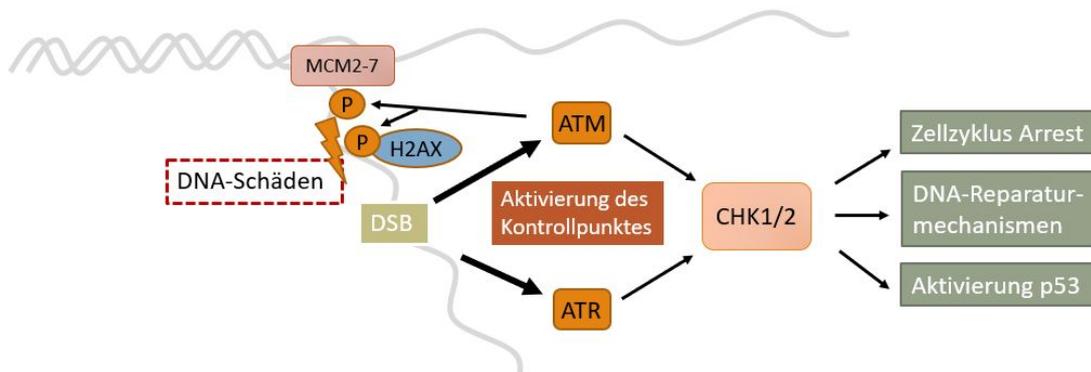


Abbildung 3: Aktivierung der Kontrollmechanismen nach DNA-Doppelstrangbrüchen. Dargestellt ist die Aktivierung des Kontrollpunktes bei Beeinträchtigung der Replikation durch DNA-Doppelstrangbrüche. Der MCM-Komplex bindet an die DNA und es kommt zur Auftrennung des Doppelstranges. Im Falle einer DNA-Schädigung wie z.B. durch DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) wird das Histon H2AX durch die Kinasen ATM und ATR phosphoryliert und aktiviert. Es kommt zur Aktivierung der Kontrollpunktkinasen CHK1 und CHK2. Diese regulieren die weitere Replikation, Reparaturmechanismen und den Zellzyklus. Modifiziert nach (Gaillard et al. 2015).

2.5.2 Regulation des Zellzyklus durch die Serin/Threonin-Kinase CHK1/2

CHK1 und 2 sind Serin/Threonin-Kinasen, die als Kontrollpunkte der Replikation dienen. Eine Aktivierung dieser Kinasen erfolgt durch phosphoryliertes ATR/ATM. Dies führt zu einer Inhibierung der weiteren Replikation und verhindert den Übergang in die Mitose. Auf diese Weise kann die Replikation nach DNA-Reparatur korrekt weitergeführt werden und ein Replikationsabbruch, ausgelöst durch Zusammenfallen der Replikationsgabel, wird verhindert. Als Schlüsselenzyme der adäquaten Reaktion auf Replikationsstress sind CHK1 und ATR für das Überleben der Zelle unverzichtbar (Gaillard et al. 2015). In weiteren Versuchen wurde allerdings auch beobachtet, dass genau dieser Kontrollmechanismus für Krebsarten mit hohem Replikationsstress überlebenswichtig sein kann: Dies wurde für myc-induzierte Lymphome und Neuroblastome in Mausmodellen, sowie in Pankreaskarzinomen und Melanomzellen beschrieben (Brooks et al. 2013; Murga et al. 2011; Taylor and Lindsay 2016). Es sind bereits einige Studien zu CHK1 Inhibitoren durchgeführt worden, die sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen (Blasina et al. 2008; Chaudhuri et al. 2014; Taylor and Lindsay 2016).

2.6 Hepatozelluläre Karzinogenese bei *S. mansoni* Infektion

In diversen Studien konnte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines HCC bei Koinfektionen mit *S. mansoni* und dem Hepatitis B und Hepatitis C Virus gezeigt werden (Badawi and Michael 1999; Thun et al. 2017; van Tong et al. 2017). Die sekretierten Ei-Antigene sind Induktoren des Immunsystems und zugleich

hepatotoxisch (Hams, Aviello, and Fallon 2013). Es konnten sowohl intra- als auch extrazelluläre immunmodulatorische Zielstrukturen der Antigene beschrieben werden: SEA hat einen Einfluss auf die Degranulation der Basophilen, kann eine Zytolyse von Leukozyten auslösen, bindet Chemokine zur besseren Granulombildung und induziert die Differenzierung der T-Helferzellen des Immunsystems (Hams, Aviello, and Fallon 2013; Mathieson and Wilson 2010). Wahib et al. demonstrieren eine Korrelation zwischen Hepatosplenomegalie und Hepatitis B und C bei verringerter zellulärer Immunreaktion (van Tong et al. 2017). Die Immunmodulation durch SEA findet auf mehrere Arten statt. Es kommt zu einer Verringerung der spezifischen Immunantwort, Suppression der unspezifischen Immunreaktion sowie Modulation von T-Helferzellen (Palumbo 2007). Die durch Hepatitis B und C verlängerte Infektionszeit der *S. mansoni* Infektion führt zu einem höheren Risiko für Komplikationen und der Entwicklung eines HCC. Des Weiteren konnte unsere Arbeitsgruppe in Zellkulturversuchen eine Aktivierung von c-Jun und Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nach SEA-Stimulation nachweisen (Roderfeld et al. 2020). c-Jun und STAT3 sind mitverantwortlich für die Entstehung der Mutationen während der HCC Entwicklung (El-Serag and Rudolph 2007). Laut tierexperimentellen Studien mit Hepatitis B infizierten Mäusen stellt das Protoonkogen und Transkriptions-faktor c-Jun einen wichtigen Marker für die Proliferation der Hepatozyten und Ausbildung der Dysplasien der HBV-assoziierten Karzinogenese (Trierweiler et al. 2016; Wang and Tai 2016). STAT3 ist im gesunden Gewebe häufig inaktiv und kann durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden (Hirano, Ishihara, and Hibi 2000). In kanzerogenem Lebergewebe findet sich STAT3 häufig dauerhaft aktiviert, allerdings wird bisher klinisch weder zur Prävention noch zur Therapie des HCC ein Jak2/STAT3 Inhibitor eingesetzt (Calvisi et al. 2006; Liu et al. 2017). Die Aktivierung von STAT3 führt zu einer Proliferation der Tumorzellen und Weiterentwicklung des HCC (He et al. 2010; Svinka, Mikulits, and Eferl 2014).

Zusammenfassend lassen sich Hinweise auf einen Zusammenhang einer *S. mansoni* Infektion und der hepatischen Karzinogenese (Entwicklung eines HCCs) finden. Mechanistische Erklärungen und explizite Risikofaktoren für diesen Zusammenhang sind bislang nicht vorgelegt bzw. identifiziert worden (Roderfeld et al. 2020).

2.7 Ziele der Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Pathophysiologie der *S. mansoni* Infektion zu erlangen. Es gilt die Bedeutung des oxidativen Stresses und der Aktivierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege bei chronischer

S. mansoni Infektion zu klären. Hierbei ist besonders interessant, ob in Zellkultur ohne Vorhandensein von Zellen des Immunsystems oxidativer Stress eine Rolle bei der Pathologie der Schistosomiasis spielt. Es sollen zunächst - mit Hinblick auf translationale Anwendbarkeit - Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Glutathion getestet werden. Des Weiteren soll eine mögliche DNA-Schädigung bei *S. mansoni* Infektion in Zellkultur untersucht werden. Hierfür sollen Zellen mit SEA stimuliert werden und anschließend mit Hilfe des Comet-Assays ausgewertet werden. Anhand von Gewebeschnitten und den Markern p-H2AX und CHK1 soll schließlich der Replikationsstress der *S. mansoni* Infektion analysiert werden. Daraus leiten sich für diese Arbeit zwei Hypothesen ab:

- *Schistosoma mansoni* verursacht oxidativen Stress in der Leber, sowie
- *Schistosoma mansoni* dereguliert Zellzyklus Mechanismen und verursacht DNA Schädigung.

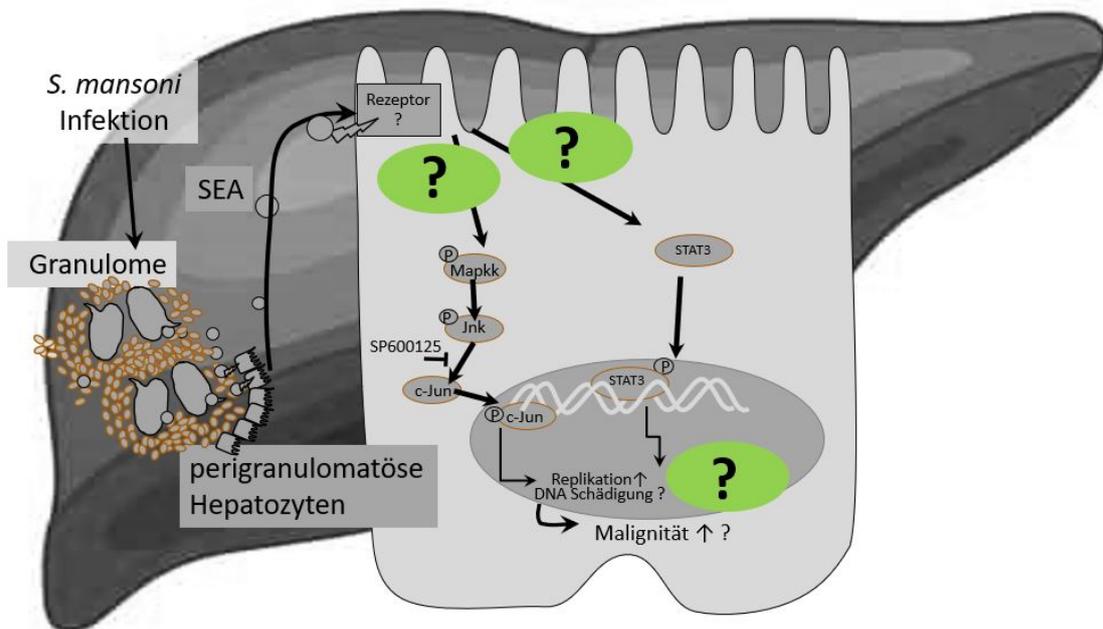


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fragestellung der Dissertation. In grünen Ovalen sind die zu klärenden Fragestellungen der hepatischen Pathophysiologie der *S. mansoni* Infektion dargestellt. Zu untersuchen sind die Wechselwirkungen zwischen oxidativem Stress und den Karzinogenese-assoziierten Signalwegen JNK/STAT3, sowie die potentielle *S. mansoni*-induzierte DNA-Schädigung. Eigene Darstellung

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Biometra-FastblotTM	Biometra-GmbH, Göttingen
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
ebq. 100mc-L/100.26c Vorschaltgerät	Leistungselektronik JENA GmbH, Jena
Electrophoresis Power Supply Consort EV #243	Fisher Bioblock Scientific, Villeneuve-d'Ascq (Frankreich)
Gefrierschrank (-20 °C) #GNP3376	Liebherr-Werk Biberach, Biberach
Gefrierschrank (-80 °C) #907	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
HERACELL 150 i CO2 Incubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Infinite® 200 PRO #30050303	Tecan Group Ltd., Männedorf (Schweiz)
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop #156585	Leica Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer #RCTB 00.084009	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
MIKRO 120 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
Motorisiertes inverses System Mikroskop #IX81S1F-3	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	LO - Laboroptik Ltd, Lancing (Vereinigtes Königreich)
Pipetten Abimed	International Labmate Ltd, St Albans (Vereinigtes Königreich)
Pipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette serologisch 10 mL #607180	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipette serologische 5 mL #606180	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Rocking Platform	VWR International GmbH, Darmstadt
Rüttler #444-0142	VWR International GmbH, Darmstadt
Slamed 8-Kanal Pipette 20-200 µl #451833437	Ratiolab GmbH, Dreieich
Stickstofftank #CFB-160	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Husum-Mildstedt
ThermoMixer #5436	Eppendorf AG, Hamburg

Trans-Blot® Turbo™ System #690BR028141	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Ultra TURRAX T3	IKA-Labortechnik, Staufen
Vortex-Mixer 7-2020	NeoLab, Heidelberg
Vortex Schüttler VF2	IKA-Labortechnik, Staufen
Waage Kern #440-47	KERN & SOHN GmbH, Albstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: 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® 24 Well Cell Culture Plate # 662 160	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™ Flacon™ Zellschaber, 1,8 cm #10707441	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm # 612-1702	VWR International GmbH, Darmstadt
Filterpapier	IKA-Werke, Staufen
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium #F4680-25ML	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immobilon®-P Transfer Membrane #IPVH00010	Merck Millipore Limited, Tullagreen, Carrigtohill ED (Irland)
Microplatte, 96 Well, UV-STAR® #655809 COC, F-BODEN, KAMINFORM, SCHWARZ	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Micro-Touch® #18074824DF	Ansell, Richmond (Australien)
Millex-GV, 0,22 µm, PVDF, 13 mm, durch Ethylenoxid sterilisiert #SLGV013SL	Merck KGaA, Darmstadt
Pipettenpitzen 1000 µL, blau #70.762.010	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µL, farblos #70.1130	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µL, gelb #70.760.012	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 mL #72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 mL #72.691	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Vernichtungsbeutel #86.1197	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumperoxodisulfat #9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA), pH=7 #BSA-1T	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund
Bromphenolblau #15375	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Citronensäure #X863.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® #4720.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dodecylsulfate-Na-salt in pellets #20765.03	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure (Eisessig) 100% #1.00063.1011	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol ROTIPURAN® #9065.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin PUFFERAN® #3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HCL >37%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrochloric acid (HCl) #30721-1L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luminol #A8511-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol #32213-2.5L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Milchpulver (Blotting grade) #T145.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid #3957.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid #6771.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine #35925.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
OPAL™ 520 Reagent Pack, Fluorophor in DMSO #FP1487001KT	Akoya Biosciences, Marlborough (USA)
OPAL™ 570 Reagent Pack, Fluorophor in DMSO #FP1488001KT	Akoya Biosciences, Marlborough (USA)
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder #26619	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
p-Cumarsäure #110M1259V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Polyoxyethylenesorbitan #P-7949	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5: 1) #3029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris base #77-86-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS PUFFERAN® #4855.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30% #1.072.101.000	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol #60242	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.4 Puffer und Lösungen

Kollagen II (50 µg/ml)

20 mM Essigsäure 49,17 ml
Collagen I (3 mg/ml) 833 µl

30 mM H₂O₂

30% H₂O₂ 170 µl
PBS 49,83 ml

Trenngelpuffer (pH 8,8):

2 M Tris/HCL	375 ml
SDS	10 ml
dH ₂ O	115 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

2 M Tris pH 6,8	125 ml
20% SDS	10 ml
dH ₂ O	365 ml

10% Trenngel (für 2 Gele):

Polyacrylamid Gel 30	3332 µl
SDS 10%	100 µl
2 M Tris Puffer pH 8,8	1950 µl
dH ₂ O	4550 µl
APS	100 µl
TEMED	10 µl

3% Sammelgel (für 2 Gele):

Polyacrylamid Gel 30	330 µl
dH ₂ O	2130 µl
Tris Puffer pH 6,8	830 µl
APS	40 µl
TEMED	4 µl

Laufpuffer:

SDS	10 g
Tris	30 g
Glycin	144 g
dH ₂ O	1000 ml
100 ml der Flüssigkeit in 900 ml dH ₂ O gelöst	

Blotpuffer (pH9,2):

Tris-gepuffert	5,82 g
Glycine	2,93 g
dH ₂ O	800 ml
Methanol	200 ml

5% Milchpulverlösung:

Milchpulver	2,5 g
TBS-T	50 ml

TBS-T:

NaCl	20 g
2 M Tris (pH7,5)	25 ml
dH ₂ O	2475 ml
Tween20	2,5 ml

Lämmli-Puffer:

Glycerin 40%	20 ml
0,25 M Tris HCl pH6,8	6,25 ml
SDS	4 g
DTT	3,08 g
Bromphenolblau	10 mg

dH₂O 10 ml

HRP Entwicklerlösung (ECL):

dH₂O 9500 µl
Tris Puffer 2 M pH 8,5 500 µl
Luminol 50 µl
Courmaic acid 25 µl
H₂O₂ 2,6 µl
(unmittelbar vor Entwicklung)

TBA-Lösung

TBA Flasche (MDA Kit) 1
Essigsäure 7,5 ml
Auf 25 ml mit dH₂O auffüllen

Lysepuffer (Comet)

NaCl 14,6 g
EDTA Lösung (Kit) 20 ml
10x Lyse Lösung (Kit) 10 ml
DMSO 10 ml
dH₂O auf 90 ml auffüllen
mit 10 N NaOH auf pH 10,0 einstellen, anschließend auf 100 ml mit dH₂O auffüllen

Alkaline Lösung (Comet)

NaOH 12 g
EDTA Lösung (Kit) 2 ml
dH₂O auf 1 L auffüllen

TE Puffer pH 7,5 (Comet)

2 M Tris 250 µl
500 mM EDTA 100 µl
dH₂O 49,65 ml
mit rauchender Kochsalzlösung auf pH 7,5 einstellen

Citratpuffer

Zitronensäure 2,65 g
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 25,7 g
dH₂O auf 1000 ml auffüllen
100 ml der Flüssigkeit in 900 ml dH₂O gelöst

PBS

NaCl 80 g
KCL 2 g
KH₂PO₄ 2,45 g
Na₂HPO₄ 11,5 g
dH₂O auf 1000 ml auffüllen
100 ml der Flüssigkeit in 900 ml dH₂O gelöst, pH auf 7,4 einstellen

3.1.5 Antikörper

Die in der Tabelle 4 aufgelisteten Antikörper wurden durchweg für Western Blot Analysen verwendet. Drei primäre und ein sekundärer Antikörper, die jeweils mit IF

(=Immunfluoreszenz) gekennzeichnet sind, wurden für die Immunhistochemie verwendet.

Tabelle 4: Antikörper

Primärantikörper	
Acetyl-CoA Synthetase 2 (1:2.000 Milch 5%) Molekulargewicht: 79 kDa	Rabbit polyclonal Nr.:16087-1-AP Proteintech Group Inc., Rosemont (USA)
CHK1 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 36 kDa	Mouse monoclonal IgG1 Nr.:2360S Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
c-jun (1:1.000 Milch 5%) Molekulargewicht: 48 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:9165 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
Cyclin D1 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 36 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:2978 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
GAPDH (1:10.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 36 kDa	Mouse monoclonal IgG2b Nr.: 60004-1-Ig Proteintech Group Inc., Rosemont (USA)
Katalase (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 60 kDa	Rabbit Nr.:GTX110704 GeneTex, Inc., Irvine (USA)
Ki67 (IF: 1:1.000 BSA 10%)	Rabbit monoclonal IgG Nr.:RM-9106-SO Thermo NeoMarkers
MCM2 (IF: 1:200 BSA 10%)	Rabbit polyclonal Nr.:4007 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
Lamin A/C (1:2.000 Milch 5%) Molekulargewicht: 74 (A) 63 (C) kDa	Mouse monoclonal IgG2a Nr.:4777 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
p27 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 27 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:3686 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
p44/42 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 42/44 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:4695 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
p53 (1:1.000 Milch 5%) Molekulargewicht: 53 kDa	Mouse monoclonal IgG1 Nr.:2524 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
p-CHK1 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 56 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.: 2348 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
p-c-jun (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 48 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:3270 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
PCNA (1:2.000 Milch 5%) Molekulargewicht: 36 kDa	Mouse monoclonal IgG2a Nr.:2586 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
p-H2AX (WB: 1:500 Milch 5%, IF: 1:1.000 BSA 10%) Molekulargewicht: 15 kDa	Rabbit monoclonal Nr.:2212-1 Epitomics, Inc., Burlingame (USA)
p-p44/42 (1:2.000 Milch 5%) Molekulargewicht: 42/44 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:4370 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)

p-STAT3 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 86 kDa	Rabbit polyclonal Nr.:9134 Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
STAT3 (1:1.000 BSA 5%) Molekulargewicht: 86 kDa	Rabbit monoclonal IgG Nr.:4904S Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA)
Sekundärantikörper	
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP Verdünnung 1:5000 BSA 5%	Spezies: Mouse polyclonal antibody Artikelnummer: A16072 Firma: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (USA)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP Verdünnung 1:5000 BSA 5%	Spezies: Rabbit polyclonal antibody Artikelnummer: A16104 Firma: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (USA)
ImmPRESS™ AP Reagent Kit (IF) Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, HRP	Spezies: Rabbit polyclonal antibody Artikelnummer: MP-5401 Firma: Linaris, Dossenheim

3.1.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 5: Kommerzielle Kits

Comet Assay Kit (3-well slides)	Firma: abcam Artikelnummer: ab238544
Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit	Firma: Sigma-Aldrich Artikelnummer: MAK085-1KT
NE-PER™ Extraktions-Kit für nukleares und zytoplasmatisches Protein	Firma: Thermo Scientific™ Artikelnummer: 78833

3.1.7 Zelllinie

Tabelle 6: Zelllinie

HepG2 Zellen	
Firma	CLS Cell lines services GmbH, Eppelheim
Produktnummer	300198
Organismus	Homo sapiens (human)
Herkunft (Ethnie)	Kaukasus
Alter	15 Jahre
Geschlecht	Männlich
Gewebe	Leber
Morphologie	Epithelial
Zelltyp	Hepatoblastom (HCC)
Wachstumseigenschaften	Einzelschicht, adhären

3.1.8 Medien, Inhibitoren und Zusatzstoffe

Tabelle 7: Medien, Inhibitoren und Zusatzstoffe

Catalase from bovine liver #C9322-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM, w: 4.5 g/L Glucose, w: stable Glutamine, w: Sodium pyruvate, w: 3.7 g/L NaHCO ₃ #P04-04510	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 20 ml #A10483-01	Life Technologies, Carlsbad (USA)
JNK Inhibitor II (SP600125)	CAS 129-56-6 Firma: Calbiochem Research Biochemicals, Life Science Research, Merck (Darmstadt)
L-Glutathione reduced #G6013-5G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pencillin/Streptomycin/Ampotericin B Mix #P06-07350	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypan Blue Stain 0.4 % #15250	Gibco™, Carlsbad, Kalifornien (USA)
Trypsin/EDTA #P10-0231 SP	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

Durch die Kooperation mit Dr. Gabriele Schramm vom Forschungszentrum Borstel-Leibniz-Lungenzentrum (FZB) wurde das SEA für Stimulationsversuche zur Verfügung gestellt. Das gelieferte SEA wurde stets in der Konzentration 1,52 mg/ml in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst.

3.1.9 Versuchstiere (Hamster)

Die Goldhamster stammen aus dem Tierstall des Instituts für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Schubertstraße 81, 35392 Gießen, welches unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Christoph G. Grevelding steht. Die vorliegende Studie beschränkt sich auf weibliche Hamster als Wirt, um die Durchführbarkeit der Versuche zu gewährleisten und die Probenmenge überschaubar zu halten.

Es wurden drei unterschiedlich behandelte Hamstergruppen für die Versuche verwendet: nicht infizierte Tiere, mit Zerkarien eines Geschlechts des *S. mansoni* infizierter Tiere (fortan als monosex bezeichnet), sowie mit männlichen und weiblichen Pärchenegeln infizierte Hamster (fortan als bisex bezeichnet). Dies ermöglicht eine isolierte Betrachtung des Effektes der *S. mansoni* Eier auf den Wirt im Vergleich der Gruppen bisex und monosex infizierter Hamster, da die Paarung der Würmer der beiden Geschlechter zu einer Reifung und Ei Produktion führt. Bei der Gruppe monosex infizierter Hamster kommt es zu einer Infektion ohne *S. mansoni* Eier.

(Geschäftszeichen des Tierversuchantrags: V 54-19c 20 15h 02 GI 18/10 Nr. A 1/2014)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur mit HepG2 Zellen

Die HepG2 Zellen wurden in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Für Zellkulturversuche wurden die Zellen aufgetaut, in Medium über mehrere Wochen kultiviert und schließlich an Versuchstagen ausgesät. Die Stimulation und finale Gewinnung der Zellproben wird in den folgenden Kapiteln zu den einzelnen Versuchen im Detail beschrieben.

Zur Verwendung der Zelllinie wurde die Probe dem Stickstofftank entnommen und das Zentrifugenröhrchen wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis sich der Inhalt vom Rand löste. Der Eisklumpen wurde zum vollständigen Auftauen in eine Zellkulturschale mit 10 ml frisch erwärmten Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusätzen gegeben. Nach jeweils 24 Stunden wurde das Medium zweimal gewechselt.

3.2.1.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen

Die Kultivierung der HepG2 Zellen erfolgte stets in serumhaltigem DMEM mit 10% Serum und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C in einer Zellkulturschale mit 58 cm^2 Wachstumsfläche. Das Medium wurde vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Es erfolgte eine Passagierung 1-2mal wöchentlich je nach Wachstumsdichte.

Zunächst wurde hierfür der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Die Zellen wurden mit steriler PBS dreimal gewaschen. Es folgte die Inkubation für etwa 5 Minuten im Brutschrank mit 1 ml Trypsin-EDTA behandelt. Während der Inkubation wurde eine neue Schale beschriftet und mit ca. 5 ml Kollagen II benetzt. Das Kollagen wurde sorgfältig abgesaugt und 10 ml frisches Medium wurde vorgelegt. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurde die Reaktion mit 9 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension wurde mehrfach auf und abpipettiert. Es erfolgte die Überführung von 1 ml Zellsuspension in die neue vorbereitete Schale.

Für die Aussaat wurde nach dem dreimaligen Waschen mit PBS 2 ml Trypsin-EDTA in die Schale pipettiert und die Zellen wurden für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Je nach Dichte der Zellen, wurden 3-4 ml Medium zugegeben und dieses auf- und abpipettiert zum Lösen der Zellen. Mit 11 ml frischem Medium wurde 1 ml der Zellsuspension in einen sterilen Falcon gefüllt. In die 24-well-Platten wurde jeweils $500\ \mu\text{l}$ der Suspension ausgesät. Für den Comet-Assay wurde die 12-Well-Platte mit Kollagen benetzt wie oben beschrieben und es wurde 1 ml pro Well ausgesät. Dieses Vorgehen ermöglichte eine dauerhafte Wachstumsdichte von ca. 100.000 Zellen pro Well.

3.2.1.2 Stimulations- und Inhibitionsversuche

Am Vortag der Stimulations- und Inhibitionsversuche wurden die Zellen auf serumfreies DMEM ohne Zusätze umgesetzt und lichtmikroskopisch kontrolliert. Nur gleichmäßig bewachsene Platten ohne Kontamination wurden für die Versuche verwendet.

Für Stimulationen der Zellen wurde SEA verwendet, welches bei -80°C gelagert und erst unmittelbar vor der Stimulation aufgetaut wurde. Es erfolgte die Zugabe von $2\ \mu\text{l}$ SEA pro $200\ \mu\text{l}$ Medium. Daraus ergab sich eine Konzentration von $4,6\ \mu\text{g/ml}$ SEA in Medium. Als Kontrolle wurden gleichartig kultivierten Zellen in $200\ \mu\text{l}$ Medium $2\ \mu\text{l}$ PBS zugegeben. Das hier zugefügte PBS wurde bereits in Borstel zum Lösen der Ei-Antigene verwendet. Es erfolgte eine Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank.

Inhibitionsversuche wurden mit reduziertem Glutathion durchgeführt. Dieses wurde stets im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am Tag der Inkubation wurde eine Verdünnung in der Konzentration von $10\ \text{mM}$ hergestellt (z.B. $3,07\ \text{mg}$ in $1\ \text{ml}$ DMEM). Auf einer 12-Wellplatte wurde pro Well jeweils $400\ \mu\text{l}$ Ansatz und auf der 24-Well-Platte dem Volumen entsprechend $200\ \mu\text{l}$ zugeführt. Zur Kontrolle wurden äquivalent Wells ausschließlich mit serumfreiem DMEM ohne GSH behandelt. Es erfolgte die Zugabe von SEA oder PBS direkt in jedes Well (jeweils $2\ \mu\text{l}$ pro $200\ \mu\text{l}$ Ansatz).

Für Inhibitionsversuche mit dem JNK2 Inhibitor wurde zunächst eine $1/2000$ Verdünnung der Stammlösung des Inhibitors (Konzentration von $20\ \text{mM}$) sowie der DMSO-Kontrolle auf eine Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ in DMEM vorbereitet. Diese Ansätze wurden in unterschiedlichen Mikroreaktionsgefäßen mit SEA oder PBS vermischt (jeweils $2\ \mu\text{l}$ pro $200\ \mu\text{l}$ Ansatz). Die 12/24-Well Platte wurde aus dem Brutschrank genommen, das Medium abgesaugt und es wurde entsprechend der Beschriftung (siehe Anhang Abb. 29-31) einer der vier Ansätze zu den Zellen pipettiert und für 24 Stunden inkubiert. Der 12-Wellplatte wurde pro Well jeweils $40\ \mu\text{l}$ Ansatz und der 24-Well-Platte dem Volumen entsprechend $200\ \mu\text{l}$ zugeführt.

Für den Comet-Assay wurde das Protokoll leicht verändert. Insgesamt wurden die Zellen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit SEA stimuliert. Es erfolgte am Tag des Mediumwechsels auf serumfreies DMEM bereits eine Stimulation mit SEA oder die Zugabe von PBS. Die Stimulanzien wurden in doppelter Konzentration eingesetzt, $10\ \mu\text{l}$ pro $500\ \mu\text{l}$ Ansatz (siehe Anhang Abb. 32 für Auftragungsschema).

3.2.2 Konservierung des Hamsterlebergewebes nach Perfusion

Durch die Kooperation mit dem Institut von Prof. Grevelding, Parasitologie der JLU Gießen, erhielten wir Hamsterlebern der drei folgenden Gruppen: bisex (infiziert), monosex (infiziert) und nicht infiziert. Die Lebern wurden in situ perfundiert, sofort nach der Explantation mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und nativ als Gewebeschnitt oder zu Pulver auf Eis gemörsert verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.3 Photometrische Methoden

3.2.3.1 Messung des Biomarkers Malondialdehyd

Die Messung des Biomarkers Malondialdehyd wurde in Anlehnung an die Methode nach Gutteridge und Halliwell durchgeführt (Gutteridge and Halliwell 1990; Tsikas 2017). Hierfür wurden die Proben mit einem Lysepuffer homogenisiert, Thiobarbitursäurelösung (TBA) wurde zugegeben und es bildeten sich innerhalb einer Stunde bei 100°C Komplexe aus TBA und MDA. Diese Komplexe haben die Eigenschaft Licht bei ~ 530 nm bei saurem pH ($\text{pH} < 3$) zu absorbieren. Dies wurde als Messprinzip im eingesetzten Assay verwendet. Zur späteren Quantifizierung der MDA Spiegel in nmol MDA wurde ein bekannter MDA Standard hergestellt und mit den gemessenen Absorptionswerten zu einer Trendlinie formatiert (siehe Kapitel 3.2.6). Die MDA Spiegel der Proben ermöglichen Rückschlüsse auf den oxidativen Stress der Zellen bzw. Hamsterleberproben (siehe Kapitel 2.2.3).

Für die MDA Messung wurde das Assay Kit MAK085 mit einem modifizierten Standard verwendet. Der final eingesetzte Lysepuffer wurde aus dem mitgelieferten Lysepuffer und Butylhydroxytoluol (BHT) im Verhältnis 100/1 hergestellt.

3.2.3.1.1 Vorbereitung des Standards und der Proben

3.2.3.1.1.1 Gewinnung der Hamsterleberstandards und -proben

Zur späteren Quantifizierung der MDA Level der Leberproben wurde ein bekannter MDA Standard hergestellt indem zunächst 5 μl einer 4,17 M MDA Lösung in 814 μl destilliertem Wasser verdünnt wurden und in einem zweiten Schritt wurden 20 μl der ersten Verdünnung mit 980 μl destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden 0, 2, 4, 6, 8 und 10 μl der zweiten Verdünnung in Reaktionsgefäße pipettiert und auf 200 μl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Daraus ergaben sich Standard MDA Proben mit 0, 1, 2, 3, 4 und 5 nmol MDA. Es wurde ca. 20 mg Leberpulver eingewogen, mit 300 μl des Lysepuffers unter Verwendung des Dispergierers, dem Ultraturrax®, homogenisiert und auf Eis gestellt.

3.2.3.1.1.2 Gewinnung der Zellkulturstandards und -proben

Für den MDA Standard der Zellkulturversuche wurde zunächst 5 µl der 4,17 M MDA Lösung in 814 µl destilliertem Wasser verdünnt und in einem zweiten Schritt 4 µl der ersten Verdünnung mit 980µl destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden 0, 1, 2, 3, 5, 10 und 20 µl der zweiten Verdünnung in Reaktionsgefäße pipettiert und auf 200 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Daraus ergaben sich Standard MDA Proben mit 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1 und 2 nmol MDA. Die 24-Well-Platte wurde jeweils einzeln abgesaugt, 150 µl des Lysepuffers mit abgeschnittener Pipettenspitze ins Well pipettiert und anschließend wurde mit Hilfe der Pipettenspitze am Boden der Platte manipuliert zur Zellyse. Die Zellsuspension wurde auf Eis in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß überführt.

3.2.3.1.2 Thiobarbitursäure Zugabe und photometrische Auswertung

Aus Kostengründen wurde bei den folgenden Schritten der Zellkulturversuche die Menge der eingesetzten Chemikalien halbiert. Die Proben wurden 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und jeweils 200 µl (100 µl im Zellkulturversuch) Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße abpipettiert. Jeweils 300 µl bzw. 150 µl der vorbereiteten Thiobarbitursäurelösung (TBA) wurde dem Überstand zugeführt und vermischt. Die Proben wurden bei 95°C für eine Stunde auf dem Heizblock inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Hamsterleberproben und die Standardvergleichsproben wurden durch einen 0,22 µm Polyvinylidenfluorid Filter gegeben. Anschließend wurden jeweils 200 µl der Ansätze in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Proben wurden mit Hilfe des Infinite® Plattenlesegerät bei einer Absorption von 532 nm Wellenlänge gemessen.

3.2.3.2 Bestimmung der Katalase-Aktivität

Die Messung der Katalase-Aktivität *in vitro* wurde nach der Methode von Aebi 1984 durchgeführt und leicht modifiziert (Aebi 1984). Das Messprinzip beruht hierbei auf der enzymatischen Reaktion der Katalase, welche Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umwandelt. Die Zersetzung des Wasserstoffperoxids kann direkt durch eine verringerte Absorption des ultravioletten Lichts bei 240 nm photospektrometrisch gemessen werden. Hierbei gilt die Differenz der Absorptionswerte als Parameter zur Einschätzung der Aktivität der Katalase. Zur späteren Quantifizierung der Katalase-Aktivität in µg Katalase pro ml Hamsterleberprobe wurde ein bekannter Katalase Standard hergestellt und mit den gemessenen Absorptionsdifferenzen zu einer Trendlinie formatiert (siehe Kapitel 3.2.6). Die Aktivität der Katalase ermöglicht

Rückschlüsse auf das Kompensationsverhalten der Leber in Bezug auf Dysbalance des Redoxsystems wie zum Beispiel erhöhten oxidativen Stress.

3.2.3.2.1 Herstellung der Proben

Zur späteren Quantifizierung der Katalase-Aktivität wurde ein bekannter Katalase Standard hergestellt. Dazu wurden zunächst 5 mg Katalasepulver in 5 ml PBS gelöst. Aus der Lösung wurden drei Verdünnungen gewonnen: 100, 1.000, und 100.000 fach in steril filtriertem PBS verdünnt. In einem weiteren Schritt wurden die Verdünnungen weiter in PBS verdünnt und somit ergaben sich schließlich Standardproben mit 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,33, 0,66, 1 und 5 µg Katalase pro ml.

Für die Hamsterleberproben wurde 10-20 mg Leberpulver eingewogen und mit 1% Tritonlösung in PBS aufgefüllt (10 mg = 200 µl Tritonlösung). Die Proben wurden mit einem Dispergierer homogenisiert und für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde eine Verdünnung aus 10 µl Leberprobe mit 990 µl steril filtriertem PBS hergestellt.

Jeweils 150 µl der verdünnten Proben, Standards und der PBS Kontrolle wurden in eine UV-Messplatte pipettiert und Luftblasen entfernt.

3.2.3.2.2 Photometrische Auswertung

Unmittelbar vor der Auswertung wurden zum Start der Reaktion mit einer Mehrkanalpipette 75 µl einer 30 mM Wasserstoffperoxidlösung den Leber- und Katalasestandardproben zugegeben. Die PBS Negativkontrolle wurde hierbei ausgespart. Die Platte wurde in das Plattenspektrophotometer eingelegt und in wiederholt zyklischen Messungen über 70 Sekunden wurde bei einer Wellenlänge von 240 nm die H₂O₂ Absorption bestimmt. Durch das Mitführen von Proben mit bekannten Mengen Katalase in µg pro ml Proteinlysat und den ermittelten zugehörigen Absorptionsdifferenzen im Abstand von 30 Sekunden konnte eine Trendlinie erstellt werden. Dies ermöglichte die Zuteilung der H₂O₂ Absorption der Hamsterproben zu der Menge Katalase in µg.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse ist ein Verfahren, welches durch Proteinübertragung auf eine Trägermatrix den Nachweis einzelner Proteine ermöglicht. Hierfür ist eine Auftrennung des Proteingemischs nach Molekulargewicht nötig. Die Proben werden zur Denaturierung und Einfärbung zu Beginn in Lämmli-puffer aufgenommen, durch ein

Polyacrylamidgel elektrophoretisch entsprechend der Molekülmasse aufgetrennt und im Anschluss auf eine Membran transferiert. Die Verwendung einer Ladekontrolle, die übereinstimmende Proteinmengen der einzelnen Proben sicherstellt, ermöglicht Aussagen über die Expressionslevel einzelner Proteine in den unterschiedlichen Proben.

3.2.4.1.1 Gewinnung von Lysaten

Für die Leberprobenlysate wurden 50 mg gefrorenes Leberpulver mit 1 ml Lämmli-puffer vermischt. Mit dem Dispergierer wurden die Proben homogenisiert und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die Reagenzgefäße wurden am Folgetag 10 Minuten bei 99°C in den Heizblock gestellt. Im Anschluss wurden die Lysate 10 Minuten bei 140.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und für die Versuche bei -20°C gelagert.

Zur Unterscheidung der Proteinlevel im Zellkern und -plasma wurden nukleäre und zytoplasmatische Extrakte hergestellt. Es wurde das Thermo Scientific™ NE-PER™ Extraktions-Kit für nukleares und zytoplasmatisches Protein verwendet (siehe Tabelle 5). Durch Zugabe der ersten zwei Reagenzien wurde durch Lyse der Zellmembran der zytoplasmatische Zellinhalt freigesetzt und Zentrifugationsschritte ermöglichten eine Aufteilung der Proteinfractionen. Nach der Separation des intakten Nukleus und des zytoplasmatischen Extrakts, wurden im letzten Schritt die Proteine aus dem Nukleus extrahiert. Diese Methodik erlaubte eine Unterscheidung zwischen der nukleären und zytoplasmatischen Proteinfraction. Da die Acetyl-CoA Synthetase 2 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma exprimiert wird, war hier zur Bewertung des Proteins eine Extraktion der beiden Proteinfractionen interessant. Dazu wurden etwa 25 mg Hamsterleberpulver in Reagenzgefäße eingewogen. Es wurden 250 µl Cytoplasmic Extraction Reagent (CER) I zugegeben, vermischt und anschließend zehn Minuten auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurde 13,75 µl CER II hinzugegeben und nach kurzem Vermischen für eine Minute inkubiert. Nachdem das Reagenzgefäß fünf Minuten bei 16.000 g zentrifugiert wurde, überführten wir den Überstand (=zytoplasmatisches Extrakt) in ein neues Reagenzgefäß und es wurde auf Eis gestellt. Der unlöslichen Fraktion wurden 125 µl Nuclear Extraction Reagent (NER) zugegeben und das Reagenzgefäß wurde über insgesamt 40 Minuten alle zehn Minuten für 15 Sekunden gemischt. Es folgte eine abschließende Zentrifugation bei 16.000 g für 10 Minuten. Der Überstand (=nukleäres Extrakt) wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt. Beide Extrakte wurden in 20 µl aliquotiert bei -80°C eingefroren. Vor der Verwendung wurde 20 µl Lämmli-puffer hinzugefügt.

Zur Gewinnung der Zellkulturlysate wurden nach dem Absaugen der Wells 60 µl Lämmli-Puffer zur Lyse auf die Zellen pipettiert. Eine abgeschnittene 200 µl Pipettenspitze wurde zur Manipulation am Boden der Wells benutzt um die Zellen zu lösen. Das Lysat aus Zellen und dem Puffer wurde mehrfach auf- und ab pipettiert um die Zellyse und Denaturierung zu fördern und schließlich in ein Reaktionsgefäß gefüllt. Bei 95°C wurde das Lysat anschließend für 10 Minuten erhitzt auf dem Heizblock. Hierbei wurde eine einmalige Entlüftung zum Druckausgleich der Deckel nach einer Minute durchgeführt. Die Lysate wurden zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Vor dem jeweiligen Auftragen auf die Gelplatte wurden die Lysate jeweils 5 Minuten auf dem Heizblock erhitzt, gemischt und anschließend für etwa 13 Sekunden bei bis zu 10.000 g zentrifugiert.

3.2.4.1.2 Proteinseparation durch SDS-Page

Der Übertragung der Proteine auf eine Trägermatrix, dem eigentlichen „Blotting“, ist eine Proteinseparation vorgeschaltet um die Auftrennung der Proteine sicherzustellen. Diese isoeletrische Fokussierung erlaubt die eindeutige Zuteilung der Bande im Western Blot in kDa zu ihrem entsprechenden Protein. Es wurde eine "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" (SDS-Page) durchgeführt. Durch die Zugabe der starken Detergens SDS sind die denaturierten Proteine stark negativ geladen und deren Ladung ist proportional zur Masse. Das Polyacrylamidgel dient bei der späteren Elektrophorese als molekulares Sieb. Ein bekannter Marker der Proteinmassen wird aufgetragen zur Kontrolle der Banden.

3.2.4.1.2.1 Herstellung des Gels

Die Gelplatten setzen sich aus zwei Hauptbestandteilen zusammen: dem Trenngel für die Proteinauftrennung und dem Sammelgel, auf welches im Anschluss die Proben aufgetragen wurden. Die Trenngellösung wurde bis etwa 1,5 cm unter den Rand der Glasplatten gefüllt und für einen glatten Abschluss mit Ethanol bis zum oberen Rand aufgefüllt. Nach 20-minütiger Polymerisationszeit wurde das Ethanol abgegossen und Reste mit Papier entfernt. Die Sammelgellösung wurde anschließend eingefüllt und ein Plastiktaschenkamm wurde für 20 Minuten Polymerisation eingebracht. Der Taschenkamm ermöglichte die Aussparung von Geltaschen zum Einfüllen der jeweiligen Lysate.

3.2.4.1.2.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach Entfernen des Taschenkamms wurden die Aussparungen mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Glasplatten im Elektrodenrahmen fixiert und anschließend in einen Puffertank eingesetzt. Dieser wurde bereits mit Laufpuffer befüllt. Es wurde 7 µl des Proteinbandenmarkers zur Markierung des Molekulargewichts in die erste Tasche gefüllt und jeweils 10 µl der Proben in die weiteren Taschen gegeben. Der Elektrodenrahmen wurde ebenfalls mit Laufpuffer befüllt. Der Spannungsgeber wurde auf 100 V eingestellt für etwa 10 Minuten und im Anschluss für ungefähr eine Stunde auf 130 V hochgestellt bis der Proteinmarker das Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.4.1.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Dieser Abschnitt beschreibt den Blotting Schritt: das Übertragen der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermatrix. Es wurde ein zweites senkrechtes elektrisches Feld angeschlossen, entlang dessen Spannung die negativ geladenen Proteine zur Anode wanderten. Hierzu wurde ein Semi-Dry-Blot Transfer mit durchnässten Filterpapieren gewählt. Die Übertragung auf eine Trägermatrix wurde durchgeführt, um die spätere Bindung der Antikörper zu ermöglichen und eine stabile Oberfläche zu bekommen.

Die nun auf dem Gel gewonnene Proteinseparation wurde in einem weiteren Schritt auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) übertragen. Zunächst wurde die Membran für drei Sekunden in Methanol gelegt, was der hydrophoben Membran den Kontakt zum Puffer ermöglichte. Anschließend wurde die Membran mit destilliertem Wasser gespült. Sie wurde in einem Gefäß mit Blotpuffer feucht gehalten.

Das Polyacrylamid Gel wurde mit einem Plastikkeil von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel entfernt. Das Gel mit dem aufgetrennten Proteingemisch wurde schwimmend in Blotpuffer gelegt. Im Anschluss wurden sechs Whatman-Papiere in Blotpuffer getränkt. Die Zusammensetzung für den Blot bestand in folgender Reihenfolge aus drei getränkten Whatman-Papieren, der Membran, dem Gel und anschließend wieder drei Whatman-Papieren. Diese wurden blasenfrei in den Trans-Blot gegeben, welcher für 35 Minuten bei 120 mA mit zwei Membran-Gel Teilen beladen lief.

3.2.4.1.4 Immunchemischer Nachweis der spezifischen Proteine

Zur Durchführung einer semiquantitativen Proteinanalyse wurde eine Immundetektion mit ausgewählten Antikörpern durchgeführt (siehe Tabelle 4). Hierzu waren sechs Einzelschritte nötig: Die freien Bindungsstellen der Membran wurden mit Milch blockiert, die Membran wurde in einer Lösung mit einem primären spezifischen Antikörper inkubiert. Folgend wurden die unspezifisch gebundenen Antikörper

abgewaschen und ein zweiter Inkubationsschritt mit dem konjugierten Horseradish Peroxidase Sekundärantikörper durchgeführt. Dieser ermöglicht nach einem finalen Waschschrift die Detektion der Proteinbanden durch eine Lumineszenzreaktion. Die abschließende densitometrische Auswertung ermöglicht semiquantitative Aussagen zum Vergleich der Proteinmengen unterschiedlicher Proben.

Während der weiteren Behandlung der Membran wurde diese durchgängig nach jeder Intervention wieder auf einen Kippschüttler Stufe 30 gestellt.

Zur Blockierung der freien Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde mit 5% Milchpulverlösung blockiert und anschließend dreimal mit TBS-T Puffer gewaschen (jeweils 10 Minuten). Es erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 4) über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde mit TBS-T Puffer dreimal für jeweils zehn Minuten gewaschen und im Anschluss der Sekundärantikörper in 1:5000 Verdünnung in Milchpulverlösung hinzugegeben für eine Stunde. Nach den letzten drei Waschschriften mit TBS-T für jeweils zehn Minuten wurde die Membran schließlich mit der hergestellten HRP Lösung mit „enhanced chemiluminescent“ (=ECL) getränkt für eine Minute. Es kommt zum Start der chemischen Reaktion, bei der die Horseradish Peroxidase (=HRP) eine Oxidation des Luminols durchführt und eine Lichtreaktions-Detektion ermöglicht. Die Detektionszeit der spezifischen Proteine des jeweiligen Antikörpers betrug zwischen 6 Sekunden und 30 Minuten pro Membran.

Eine Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Geltaschen sowie der korrekten Übertragung der Proteine auf die Membran wurde mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt, da dieses in vielen Zellen auf hohem Level konstitutiv exprimiert wird.

Zur erneuten Verwendung der Membran wurde für 20 Minuten 5 ml Stripping Puffer auf die Membran gegeben und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit 5% Milchpulverlösung über 30 Minuten erneut geblockt und war nach weiteren drei Waschdurchgängen mit TBS-T für jeweils 10 Minuten wieder verwendbar.

3.2.5 Immunfluoreszierende Methoden

3.2.5.1 Comet-Assay

Der Comet-Assay ist eine Einzelzellelektrophorese, die DNA-Schäden direkt sichtbar macht (Singh et al. 1988). Mithilfe der Fluoreszenzmessung kann der Schaden an der DNA quantifiziert werden (Møller 2018). Die Zellen werden auf eine dünne

Agaroseschicht gegeben, elektrophoretisch behandelt und anschließend fluoreszierend eingefärbt (Fairbairn, Olive, and O'Neill 1995). Die DNA-Fragmente wandern entlang des elektrischen Feldes zur Anode und führen nach der Anfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoff zu einem sichtbaren Schweif (engl. Comet). Dieser Schweif gab dem Assay schließlich seinen Namen. Für die Positivkontrolle der oxidativen Schädigung kann H_2O_2 verwendet werden (Collins et al. 1996). Die Verwendung einer alkalischen Lösung ermöglicht eine Verbesserung der Sensitivität bei der Erfassung der DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche gegenüber der pH neutralen ursprünglichen Variante (Collins et al. 1997), da die DNA in Einzelsträngen denaturiert vorliegt.

Die alkalische Lösung, der Lysepuffer, destilliertes Wasser und 70% Ethanol wurden dauerhaft bei 4°C gelagert. Die Agarosegefäßflasche wurde 35 Minuten bei 99°C im Trockenofen erwärmt und anschließend im Wasserbad bis zur Verwendung bei 37°C gelagert

3.2.5.1.1 Gewinnung der Zellen

Die Wells wurden mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und einmal mit gekühlter, steriler PBS gewaschen. Es wurde 1 ml PBS auf die Zellen pipettiert und diese anschließend mit einem Zellschaber vorsichtig vom Boden gelöst. Die Proben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Für die Positivkontrolle wurde 1 ml 100 μ M Wasserstoffperoxidlösung auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde bei 4°C 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurden diese Zellen ebenfalls gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und nach dem Ablösen in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzahl aller Proben wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Dazu wurden 25 μ l der Zellsuspension mit 2 μ l Trypanblau in einem frischen Reaktionsgefäß vermischt. Die PBS Zugabe wurde berechnet, um die Zellzahl für den weiteren Versuch zu normieren.

Rechnung: gezählte Zellen \times 2,5 \times 1000 \times 2 = Zellzahl pro 1 ml PBS
 $1 / 200 \times$ Zellzahl in 1 ml PBS = Zugabe PBS nach Zentrifugation

Die Proben wurden bei 700 g für zwei Minuten zentrifugiert um die Zellen vom Überstand zu trennen. Danach wurde der Überstand abgenommen und die berechnete Menge PBS zugegeben. Diese Normierung auf 10^5 Zellen pro 1 ml PBS, ermöglichte eine gleichmäßige Auftragung der Zellen pro Gel und verhinderte eine Überladung an Zellen, die eine Auswertung erschweren könnte.

3.2.5.1.2 Auftragung des Agarosegels

Zu Beginn des Versuchstages wurden jeweils 75 µl des flüssigen Agarosegels zu drei gleichmäßigen Basisschichten auf einen Objektträger blasenfrei aufgetragen und für 20 Minuten bei 4°C gekühlt.

180 µl des flüssigen Agarosegels wurden mit 20 µl der Zellproben in einem frischen Reaktionsgefäß vermischt und dauerhaft bei 37°C im Wasserbad flüssig gehalten.

Jeweils 75 µl der Zell-Agarose-Mischung wurde auf die Basisschicht auf den Objektträgern in Doppelbestimmung blasenfrei aufgetragen. Die Objektträger wurden im Anschluss 20 Minuten bei 4°C gekühlt.

3.2.5.1.3 Lyse und Inkubation der Zellen

Die Objektträger wurden für die weiteren Schritte dunkel bei 4°C in einer Inkubationskammer gelagert um UV-Schäden der DNA ausschließen zu können. Die Objektträger wurden vollständig mit Lysepuffer bedeckt und zur Zellyse eine Stunde inkubiert. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Puffers wurden die Objektträger mit einer alkalinen Lösung bedeckt und 30 Minuten inkubiert.

3.2.5.1.4 Durchführung der Gel-Elektrophorese

Die horizontale Elektrophoresekammer wurde ohne die Proben mit der alkalinen Lösung befüllt, bis die Anzeige bei 18 V konstant 300 mA anzeigte. So konnte eine gleichmäßige Spannung über die gesamte Elektrophoresezeit ermöglicht werden. Die Objektträger wurden in die Kammer gelegt und die Elektrophorese lief eine Stunde. Hierbei wandern die DNA-Bruchstücke durch das Agarosegel zur Anode und werden der Größe nach aufgetrennt. Die Proben wurden im Anschluss wieder in die Inkubationskammer überführt. Die Objektträger wurden dreimal für zwei Minuten mit destilliertem Wasser komplett benetzt und anschließend zur Konservierung fünf Minuten in 70% Ethanol inkubiert. Die Proben wurden im Dunkeln unter dem Abzug eine Stunde zum Trocknen gelegt.

3.2.5.1.5 Einfärbung und Auswertung der Zellen und Fragmente

Zur Auswertung der Zellfragmente wurden jeweils 100 µl der Färbelösung auf die Gele pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Auszählung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurden in Doppelbestimmung bei circa 100 Zellen die Schweife ausgezählt und der prozentuale Anteil der Schweife bestimmt. Um eine Fehlanalyse von eventuell verblassten Schweifen zu verhindern, wurden die Zellen erst

im Anschluss an die Auszählung in Kooperation mit der AG Grevelding am inversen Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

3.2.5.2 Immunfluoreszierende Gewebeschnitte

Für die immunfluoreszierenden Gewebeschnitte wurden Doppelfärbungen der Multiplex Immunhistochemie durchgeführt. Mithilfe dieser Methode können aus einem Gewebeschnitt Informationen über mehrere Proteine gewonnen werden.

Hierzu wurden zunächst die in Paraffin eingebetteten und formalinfixierten Schnitte schrittweise hydriert durch Waschschrte mit Alkohollösungen in absteigender Konzentration. Im Anschluss wurden die Schnitte in Citratpuffer erhitzt zur Freilegung der Antigene. Es folgten mehrere Schritte zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Waschschrte vor der Inkubation des jeweiligen Zielantikörpers oder der Isotypkontrolle. Letztere wurde zur Erkennung der unspezifischen Bindung des Antikörpers durchgeführt und war stets negativ. Es wurde eine indirekte Immunmarkierung durchgeführt. Ein konjugierter Sekundärantikörper zur Fluoreszenzmarkierung mit Tyramid Signal Amplifikation (TSA) wurde verwendet, welches den Einsatz mehrerer Primärantikörper aus einer Spezies ohne Kreuzreaktionen erlaubte. Die kovalenten Bindungen von Tyrosinresten ermöglichten eine Entfernung des ersten Antikörpers mittels Aufkochens ohne Verlust des Fluoreszenzsignals. So konnte im Anschluss ein zweiter Proteinantikörper aufgetragen werden. Nach den Wasch- und Inkubationsschritten wurden die Schnitte wasserfrei eingedeckt und die beiden Proteine wurden schließlich gleichzeitig in einem Schritt mikroskopisch beurteilt.

3.2.5.2.1 Vorbereitung und Einfärbung der Schnitte

Die Gewebeschnitte wurden zu Beginn in Lösungen mit absteigender Alkoholkonzentration gelegt, die sich aus dreimal Xylol (10 min, 5 min, 5 min), zweimal Ethanol absolut 99,6% (5 min), Ethanol 96% (5 min) und Ethanol 70% (2 min) zusammensetzte. Die Schnitte wurden danach unter fließendem Leitungswasser fünf Minuten gewaschen. Währenddessen wurde in der Mikrowelle bei 800 W Citratpuffer für zwei Minuten erhitzt. Die Proben wurden in den Puffer gegeben, welcher bei 700 W zum Kochen gebracht wurde und anschließend noch weitere 35 Sekunden erhitzt wurde. Nach 30-minütiger Abkühlzeit wurden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser fünf Minuten gewaschen. Es folgte ein Waschschrte in PBS auf der Rüttelplatte für fünf Minuten. Zum Blocken der Peroxidasen wurde ein 3% H₂O₂-PBS-Gemisch für 15 Minuten auf die Schnitte pipettiert. Im Anschluss wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser fünf Minuten gewaschen und zweimal fünf Minuten in

PBS gewaschen. Es wurde für eine Stunde eine 1:1 Mischung aus 10% BSA und 2,5% Horse-Serum auf die Gewebeschnitte gegeben zur Blockierung der unspezifischen Bindungen. Danach wurden die Proben dreimal jeweils zwei Minuten in PBS gewaschen. Der Primärantikörper bzw. die Isotypkontrolle wurden in der berechneten Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. 60 µl des Sekundärantikörpers wurden für 30 Minuten auf die Proben gegeben. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit PBS wurden die Proben 30 Minuten in der Fluorophorlösung (570) in 1:100 PBS Verdünnung inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für fünf Minuten in PBS. Zur Durchführung der Doppelfärbung wurden alle Schritte ab dem Aufheizen der Mikrowelle bis hierhin wiederholt mit dem zweiten Primärantikörper. Es wurde eine zweite Farbe des Fluorophors (520) verwendet. Nach der Inkubation des Farbstoffes folgten zwei Waschschriffe PBS für jeweils fünf Minuten. Die Schnitte wurden fünf Minuten mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert. Dies diente zur Anfärbung der DNA und damit Kernfärbung der Zellen. Im Anschluss wurden die Objektträger fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden mit einem wasserfreien Eindeckmittel eingedeckt und bei 4°C dunkel gelagert.

3.2.5.2.2 Lichtmikroskopische Auswertung

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Gewebeschnitte am Folgetag qualitativ analysiert. Dazu wurden Fotos der drei unterschiedlichen Färbungen (rot, grün, blau) gemacht und im Anschluss mit Hilfe der Software Photoshop Pro® übereinander gelegt zur Veranschaulichung der Co-Färbungen in den Hepatozyten. Dadurch gelang gleichzeitig die Analyse der zwei angefärbten Proteine einer Spezies auf einem Gewebeschnitt.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Variablen (Expression und Aktivierung der Proteine Katalase, p53, p27, p44/42, Acetyl-CoA Synthetase 2, CHK-1, c-Jun, STAT3, Cyclin D1, PCNA und p-H2AX, sowie MDA Spiegel, Anzahl Schweife im Comet-Assay und Bestimmung der Katalase-Aktivität) wurden zunächst in Hauptziel- und Nebenzielparameter unterteilt. Die Hauptzielparameter waren die MDA Spiegel [nmol/ml Proteinlysatz] der Hamster- und Zellkulturversuchsproben, die prozentualen Schweifanteile im Comet-Assay [%], die relative Signalintensität der optischen Dichte der Western Blot Banden des Proteins p-H2AX der Hamster- und Zellkulturversuchsproben sowie die Messung der Katalase-Aktivität durch spektralphotometrische Bestimmung der Abnahme der H₂O₂ Absorption [angegeben in µg Katalase/ml Proteinlysatz]. Die Hauptzielparameter wurden im

Anschluss confirmatorisch untersucht. Die weiteren Versuche, wie zum Beispiel Proteinexpressionslevel der Katalase, p53, p27 und der PCNA, wurden den Nebenzielparametern zugeordnet und rein explorativ ausgewertet.

Die Western Blots wurden mit Hilfe der Software ImageJ® densitometrisch ausgewertet. Die Sammlung und Auswertung der Daten, sowie die Berechnung der Quotienten der Ladekontrolle erfolgte mit Microsoft Excel®. Es wurde eine Normierung der berechneten Mittelwerte durch Bildung des Quotienten aus den jeweiligen Mittelwerten durch die Summe aller Mittelwerte gewonnen.

Die Daten des MDA-Assays und der Katalase-Aktivitätsmessung wurden vom Plattenspektrophotometer erfasst und in Microsoft Excel® übernommen. Mithilfe der bekannten Standardwerte (MDA Spiegel in nmol bzw. Katalase-Aktivität in µg Katalase) und der zugehörigen ermittelten photometrischen Werte wurde eine Trendlinie bestimmt. Die Gleichung der Trendlinie wurde zur Berechnung der MDA Konzentrationen, sowie der Katalase-Aktivität der Tier- und Zellkulturversuchsproben verwendet. Es wurden Mittelwerte der Versuchstiere (maximal 21 infizierte und 3 nicht infizierte Tiere, exakte Anzahl unter den jeweiligen Ergebnissen) aus drei Versuchen gebildet.

Die Daten wurden zur statistischen Auswertung in die Software SPSS V.26 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, NY (USA)) eingepflegt. Da der Stichprobenumfang der Kontrollgruppe mit drei nicht infizierten Tieren zu klein war, wurde nicht von einer Normalverteilung ausgegangen. Es erfolgte eine nicht parametrische Auswertung durch den Kruskal-Wallis-Test. Die Nullhypothese lautete hierbei (H_0): Die untersuchten Variablen entstammen der gleichen Verteilung, bei einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$. Bei einem p-Wert kleiner gleich 0,05 wird die Alternativhypothese angenommen (H_1): Die untersuchten Variablen entstammen nicht der gleichen Verteilung. Um eine Kumulierung des α -Fehlers zu verhindern, wurde die Bonferroni-Holm Korrektur angewendet.

Die Subgruppen wurden automatisch mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen untersucht. Die Nullhypothese H_0 lautete dabei: „Es gibt keinen Unterschied zwischen den getesteten Gruppen.“. Daraus ergab sich für die Alternativhypothese H_1 : „Es gibt einen Unterschied zwischen den getesteten Gruppen“. Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ erfüllt war.

Die Ergebnisse wurden zur graphischen Veranschaulichung in einem Box-Whisker-Plot-Diagramm dargestellt. Der mittlere Strich entspricht hierbei dem Medianwert, die

Begrenzungen der Box repräsentieren jeweils das obere und untere Quartil. Die Whisker zeigen den größten und kleinsten Wert der Messreihe.

Es wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten bei nicht normalverteilten Stichproben.

* = signifikanter Unterschied der Gruppen ($p < 0,05$)

** = hoch signifikanter Unterschied der Gruppen ($p < 0,01$)

Die Western Blots wurden für eine einheitliche Darstellung elektronisch aufgehellt und kontrastiert, ohne die Kernaussage dadurch zu verändern.

4 Ergebnisse

4.1 *S. mansoni* induziert oxidativen Stress

4.1.1 Anstieg der hepatischen Malondialdehyd Konzentration

Malondialdehyd (MDA) wird häufig als Biomarker für oxidativen Stress verwendet. Zur Evaluierung der oxidativen Stresslevel einer Schistosomiasis Infektion wurden zu Beginn der Arbeit zunächst die MDA Spiegel der Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster und die Spiegel der Kontrollgruppen bestimmt.

Erhöhte MDA Konzentration bei *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern

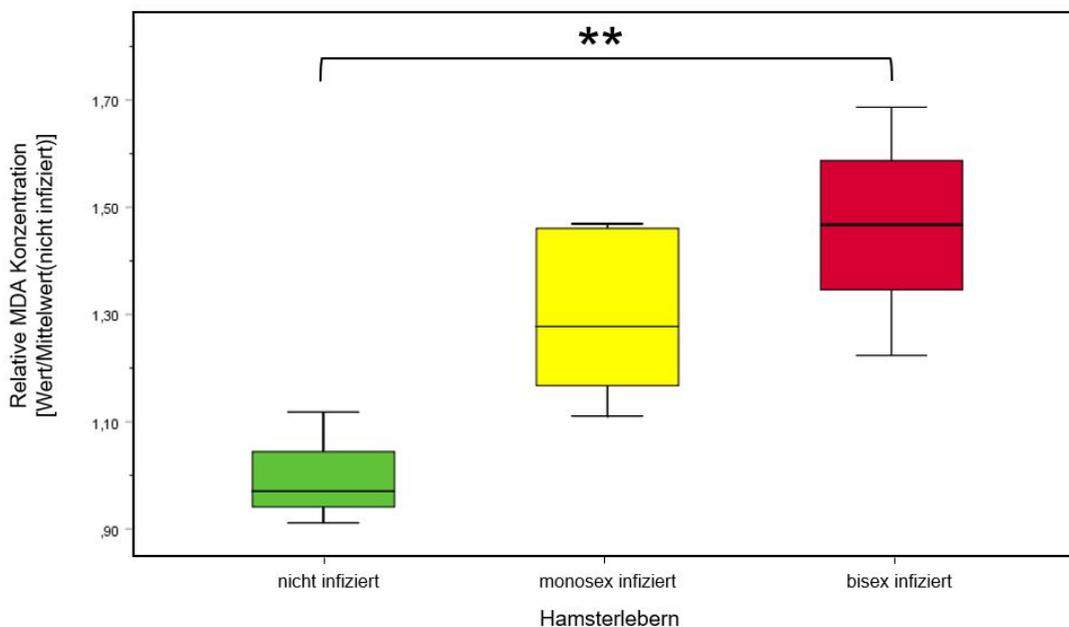


Abbildung 5: Erhöhte hepatische MDA Konzentration in Lebern der *S. mansoni* infizierten Hamster. Es wurden fünf technische Replikate durchgeführt. Auswertung der MDA Spiegel pro Versuchstier bisex (n=17), monosex (n=6) und nicht infizierter Hamsterlebern (n=3) in nmol MDA mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages.

Die Grafik zeigt die Auswertung der MDA Spiegel der drei Gruppen: Lebern bisex und monosex *S. mansoni* infizierter und nicht infizierter Hamster. Die Verteilung der MDA Konzentration war über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch ($p=0,02$). Im Gruppenvergleich war die MDA Konzentration in bisex infizierten Hamsterlebern gegenüber der Gruppe nicht infizierter Hamsterlebern gesteigert ($p^{**}=0,003$).

4.1.2 Normalisierung der durch SEA induzierten Malondialdehyd Spiegel mittels reduzierten Glutathions und JNK2-Inhibition

Der Biomarker MDA wurde in SEA stimulierten HepG2 Zellen und deren jeweiligen Kontrollgruppen bestimmt, um die oxidativen Stresslevel der Zellgruppen vergleichen zu können. Der therapeutische Effekt des Antioxidans Glutathion (GSH) wurde durch Bestimmung der MDA Spiegel in GSH behandelten und SEA-stimulierten HepG2 Zellen beurteilt. Zur Klärung einer möglichen Abhängigkeit der oxidativen Stresslevel von der Aktivierung des JNK Signalweges, wurde in einem weiteren Versuch ein JNK2 Inhibitor eingesetzt.

In Zellkulturversuchen wurde sowohl eine durch SEA induzierte Steigerung des MDA Spiegels als auch die Normalisierung des MDA Spiegels durch Zugabe von GSH in HepG2 Zellen erreicht.

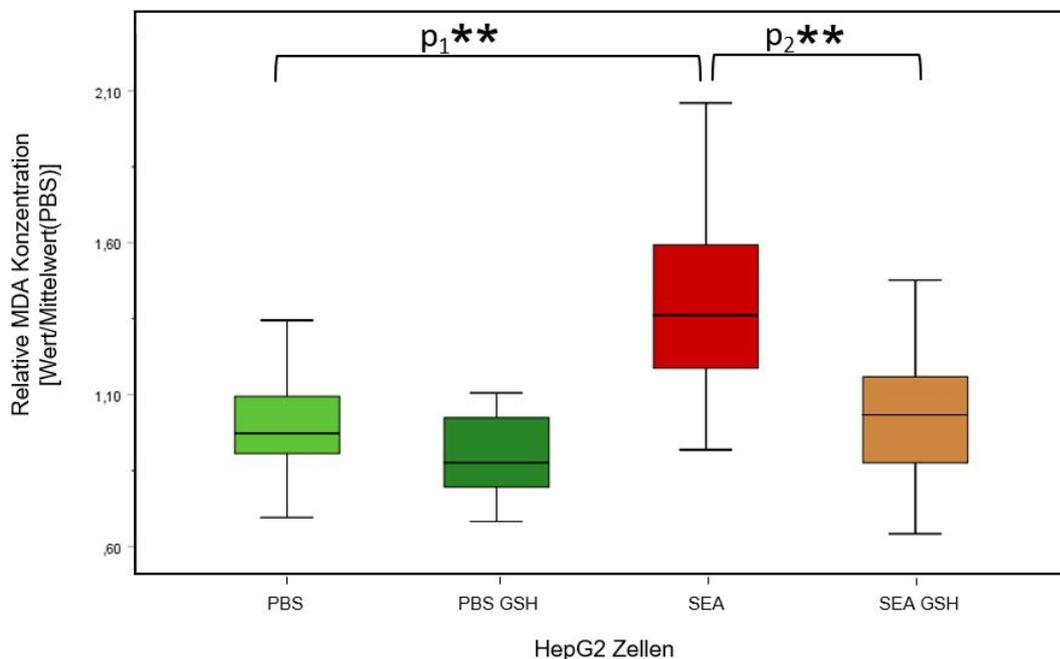


Abbildung 6: Gesteigerte MDA Konzentration in SEA induzierten HepG2 Zellen wurde durch GSH normalisiert. Es wurden sechs technische Replikate durchgeführt. Verwendet wurden Zelllysate nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 µg/ml und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Es erfolgte eine Auswertung der MDA Spiegel in nmol der 17 biologischen Replikaten, sowie der PBS Kontrolle (n=17) mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages.

Die Grafik zeigt die Auswertung der MDA Spiegel eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder GSH angereicherterem Medium (10 mM) mit SEA in der Konzentration von 4,6 µg/ml für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben

sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Die relative MDA Konzentration war über die vier Gruppen der Zelllysate nicht identisch ($p < 0,01$). Die Zellstimulation mit SEA steigerte die MDA Konzentration gegenüber den PBS behandelten Zellen ($p_1^{**} = 0,001$). Darüber hinaus wurde die MDA Konzentration durch Zugabe von Reduktionsäquivalenten in Form reduzierten GSHs wieder auf Normalniveau abgesenkt ($p_2^{**} = 0,002$).

Erhöhung der MDA Konzentration bei Zugabe von SEA in Zellkulturversuchen mit HepG2 Zellen. Dieser MDA Spiegel wurde durch die JNK2-Inhibition normalisiert.

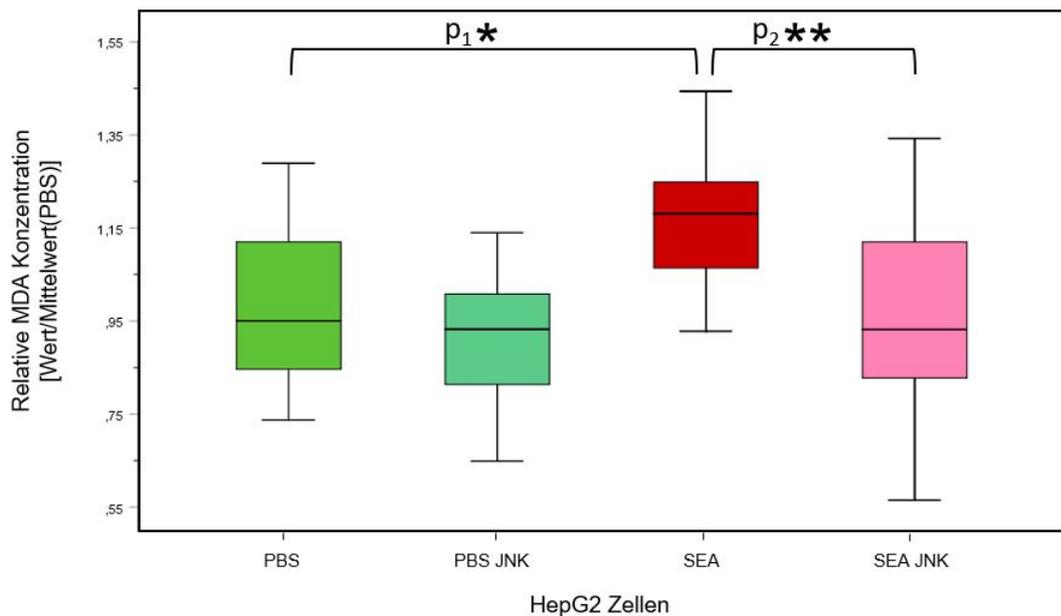


Abbildung 7: Gesteigerte MDA Konzentration in SEA induzierten HepG2 Zellen wurde durch JNK2-Inhibition normalisiert. Verwendet wurden Zelllysate nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ und JNK2 Inhibitor Konzentration von 10 μM . Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+JNK, SEA, SEA+JNK. Es wurden vier technische Replikate durchgeführt. Die Auswertung der MDA Spiegel der 15 biologischen Replikate, sowie der PBS Kontrollen ($n=15$), erfolgte in nmol mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages.

Die Grafik zeigt die Auswertung der MDA Spiegel eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder Medium mit JNK2 Inhibitor in der Konzentration 10 μM mit SEA in der Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+JNK, SEA, SEA+JNK. Die Verteilung der MDA Konzentration war über die vier Gruppen der Zelllysate nicht identisch ($p=0,02$). SEA erhöhte die Konzentration von MDA in HepG2 Zellen ($p_1^* = 0,012$). Darüber hinaus wurde die MDA Konzentration durch JNK2 Inhibition wieder auf Normalniveau abgesenkt ($p_2^{**} = 0,01$).

4.1.3 Steigerung der hepatischen Katalase-Aktivität

Die Aktivität der Katalase ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktionalität der Katalase in der Leber. Zur Evaluierung des Antioxidans während einer Schistosomiasis Infektion wurde die Aktivität der Katalase in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster und den Kontrollgruppen bestimmt. Eine mögliche Korrelation der Katalase-Aktivität mit dem Infektionsgrad der Hamster wurde ebenfalls untersucht.

Die durch *S. mansoni* induzierte hepatische Katalase-Aktivität korrelierte mit dem Infektionsgrad der infizierten Hamster.

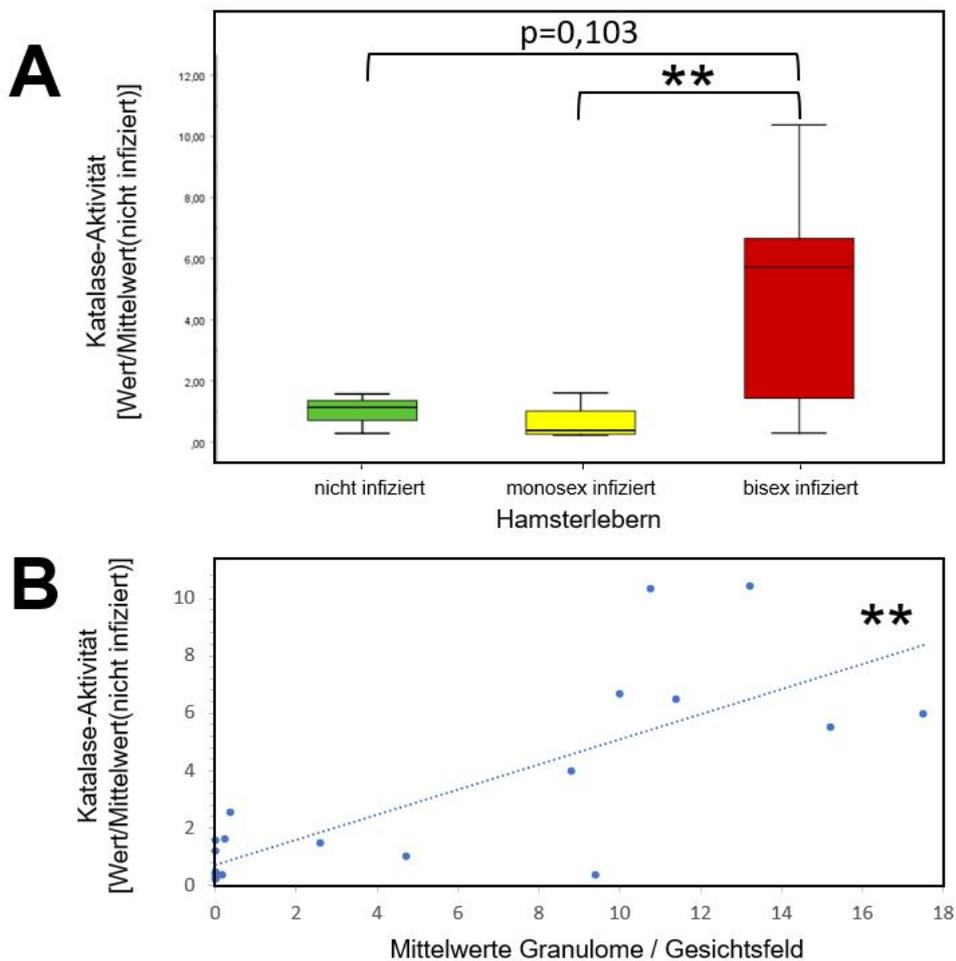


Abbildung 8: Korrelation der gesteigerten Katalase-Aktivität mit dem Infektionsgrad der Hamsterlebern. (A) Die Katalase-Aktivität wurde durch Messung der Wasserstoffperoxid Absorptionsdifferenz gemessen und mit Hilfe eines Standards in μg Katalase pro ml berechnet. Es wurden drei technische Replikate durchgeführt. Auswertung der standardisierten Mittelwerte der Katalase-Aktivität pro Versuchstier bisex ($n=10$), monosex ($n=8$) *S. mansoni* infiziert und nicht infizierter Hamsterlebern ($n=3$) mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Die Aktivität der Katalase war in bisex infizierten Hamsterlebern gesteigert. (B) Es bestand eine Korrelation zwischen den Granulommittelwerten pro Versuchstierleber und der gemessenen Katalase-Aktivität.

Die Grafik zeigt die Auswertung der Katalase-Aktivität der Gruppen nicht infiziert bzw. bisex und monosex *S. mansoni* infizierter Hamsterlebern und deren Korrelation zum Infektionsgrad der Hamster. **(A)** Die Verteilung der Katalase-Aktivität war über die drei Gruppen nicht identisch ($p=0,036$). In den bisex infizierten Hamsterlebern war die Katalase-Aktivität gegenüber der Gruppe monosex infizierter Hamsterlebern gesteigert ($p^{**}=0,007$). Die Verteilung der Katalase-Aktivität war in den Gruppen bisex und nicht infizierter Hamsterlebern identisch ($p=0,103$). **(B)** Die Grafik zeigt den Zusammenhang zwischen der Katalase-Aktivität und dem Mittelwert der ausgezählten Hamsterlebergranulome. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,763 nach Spearman. Der Infektionsgrad - gemessen als Anzahl der Granulome in der Leber - und die Katalase-Aktivität der *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern korrelieren ($p^{**}<0,01$).

4.1.4 Reduktion der hepatischen Katalaseexpression

Die Katalase stellt ein wichtiges enzymatisches Antioxidans der Leber dar. Eine Veränderung ihrer Expression ermöglicht Rückschlüsse auf das Kompensationsverhalten der Leber auf erhöhten oxidativen Stress während der Schistosomiasis Infektion. Zur Evaluierung der Interaktion des Parasiten und der Antioxidanz in der Leber während einer Schistosomiasis Infektion wurde die Katalaseexpression in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster, SEA stimulierten HepG2 Zellen und den jeweiligen Kontrollgruppen bestimmt.

Reduktion der hepatischen Katalaseexpression in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern

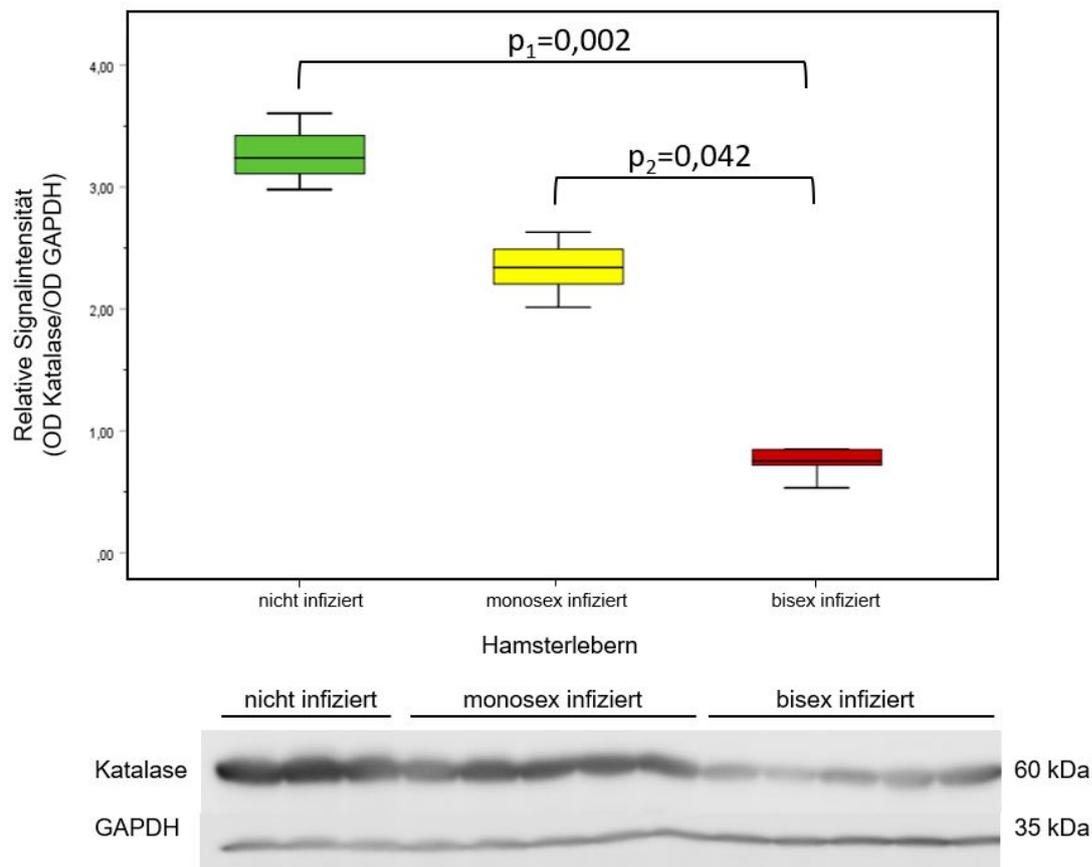


Abbildung 9: Verringerte hepatische Expression der Katalase in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der Katalaseexpression der drei Gruppen: bisex (n=5), monosex (n=5) und nicht infizierter Hamsterlebern (n=3), gemessen anhand der Signalintensität der Banden. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot der vier technischen Replikate. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der Katalaseexpression der drei Gruppen: Lebern bisex und monosex *S. mansoni* infizierter und nicht infizierter Hamster. Die Verteilung der Katalaseexpression war über die drei Gruppen nicht identisch ($p=0,005$). In bisex infizierten Hamsterlebern war die Katalaseexpression gegenüber den nicht infizierten Hamsterlebern deutlich verringert ($p_1=0,002$). Weiterhin war im statistischen Gruppenvergleich der Lebern bisex und monosex infizierter Hamster die Expression der Katalase verringert ($p_2=0,042$). Die Ergebnisse deuten auf eine verringerte hepatische Katalaseexpression durch *S. mansoni* in infizierten Hamstern hin. Durch verringerte antioxidative Mechanismen wird der hepatische oxidative Stress erhöht.

Reduktion der hepatischen Katalaseexpression in SEA stimulierten HepG2 Zellen

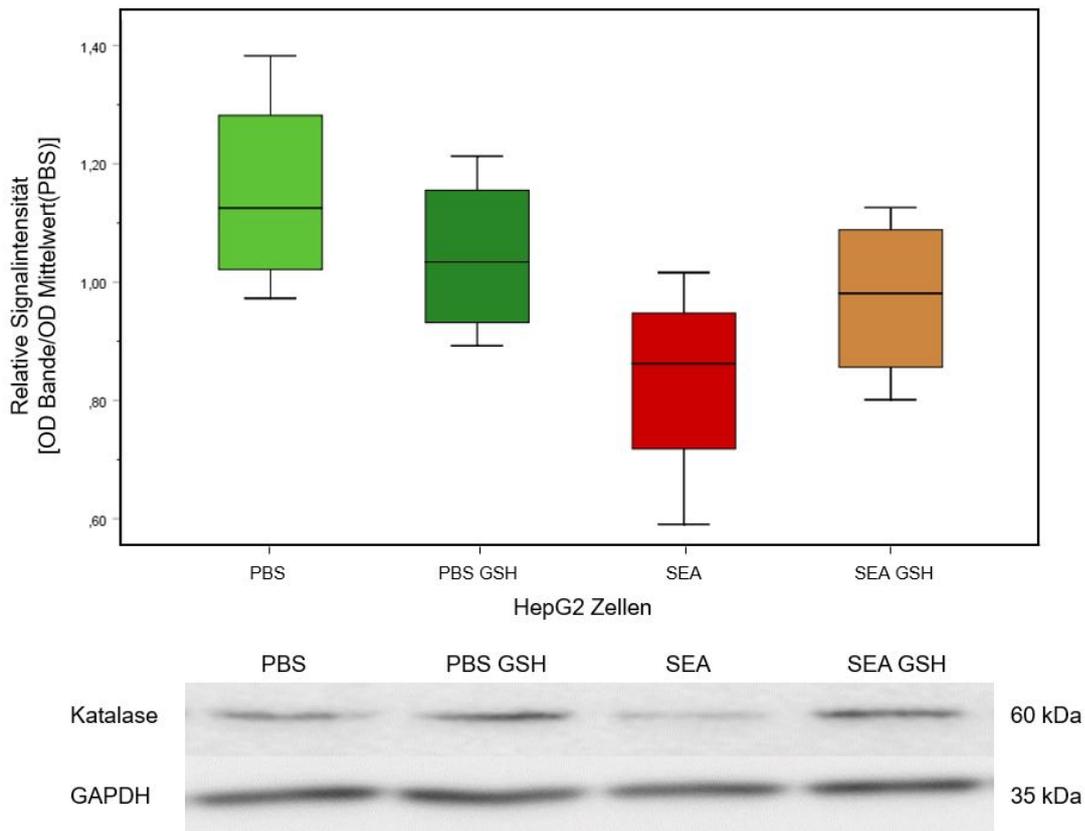


Abbildung 10: GSH normalisierte die SEA-induzierte verringerte Expression der Katalase in HepG2 Zellen. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zellysate nach Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ und 10 mM GSH für 24 Stunden. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot der vier Zellkulturversuche (n=4). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der Katalaseexpression eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder GSH angereichertem Medium (10 mM) mit SEA in der Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Die Western Blot Analyse suggerierte eine verminderte Expression der Katalase durch SEA Stimulation, jedoch wurde in der optodensitometrisch-statistischen Auswertung das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,109$). Durch die Normierung der Zellkultur Western Blots durch Dividieren des Ergebnisses durch den Tagesmittelwert der Banden ist ein Vergleich der Zellkulturversuchswerte und Hamsterleberergebnisse nicht möglich.

4.1.5 Reduzierung der durch SEA induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalwege und Zellzykluskontrollen mittels reduzierten Glutathions

Die Aktivierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege c-Jun und STAT3 wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt. Ziel der hier gezeigten Zellkulturversuche war es als *proof of principle* die Expression und Aktivierung der Signalwege nach therapeutischer GSH Behandlung zu untersuchen. Mögliche Veränderungen im Zellzyklus durch eine Schistosomiasis Infektion wurden durch die Messung der Cyclin D1 Expression in SEA-stimulierten HepG2 Zellen untersucht.

Für die folgenden drei Auswertungen der Zellkulturversuche mit HepG2 Zellen gilt: Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder GSH angereichertem Medium (10 mM) mit SEA in der Konzentration von 4,6 µg/ml für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen der verwendeten Zelllysate: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH.

Die durch SEA gesteierte Expression des Karzinogenese-assoziierten Signalwegs c-Jun wurde durch Zugabe von GSH in HepG2 Zellen reduziert.

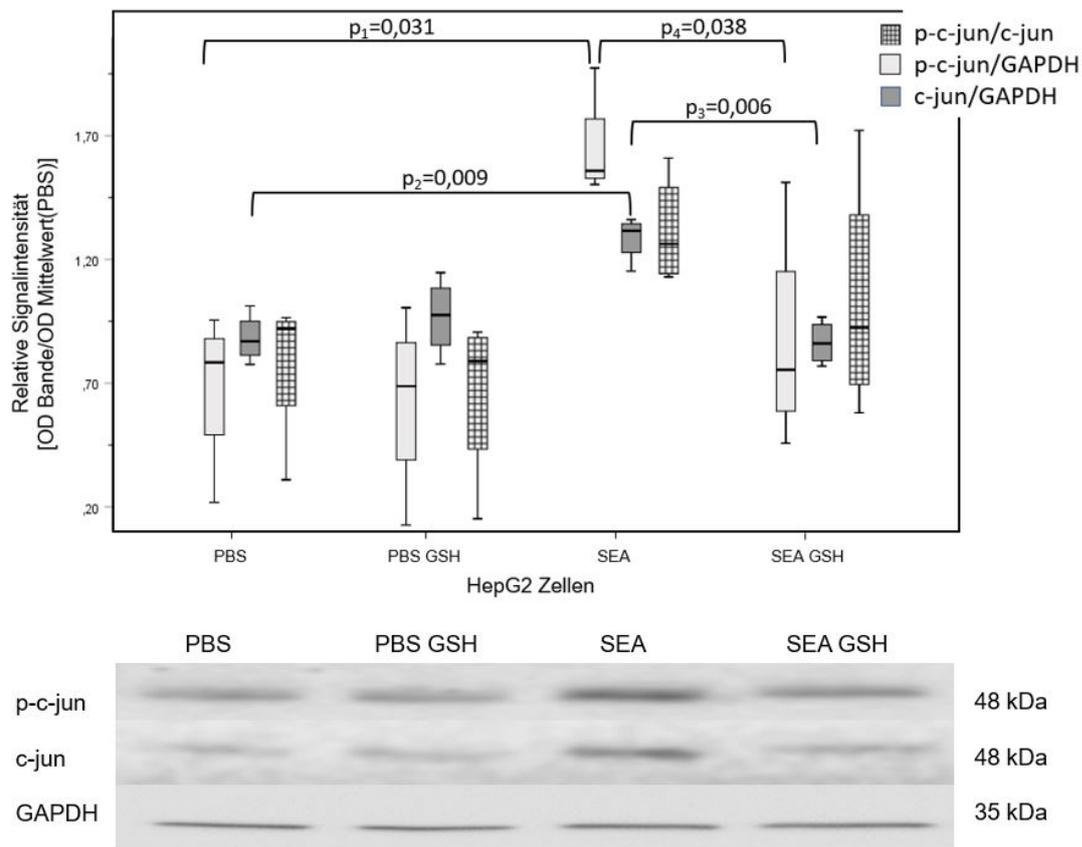


Abbildung 11: GSH reduzierte die Aktivierung des SEA-induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalwegs c-Jun in HepG2 Zellen. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen der c-Jun Expression und Aktivierung mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zelllysate nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 µg/ml und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Zellkulturversuchen (n=4). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der c-Jun Expression und Aktivierung eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Verteilung der c-Jun Aktivierung war im Trend über die vier Gruppen der Zelllysate identisch ($p=0,057$). Die c-Jun Expressionsverteilung war über die vier Zellgruppen nicht identisch ($p=0,023$), sowie im Trend der Quotient aus p-c-Jun/GAPDH ebenfalls nicht identisch war ($p=0,044$). SEA führte in HepG2 Zellen zur Steigerung der c-Jun Expression ($p_2=0,009$). Der Quotient aus p-c-Jun/GAPDH war im Trend ebenfalls gesteigert ($p_1=0,031$). Die verminderte c-Jun Expression ($p_3=0,006$) und des reaktiv gesteigerten p-c-Jun/GAPDH Quotienten ($p_4=0,038$) wurde durch das reduktionsäquivalent GSH erzielt.

Die Ergebnisse deuten auf eine Normalisierung der SEA stimulierten Steigerung der Expression des c-Jun Signalwegs hin, die durch GSH erreicht wurde.

Die durch SEA gesteigerte Aktivierung des Karzinogenese-assoziierten Signalwegs STAT3 wurde durch Zugabe von GSH in HepG2 Zellen reduziert.

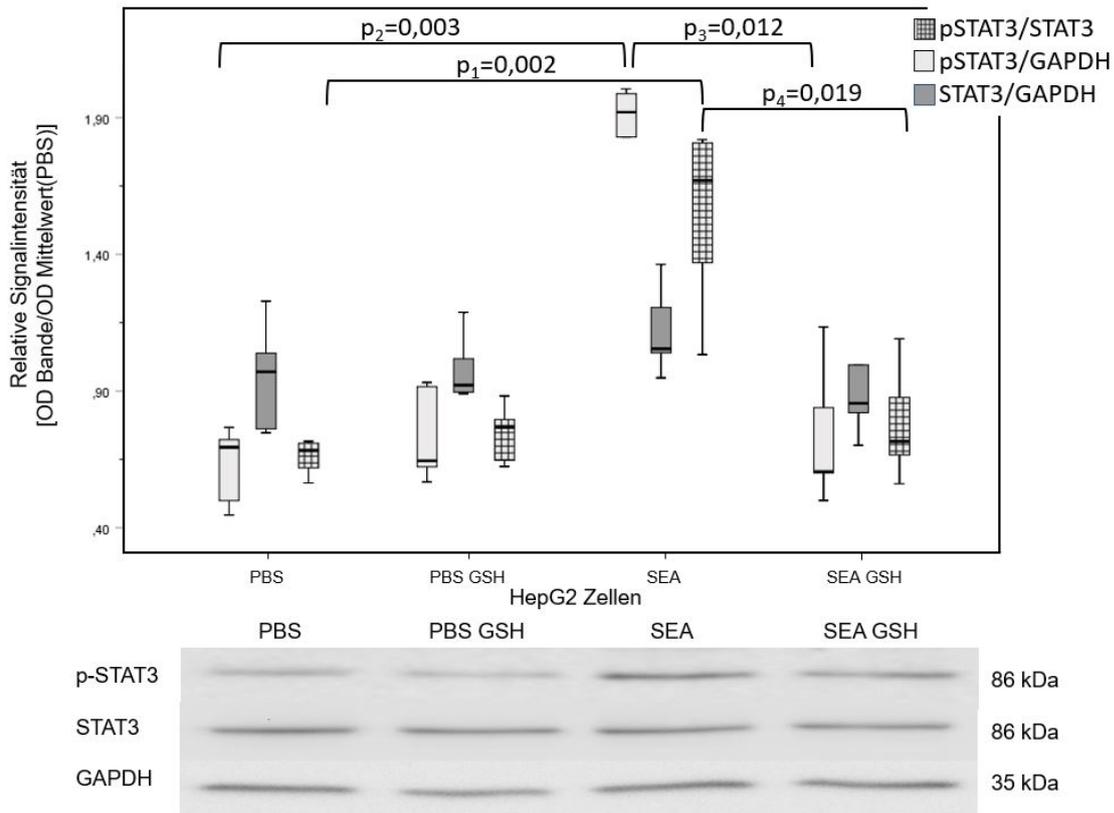


Abbildung 12: Verminderte Aktivierung des durch SEA-induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalwegs STAT3 in Zellkultur durch GSH. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der STAT3 Expression und Aktivierung mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zelllysate nach Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei einer SEA Konzentration von 4,6 µg/ml und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus fünf Zellkulturversuchen (n=5). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der STAT3 Expression und Aktivierung eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Verteilung der STAT3 Expression war in den vier Zelllysatgruppen identisch ($p=0,251$). Die Verteilung der STAT3 Aktivierung war über die vier Zellgruppen nicht identisch ($p=0,011$), sowie im Trend die Verteilung des p-STAT3/GAPDH Quotienten ($p=0,014$).

In den Gruppenvergleichen führte die SEA Stimulation zu einer gesteigerten Aktivierung des STAT3 gegenüber der Kontrollgruppe ($p_1=0,002$). SEA steigerte im Trend den p-STAT3/GAPDH Quotienten gegenüber der Kontrollgruppe PBS ($p_2=0,003$). Die verminderte STAT3 Aktivierung ($p_4=0,019$) und des erhöhten p-STAT3/GAPDH Quotienten ($p_3=0,012$) wurde durch das Reduktionsäquivalent GSH erreicht.

Die Ergebnisse deuten auf eine durch Zugabe von GSH erreichte Normalisierung der SEA-induzierten Steigerung der Aktivierung des STAT3 Signalwegs hin.

In Zellkulturversuchen wurde durch SEA eine Expressionssteigerung des Cyclin D1 in HepG2 Zellen induziert, welche sich durch Zugabe von GSH verminderte.

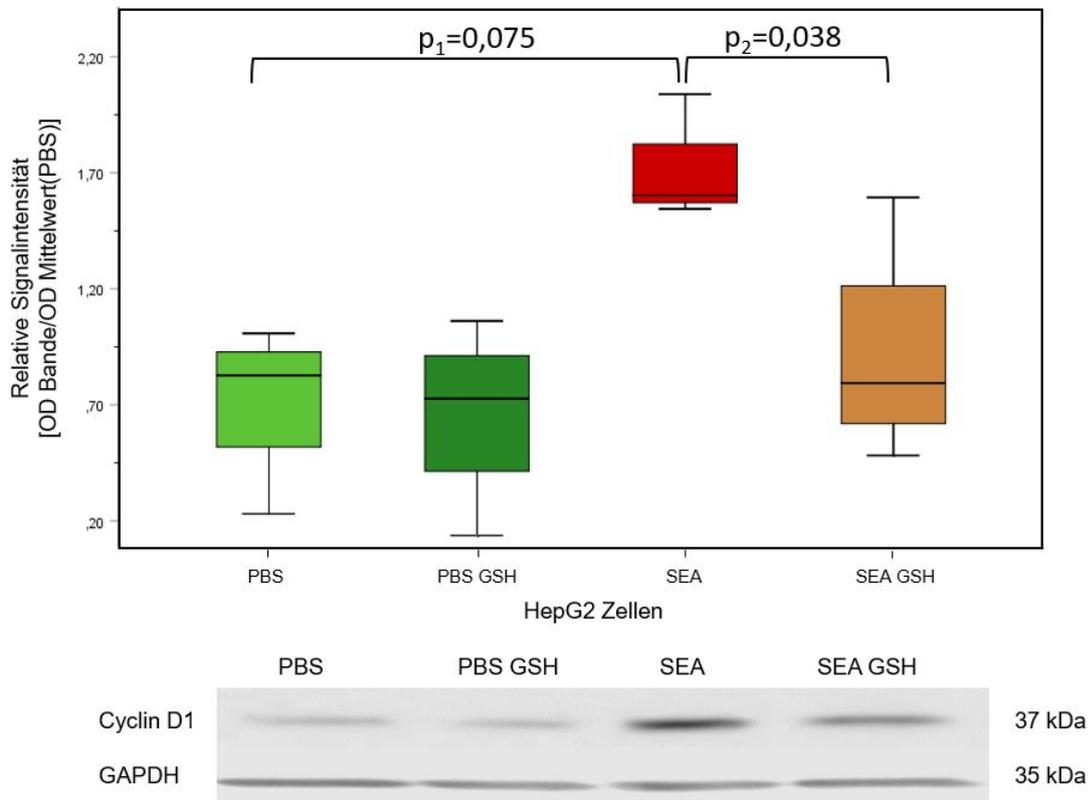


Abbildung 13: Verminderte SEA-induzierte Erhöhung der Cyclin D1 Expression in Zellkultur durch GSH. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der Cyclin D1 Expression mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zelllysate nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 µg/ml und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Ein repräsentativer Blot aus vier Zellkulturversuchen (n=4) wird gezeigt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Verteilung der Cyclin D1 Expression, welche über die vier Gruppen nicht identisch war ($p=0,012$). Die Western Blot Analyse suggerierte eine Cyclin D1 Expressionssteigerung durch SEA Stimulation, jedoch wurde dies in der optodensitometrisch-statistischen Auswertung nicht erreicht ($p=0,075$). Die durch SEA induzierte Cyclin D1 Expression war durch GSH Zugabe vermindert ($p_1=0,038$).

Die Ergebnisse deuten auf eine Normalisierung der SEA stimulierten Steigerung der Cyclin D1 Expression durch Zugabe von GSH hin.

4.2 *S. mansoni* beeinflusst die Zellzyklusregulationen

4.2.1 Aktivierung der Zellzykluskontrollmarker p27 und p53

Da die Zellzykluskontrolle eine wichtige Rolle bei der Zellmutagenese einnimmt, war die Untersuchung der Expression der Zellzykluskontrollmarker p27 und p53 aus zwei Gründen interessant: Sie zeigen eine etwaige fehlgesteuerte Zellzykluskontrolle durch eine *S. mansoni* Infektion und gleichzeitig könnten Aktivierungen der beiden Parameter mit gegenseitigen Effekten Hinweise auf das Vorhandensein von Replikationsstress sein.

Die p27 Expression war in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern erhöht.

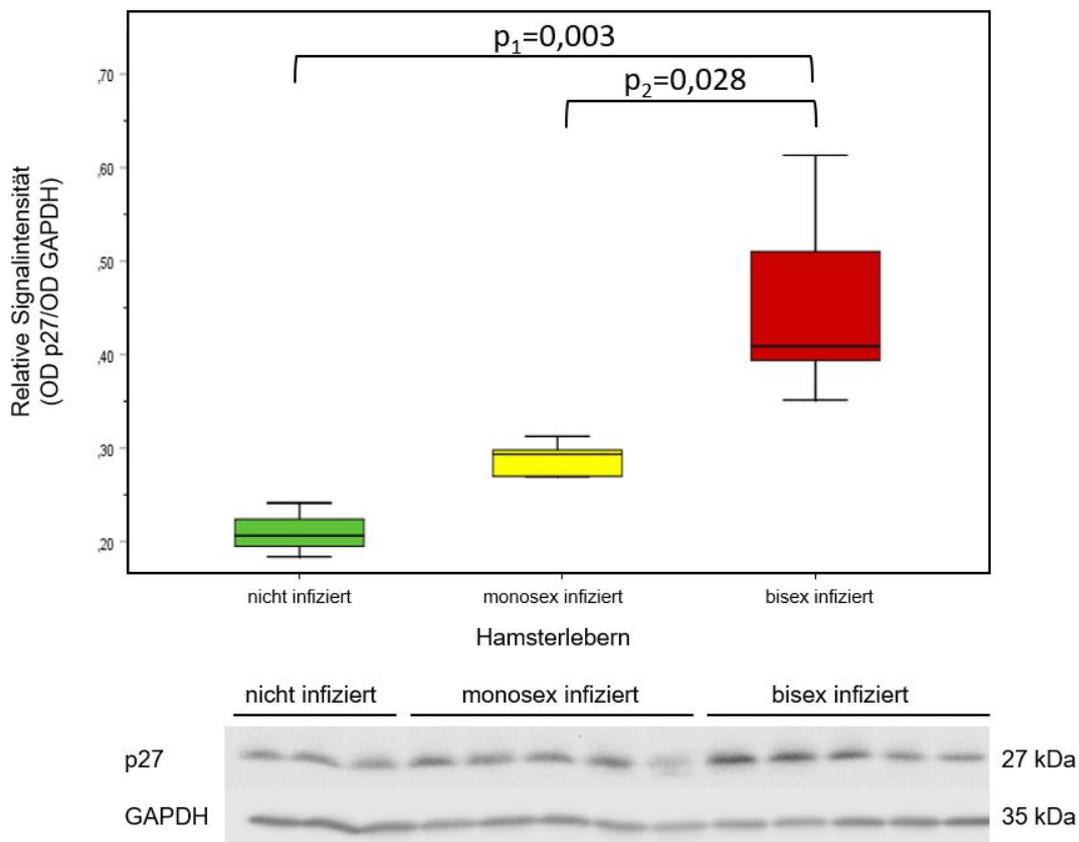


Abbildung 14 : Gesteigerte hepatische p27 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der p27 Expression der drei Gruppen bisex (n=5), monosex (n=5) und nicht infizierten Hamsterlebern (n=3), gemessen anhand der Signalintensität der Banden. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus vier technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Verteilung der p27 Expression war über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch ($p=0,008$). In Gruppenvergleichen war die p27 Expression in Lebern bisex infizierter Hamster gegenüber den Lebern nicht infizierter Hamster gesteigert ($p_1=0,003$), sowie gegenüber der Gruppe der monosex infizierten Hamsterlebern

($p_2=0,028$). Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte hepatische p27 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern hin.

Die Expression des p53 war bei *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern verstärkt.

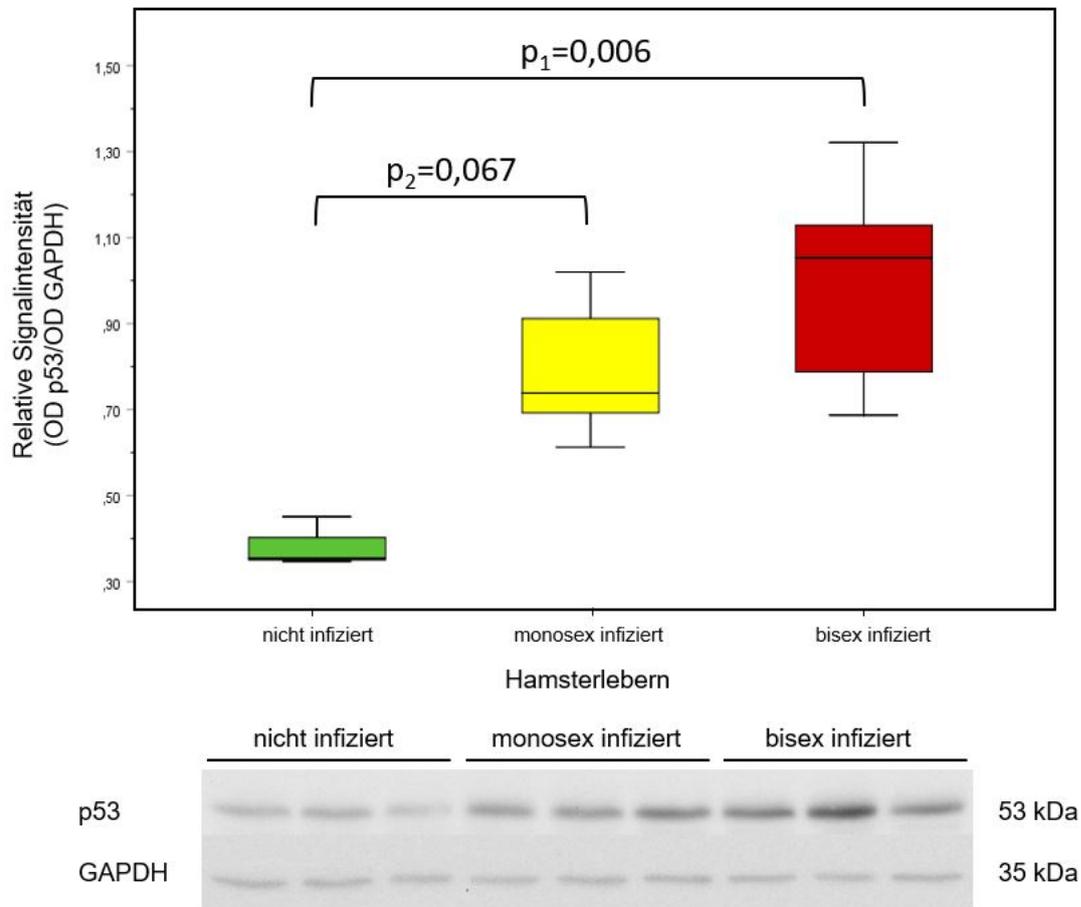


Abbildung 15: Gesteigerte hepatische p53 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der p53 Expression der drei Gruppen bisex ($n=5$), monosex ($n=5$) und nicht infizierter Hamsterlebern ($n=3$), gemessen durch die Signalintensität der Banden. Ein repräsentativer Blot aus vier technischen Replikaten wird gezeigt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Verteilung der p53 Expression war über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch ($p=0,023$). In Gruppenvergleichen war die Expression von p53 in bisex infizierten Hamsterlebern gegenüber der Kontrollgruppe nicht infizierter Hamsterlebern gesteigert ($p_1=0,006$). Die hepatische p27 Expression der monosex infizierten Hamster war identisch mit der nicht infizierten Hamstergruppe ($p_2=0,067$).

Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte hepatische p53 Expression in *S. mansoni* bisex infizierten Hamstern hin.

4.2.2 Aktivierung des DNA-Replikationsmarkers PCNA

Die Ringklemme „Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen“ (PCNA) wird initial bei der DNA-Replikation benötigt zur Fixierung der Polymerase an die DNA und ist auch bei der Bindung von Polymerasen zur Reparatur an beschädigten DNA-Stellen beteiligt. Zur indirekten Evaluierung der Replikation und des Zellumsatzes in der Leber während einer Schistosomiasis Infektion wurde die Expression der PCNA in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster, SEA stimulierten HepG2 Zellen und den jeweiligen Kontrollgruppen bestimmt.

Gesteigerte PCNA Expression in Lebern der *S. mansoni* infizierten Hamster

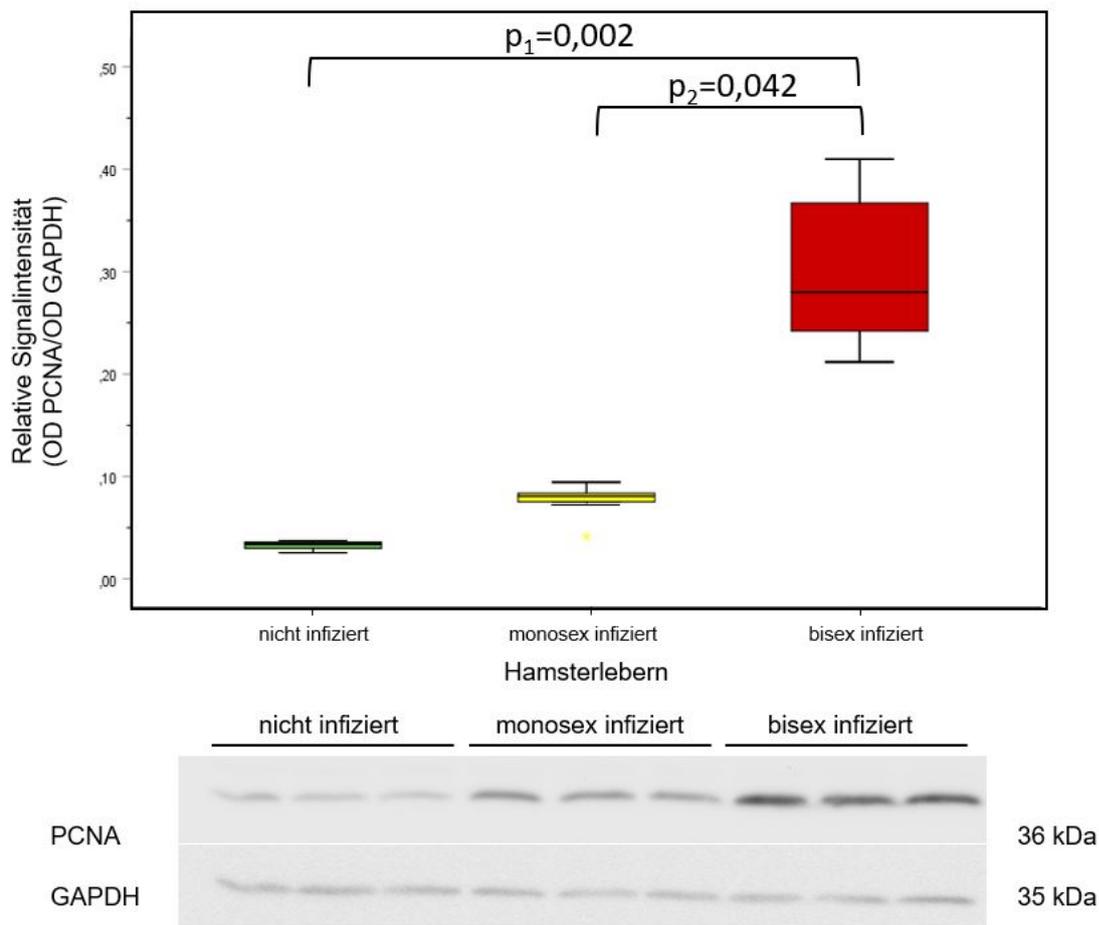


Abbildung 16: Erhöhte hepatische Expression der PCNA in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen der drei Gruppen bisex (n=5), monosex (n=5) und nicht infizierter Hamsterlebern (n=3), gemessen anhand der Signalintensität der Banden. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot der drei technischen Replikate. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Verteilung der p53 Expression war über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch ($p=0,005$). In Gruppenvergleichen war die PCNA Expression in bisex infizierten Hamsterlebern gegenüber den nicht infizierten Hamsterlebern gesteigert

($p_1=0,002$), sowie ebenfalls gegenüber den monosex infizierten Hamsterlebern ($p_2=0,042$). Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte hepatische PCNA Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern hin.

Die durch SEA gesteigerte Expression der PCNA wurde durch Zugabe von GSH in HepG2 Zellen reduziert.

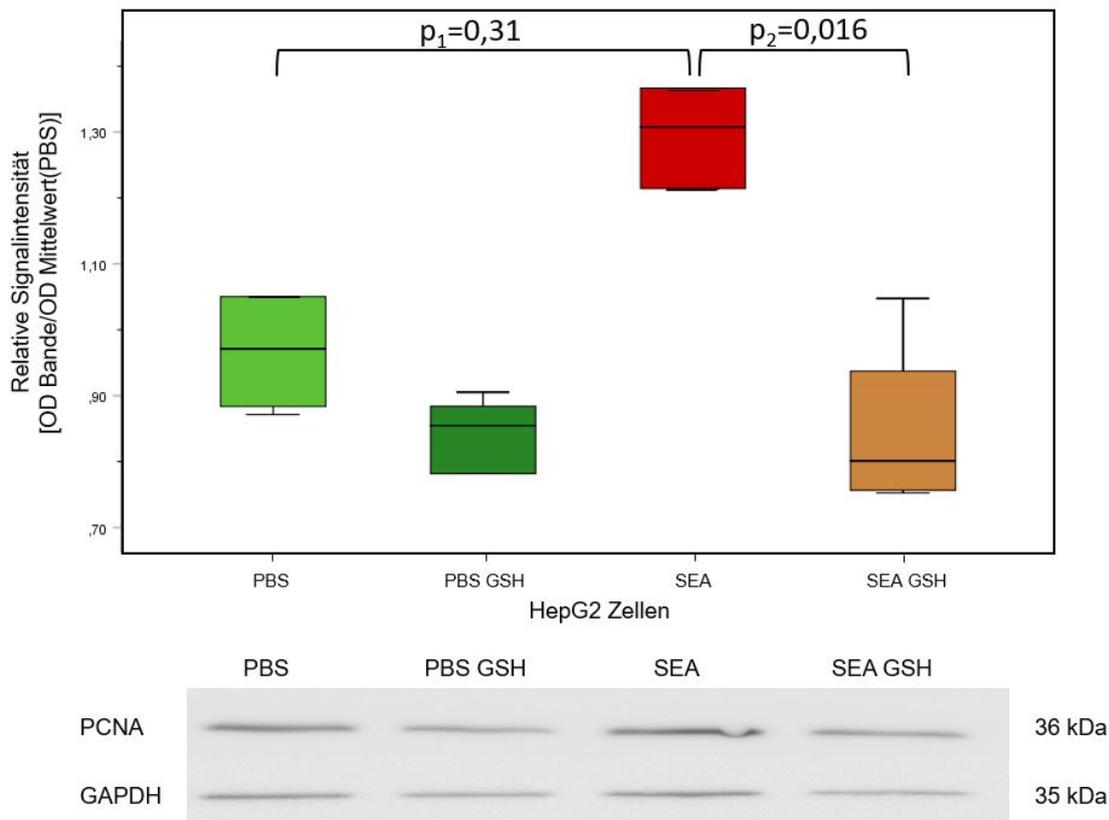


Abbildung 17: Normwertige PCNA Expression in stimulierten HepG2 Zellen mit SEA und GSH. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der PCNA Expression mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zelllysate nach Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei einer SEA Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus fünf Zellkulturversuchen ($n=5$). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der PCNA Expression eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder GSH angereichertem Medium (10 mM) mit SEA in der Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Die Verteilung der PCNA Expression war über die vier Zellgruppen nicht identisch ($p=0,025$). Die Western Blot Analyse suggerierte eine Steigerung der Expression von PCNA durch SEA Stimulation, jedoch wurde dies in der

optodensitometrisch-statistischen Auswertung nicht erreicht ($p_1=0,31$). Die PCNA Expression ist durch ein Reduktionsäquivalent in Form des GSHs vermindert ($p_2=0,016$). Die Ergebnisse deuteten auf eine Normalisierung der SEA stimulierten Steigerung der PCNA Expression durch Zugabe von GSH hin. Die Normierung der Western Blot aus Zelllysaten mittels Division des Ergebnisses durch den Tagesmittelwert der Banden erlaubt keinen Vergleich der Zellkulturversuchswerte und der Ergebnisse aus Hamsterleber. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse eine gesteigerte Proliferation bei einer *S. mansoni* Infektion an.

4.2.3 Aktivierung der Transkriptionsmarker p44/42 (ERK1/2)

Bei vielen Krebsarten ist eine Steigerung des Signalweges der ERK1/2 Kaskade zu beobachten. Diese Hyperaktivierung kann zu Zellproliferation aber auch zu Differenzierung und Mutagenese führen. Um diesen Downstream Verlauf der MAP-Kinasen und deren Interaktion bei einer Schistosomiasis Infektion zu untersuchen, wurde die p44/42 Expression in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster, in SEA stimulierten HepG2 Zellen und den jeweiligen Kontrollgruppen bestimmt.

Erhöhte p44/42 Expression in *S. mansoni* bisex infizierten Hamsterlebern

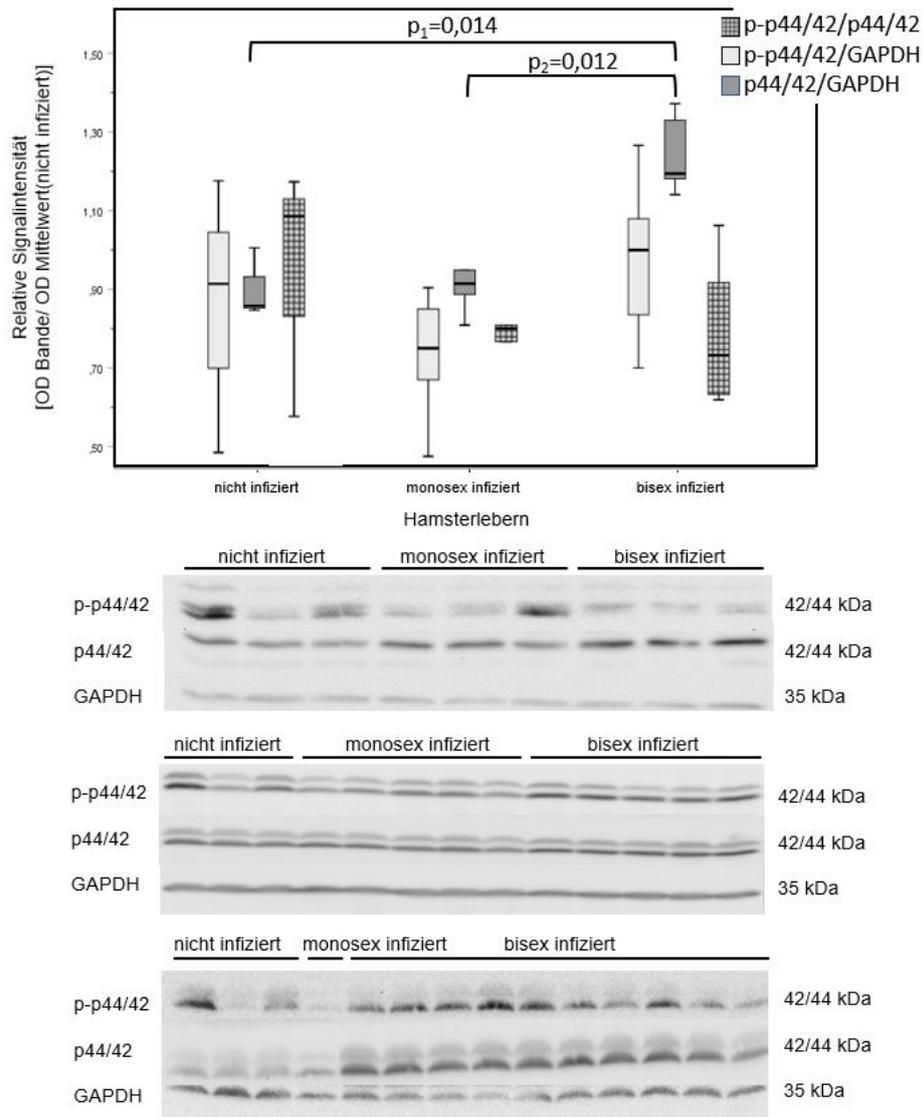


Abbildung 18: Durch *S. mansoni* erhöhte hepatische Expression des Markers p44/42 in Hamstern. Densitometrische Auswertung repräsentativer Blots (5 technische Replikate). Im Western Blot wurde die Expression von p42 und p44 MAPK (ERK1/2) analysiert, die eine Doppelbande bei 42 und 44 kDa bildeten. Die Western Blots wurden anschließend semiquantitativ in drei Gruppen: bisex ($n=5$), monosex ($n=5$) und nicht infizierte Hamsterlebern ($n=3$) anhand der Signalintensität der Bande ausgewertet. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Verteilung der p44/42 Expression war über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch ($p=0,013$). Die Aktivierung von p44/42 sowie der p-p44/42/GAPDH Quotient waren über die Gruppen identisch ($p=0,697$; $p=0,253$).

Hepatisches p44/42 war in bisex infizierten Hamstern gesteigert exprimiert (Gruppenvergleiche: nicht infiziert $p_1=0,014$; monosex $p_2=0,012$). Die Ergebnisse deuten auf eine hepatische Expressionssteigerung von p44/42 in *S. mansoni* infizierten Hamstern hin.

In HepG2 Zellen wurde durch SEA eine gesteigerte Aktivierung des p44/42 (ERK1/2) angedeutet, die sich durch Zugabe von GSH reduziert.

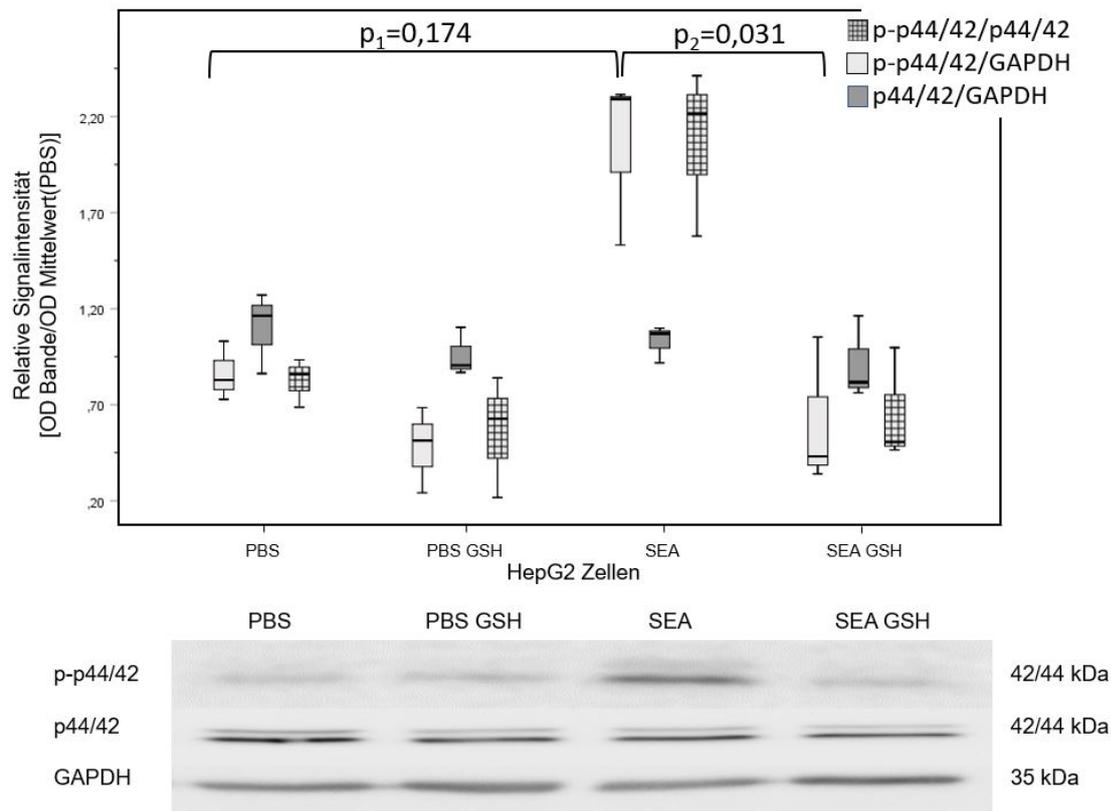


Abbildung 19: GSH reduziert die Aktivierung des p44/42 Signalwegs in Zellkulturversuchen mit SEA. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen der p44/42 Expression und Aktivierung mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zelllysate nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 µg/ml und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus drei Zellkulturversuchen (n=3). Durch den eingesetzten Antikörper für p42 und p44 zeigen sich Doppelbanden bei 42 und 44 kDa. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der p44/42 Expression und Aktivierung eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder GSH angereichertem Medium (10 mM) mit SEA in der Konzentration von 4,6 µg/ml für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Die p44/42 Expressionsverteilung war über die Gruppen der Zelllysate identisch ($p=0,644$), sowie auch knapp die Verteilung der p44/42 Aktivierung ($p=0,063$). Die Verteilung des Quotienten aus p-p44/42/GAPDH war über die vier Zellgruppen nicht identisch ($p=0,05$).

Die im Western Blot suggerierte Steigerung des p-p44/42/GAPDH in SEA stimulierten Zellen wurde in der optodensitometrischen-statistischen Auswertung nicht erreicht ($p=0,174$). Die gesteigerte Verteilung des Quotienten war durch GSH Zugabe reduziert

($p_1=0,031$). Die Ergebnisse deuten auf eine Normalisierung der SEA stimulierten Steigerung der p44/42 Aktivierung durch Zugabe von GSH hin.

4.2.4 Steigerung der Zellzykluskontrolle (CHK1 Expression)

CHK1 ist ein wichtiges Protein zur Koordinierung der DNA-Reparaturmechanismen und Kontrolle der Genomstabilität und interagiert dabei mit unzähligen Proteinen wie ATR, ATM und p53. Zur Beurteilung der DNA-Reparaturmechanismen in der Leber während einer Schistosomiasis Infektion wurde die Expression und Aktivierung von CHK1 in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster und der Kontrollgruppen bestimmt.

S. mansoni induzierte in infizierten Hamsterlebern eine vermehrte Expression der hepatischen CHK1.

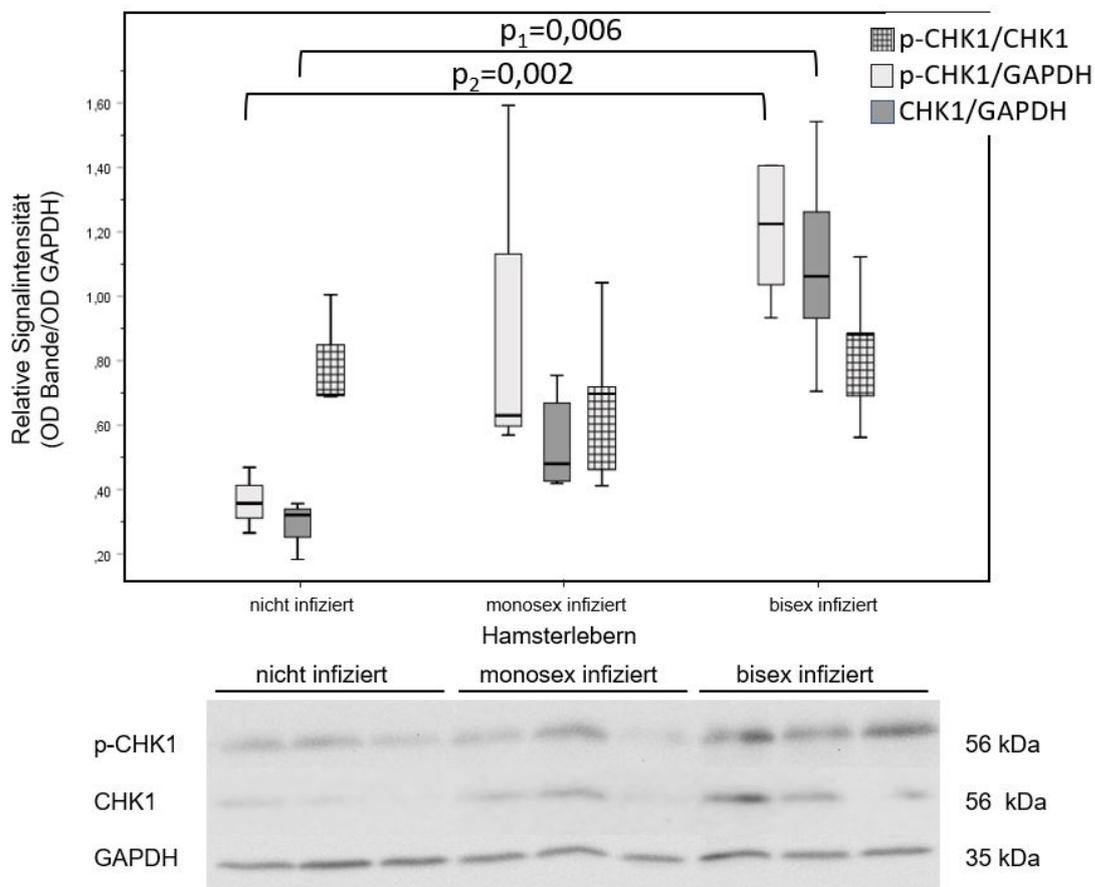


Abbildung 20: Gesteigerte hepatische CHK1 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen der CHK1 Expression und Aktivierung der drei Gruppen bisex (n=5), monosex (n=5) und nicht infizierte Hamsterlebern (n=3). Diese wurden anhand der Signalintensität der Banden gemessen. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot der vier technischen Replikate. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Verteilung der CHK1 Expression war über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch ($p=0,023$), ebenso die Verteilung des Quotienten p-CHK1/GAPDH ($p=0,007$) im Trend. Die CHK1 Aktivierung war über die Gruppen identisch ($p=0,662$).

In Gruppenvergleichen war die Expression der CHK1 in bisex infizierten Hamsterlebern gegenüber den nicht infizierten Hamsterlebern gesteigert ($p_1=0,006$). Darüber hinaus war der p-CHK1/GAPDH Quotient in bisex infizierten Lebern im Trend erhöht gegenüber den nicht infizierten Hamsterlebern ($p_2=0,002$). Die Ergebnisse deuten auf eine Steigerung der hepatischen CHK1 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern hin und damit auf eine Aktivierung der DNA-Reparaturmechanismen.

4.2.5 Simultane Aktivierung von MCM2 und p-H2AX in Gewebeschnitten

p-H2AX gilt als indirekter Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und der Proteinkomplex MCM2 ist bei der Initiation der DNA-Replikation beteiligt. Durch das Einfärben von MCM2 konnte der Replikationsstatus analysiert werden. Mit der simultanen Färbung beider Proteine in einem Gewebeschnitt können Aussagen über den Zusammenhang der DNA-Schäden und der gesteigerten Replikation, sowie folglich das Vorliegen von Replikationsstress, ermöglicht werden.

In *S. mansoni* infizierten Hamsterlebergewebeschnitten konnten bei Co-Färbungen perigranulomatös proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schädigung detektiert werden.

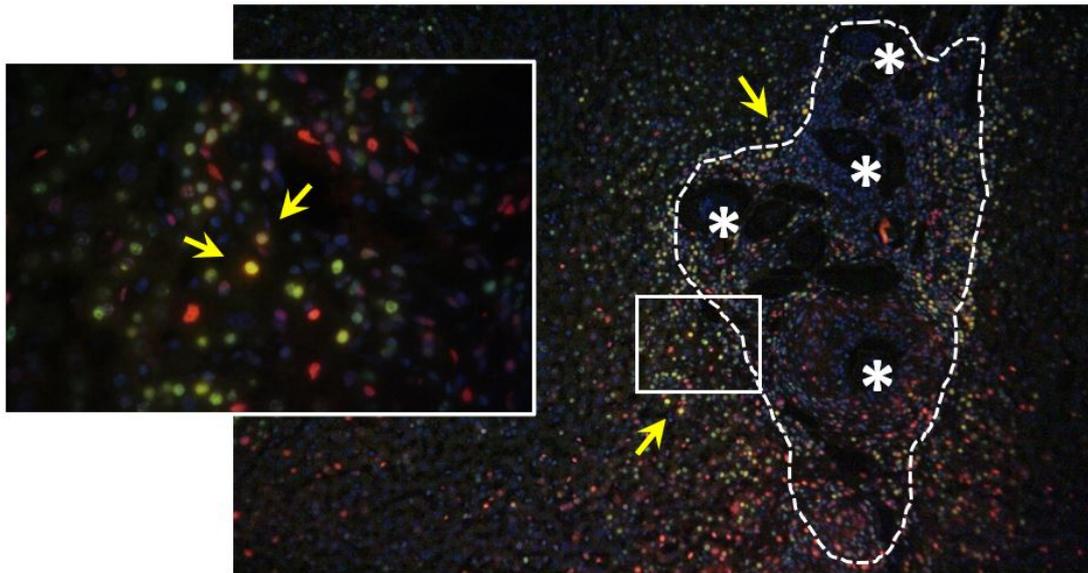


Abbildung 21: Proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schäden in *S. mansoni* infizierten Hamstern. Gezeigt ist eine MCM2 und p-H2AX Doppelfärbung der Zellkerne. Der Hamsterlebergewebeschnitt wurde mit einer Doppelfärbung Multiplex Immunhistochemie behandelt. Es wurde die Fluoreszenzmarkierung mit Tyramid Signal Amplifikation (TSA) verwendet, welche den Einsatz mehrerer Primärantikörper aus einer Spezies ermöglicht. Der große rechte Bildausschnitt eines Gewebeschnitts aus der Leber eines bisex *S. mansoni* infizierten Hamsters entspricht der Vergrößerung x200. Der weiß umrandete Kasten markiert einen Ausschnitt, der links x1000 vergrößert dargestellt ist inklusive zwei gelber Pfeile. (p-H2AX grün eingefärbte Hepatozyten, MCM2 rot gefärbte Zellen, Zellkerne in blau; - - - = Begrenzung des Granuloms; * = *S. mansoni* Ei; ➡ = proliferierende Zellkerne mit DNA-Schädigung) Die Zellen, die mit gelben Pfeilen markiert sind, zeigen proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schäden. Dies spricht für das Vorhandensein von Replikationsstress in Granulomnähe.

Dargestellt sind Co-Färbungen der Proteine MCM2 und p-H2AX auf einem bisex *S. mansoni* infizierten Hamsterlebergewebeschnitt. Durch das Verwenden der Tyramid Signal Amplifikation in Multiplex Immunhistochemie Doppelfärbungen gelang der simultane Nachweis der beiden Proteine in einzelnen Hepatozyten (siehe Kapitel 3.2.5.2). Gut zu sehen sind in Granulomnähe sowohl grün gefärbte Zellen mit p-H2AX Aktivierung (=DNA-Doppelstrangbrüchen), rot eingefärbte Zellen mit MCM2 Aktivierung (=DNA-Replikation) und gelb eingefärbte Zellen. Diese gelbe Farbe der Zellkerne entspricht der simultanen Aktivierung von p-H2AX und MCM2 in einer Zelle und verdeutlicht damit das Vorliegen von Replikationsstress in der Nähe der Granulome.

4.2.6 Simultane Aktivierung von Ki67 und p-H2AX in Gewebeschnitten

Das Antigen Ki67 wird während der Zellteilung exprimiert und gilt daher als Proliferationsmarker. H2AX bindet im Zellkern in phosphorylierter Form an DNA-Doppelstrangbrüche und p-H2AX gilt damit indirekt als Marker für DNA-Schäden. Mit

der simultanen Färbung beider Proteine in einem Gewebeschnitt können neben der Beurteilung von DNA-Schäden und Proliferationsstatus auch Aussagen über den Zusammenhang beider Parameter, folglich das Vorliegen von Replikationsstress, ermöglicht werden.

In Lebergewebeschnitten *S. mansoni* infizierter Hamster waren perigranulomatös proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schädigung zu sehen.

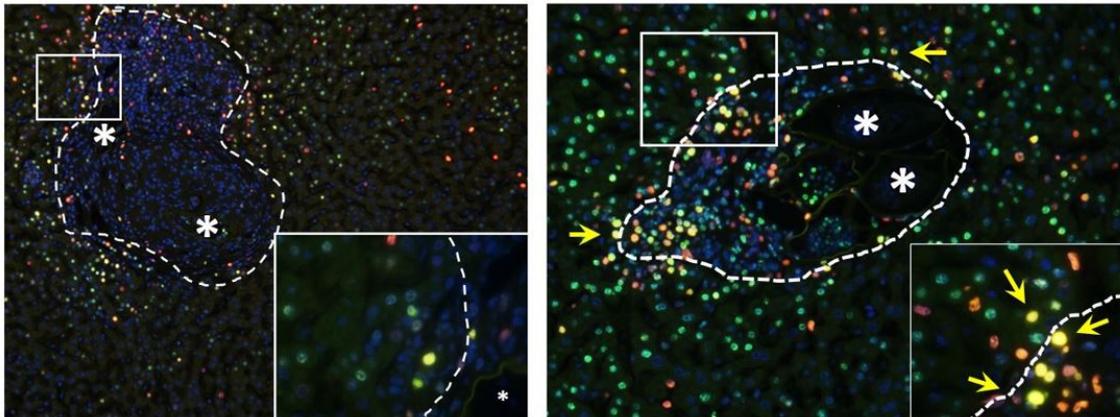


Abbildung 22: Proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schäden in *S. mansoni* infizierten Hamstern. Gezeigt ist eine Ki67 und p-H2AX Doppelfärbung der Zellkerne. Die zwei Hamstergewebeschnitte wurden mit einer Doppelfärbung Multiplex Immunhistochemie behandelt. Es wurde Fluoreszenzmarkierung mit Tyramid Signal Amplifikation (TSA) verwendet, welche den Einsatz mehrerer Primärantikörper aus einer Spezies ermöglicht. Der große Bildausschnitt eines Gewebeschnitts aus den beiden Lebern bisex *S. mansoni* infizierter Hamster entspricht jeweils der Vergrößerung x200. Der weiß umrandete Kasten markiert die Stelle des Ausschnitts, der x1000 vergrößert jeweils in der rechten unteren Ecke dargestellt ist. (p-H2AX grün eingefärbte Zellen, Ki67 rot gefärbte Zellen, Zellkerne in blau; - - - = Begrenzung des Granuloms; * = *S. mansoni* Eier;  = proliferierende Zellkerne mit DNA-Schädigung) Die Zellen, die mit gelben Pfeilen markiert sind, zeigen proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schäden. Dies spricht für das Vorhandensein von Replikationsstress in Granulomnähe.

Dargestellt sind Co-Färbungen der Proteine Ki67 und p-H2AX auf zwei bisex *S. mansoni* infizierten Hamsterlebergewebeschnitten. Durch das Verwenden der Tyramid Signal Amplifikation in Multiplex Immunhistochemie Doppelfärbungen gelang der simultane Nachweis der beiden Proteine in einzelnen Hepatozyten (siehe Kapitel 3.2.5.2). Gut zu sehen sind in Granulomnähe sowohl grün gefärbte Zellen mit p-H2AX Aktivierung (=DNA-Doppelstrangbrüchen), rot eingefärbte Zellen mit Ki67 Aktivierung (=proliferierende Zellen) und gelb eingefärbte Zellen. Diese gelbe Farbe entspricht der simultanen Aktivierung von p-H2AX und Ki67 in einer Zelle und verdeutlicht damit das Vorliegen von Replikationsstress in der Nähe der Granulome.

4.3 *S. mansoni* reduziert die Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression

Die Acetyl-CoA Synthetase 2 ist besonders für ihre Rolle in der Fettsäuresynthese durch die Bildung des Acetyl-CoA, welches im Citratzyklus verarbeitet wird, bekannt. Allerdings hat sie in ihrer exprimierten Form im Zellkern auch Auswirkungen auf die Kondensierung der DNA im Zellkern durch Histonacetylierung. Zur Unterscheidung der Proteinspiegel im Zellkern und -plasma wurden in einem zweiten Schritt nukleäre und zytoplasmatische Extrakte hergestellt.

Verringerte Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern

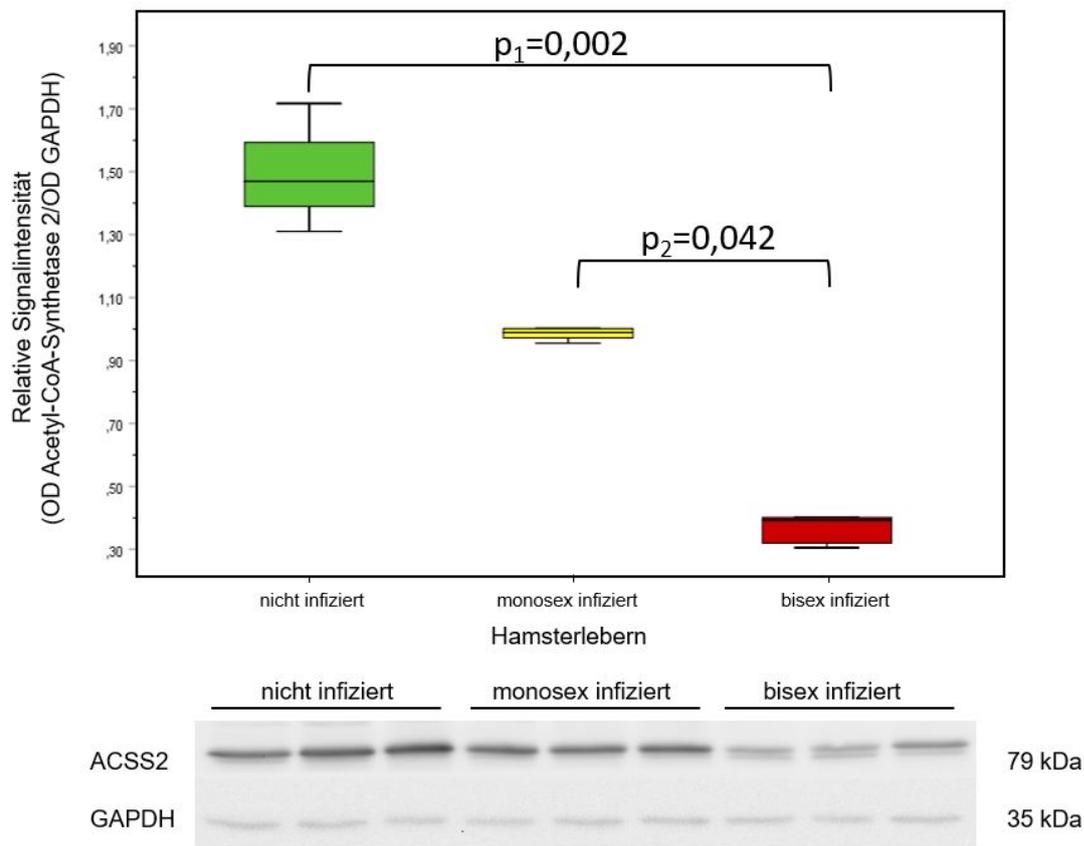


Abbildung 23: Die hepatische Expression der Acetyl-CoA Synthetase 2 war in *S. mansoni* infizierten Hamstern verringert. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen der Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression der drei Gruppen bisex (n=5), monosex (n=5) und nicht infizierter Hamsterlebern (n=3). Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus vier technischen Replikaten. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression der drei Gruppen bisex und monosex *S. mansoni* infizierter sowie nicht infizierter Hamsterlebern, deren Verteilung über die drei Gruppen der Hamsterlebern nicht identisch war ($p=0,005$). In Gruppenvergleichen war die Acetyl-CoA Synthetase 2 in

den Lebern bisex infizierter Hamster geringer exprimiert als in den nicht infizierten Hamsterlebern ($p_1=0,002$). Die geringere Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression in *S. mansoni* bisex infizierten Hamsterlebern wurde gegenüber den monosex infizierten Hamstern gezeigt ($p_2=0,042$). Die Ergebnisse deuten auf eine verringerte hepatische Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern hin.

Eine Schistosomeninfektion reduzierte die nukleäre und zytoplasmatische Expression der Acetyl-CoA Synthetase 2.

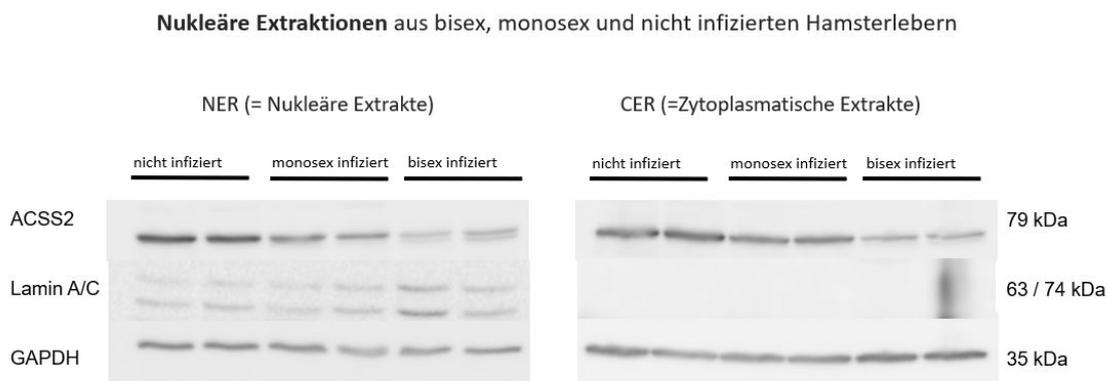


Abbildung 24: Verminderte hepatische Expression der Acetyl-CoA Synthetase 2 in nukleären und zytoplasmatischen Extrakten der *S. mansoni* infizierten Hamster. Zur Unterscheidung der Proteinlevel im Zellkern und -plasma wurden nukleäre und zytoplasmatische Extrakte hergestellt. Die Lyse der Zellmembran ermöglichte die Freisetzung des zytoplasmatischen Zellinhalts und durch Zentrifugationsschritte konnten die nukleären und zytoplasmatischen Proteinfractionen aufgetrennt werden. Gezeigt wird die semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der separierten nukleären und zytoplasmatischen Extrakte der Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression der drei Gruppen bisex, monosex *S. mansoni* infizierter und nicht infizierter Hamsterlebern. Lamin A/C, welches nur im Zellkern exprimiert wird, dient zur Kontrolle der Separierung der Fraktionen. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression der drei Gruppen bisex und monosex *S. mansoni* infizierter sowie nicht infizierter Hamsterlebern in den separierten nukleären und zytoplasmatischen Proteinfractionen. Es wurde hierzu eine repräsentative nukleäre Proteinextraktion durchgeführt, um die reduzierte Acetyl-CoA Synthetase 2 Expression zu lokalisieren. Sowohl im nukleären als auch in dem zytoplasmatischen Extrakt war die Expression der Acetyl-CoA Synthetase 2 in den *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern vermindert. Lamin A/C ist ein ausschließlich nukleär exprimiertes Protein und dient daher zur Kontrolle der korrekten Separierung der nukleären und zytoplasmatischen Extrakte. GAPDH wurde als Ladekontrolle des gleichmäßigen Proteingehalts wie bisher verwendet.

4.4 *S. mansoni* induziert eine DNA-Schädigung

4.4.1 Steigerung der p-H2AX Expression

Das Histon H2AX gilt in der phosphorylierten Variante als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche. Um erste Hinweise für eine gesteigerte DNA-Schädigung während der Schistosomiasis Infektion zu gewinnen, wurde die p-H2AX Expression in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster, SEA stimulierten HepG2 Zellen und den jeweiligen Kontrollgruppen bestimmt.

Erhöhte hepatische p-H2AX Expression in *S. mansoni* infizierten Hamstern

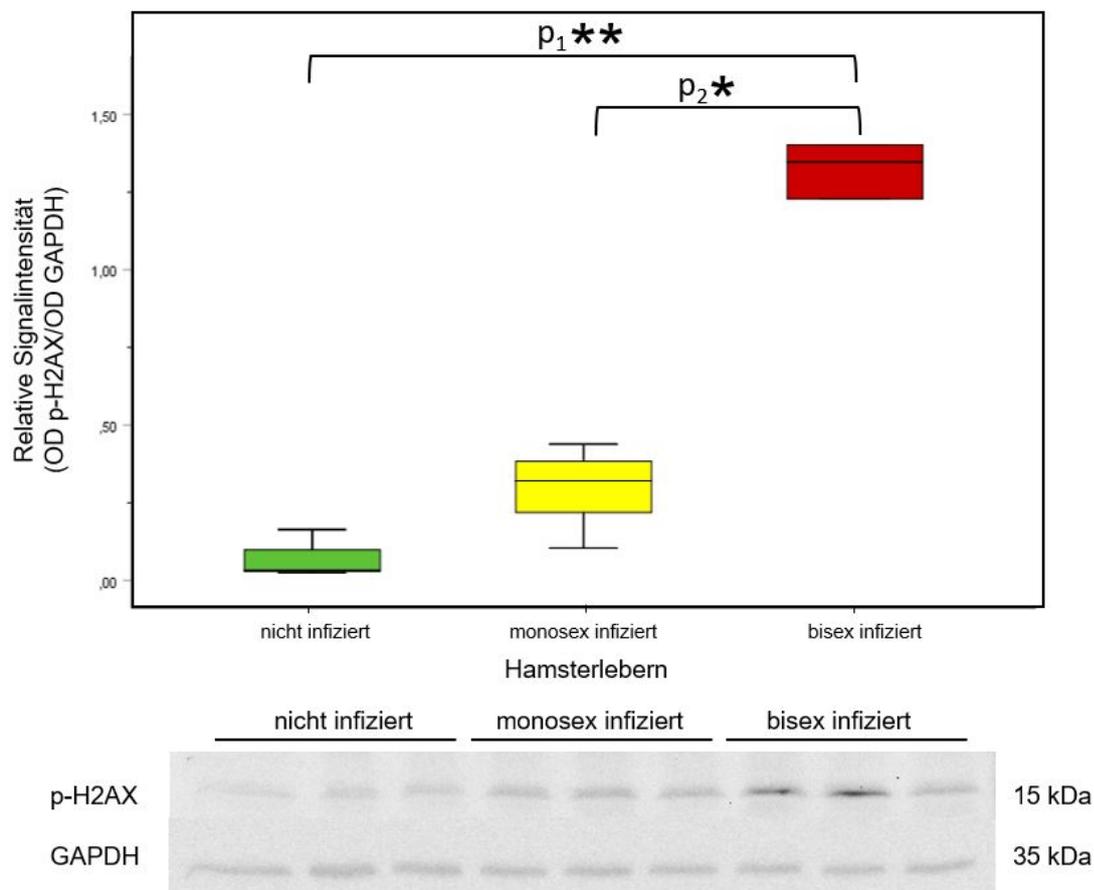


Abbildung 25: Gesteigerte hepatische Aktivierung des Histons p-H2AX in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse der p-H2AX Expression der drei Gruppen bisex (n=5), monosex (n=5) und nicht infizierter Hamsterlebern (n=3), gemessen durch die Signalintensität der Banden. Ein repräsentativer Blot der drei technischen Replikate wird gezeigt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der p-H2AX Expression der drei Gruppen bisex und monosex *S. mansoni* infizierter sowie nicht infizierter Hamsterlebern, deren Verteilung über die drei Gruppen nicht identisch war ($p=0,021$). In Gruppenvergleichen wiesen die Lebern bisex infizierter Hamster eine Expressionssteigerung des p-H2AX gegenüber

den Lebern nicht infizierter Hamster auf ($p_1^{**}=0,002$). Die p-H2AX Expression in *S. mansoni* bisex infizierten Hamsterlebern war auch gegenüber der Gruppe monosex infizierter Hamsterlebern gesteigert ($p_2^*=0,035$). Dies spricht für eine Steigerung der DNA-Doppelstrangbrüche in bisex *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern.

Steigerung der p-H2AX Expression im Zellkulturversuch in SEA stimulierten HepG2 Zellen. Die Stimulation mit SEA und GSH normalisierte p-H2AX auf das Expressionsniveau der Kontrollen.

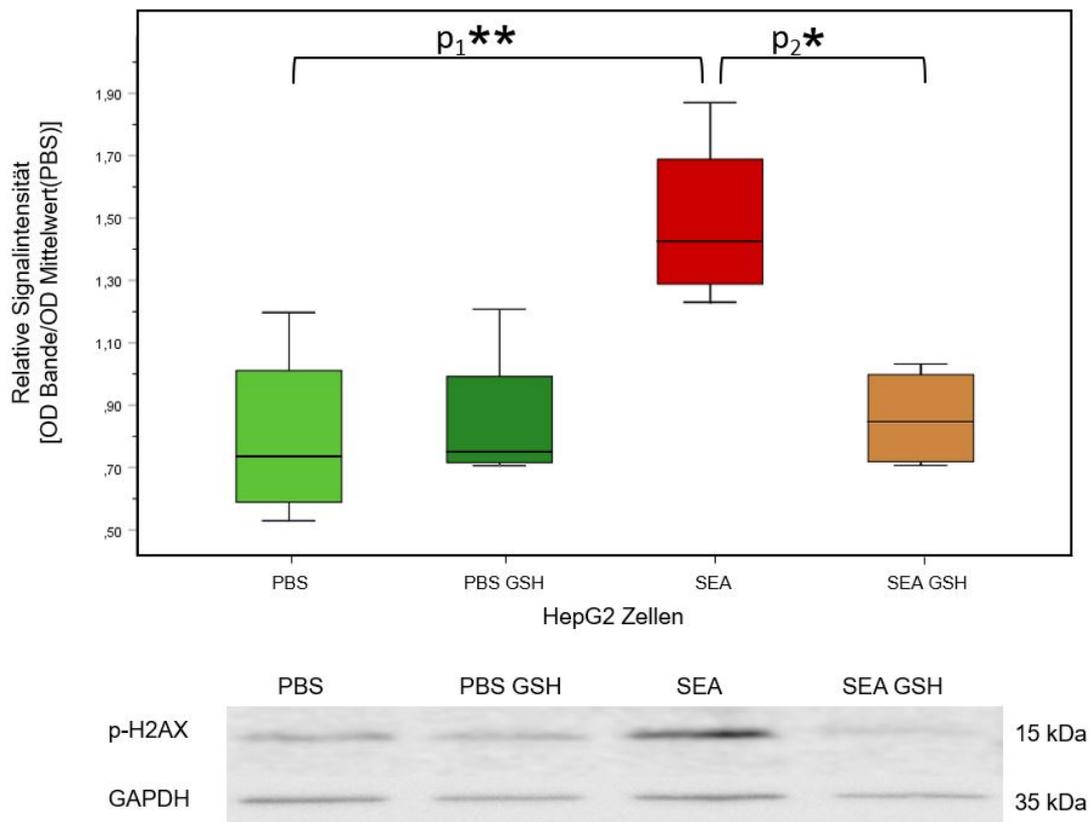


Abbildung 26: Normalisierung der SEA-induzierten gesteigerten p-H2AX Expression in Zellkultur durch GSH. Semiquantitative densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse mit anschließender Normierung durch Bildung des Quotienten aus dem Ergebnis dividiert durch den Mittelwert der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages. Verwendet wurden Zelllysate nach der 24-stündigen Inkubation der Zellen bei einer SEA Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ und 10 mM GSH. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Gezeigt wird ein repräsentativer Blot aus vier unabhängigen Zellkulturversuchen ($n=4$). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Grafik zeigt die Auswertung der p-H2AX Expression eines Zellkulturversuchs mit HepG2 Zellen. Die Zellen wurden entweder in normalem Medium oder GSH angereichertem Medium (10 mM) mit SEA in der Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrolle erfolgte mit PBS, da auch das SEA in PBS gelöst war. Daraus ergaben sich vier unterschiedlich behandelte Gruppen: PBS, PBS+GSH, SEA, SEA+GSH. Die Verteilung der p-H2AX Expression war über die vier Gruppen der

Zelllysate nicht identisch ($p=0,036$). In Gruppenvergleichen war die Expression von p-H2AX in SEA stimulierten Zellen gesteigert ($p_1^{**}=0,008$). Darüber hinaus wurde die p-H2AX Expression Konzentration durch Zugabe von Reduktionsäquivalenten in Form reduzierten GSHs wieder auf das Normalniveau un behandelter Zellen abgesenkt ($p_2^*=0,031$).

4.4.2 Normalisierung der SEA induzierten DNA-Schäden im Comet-Assay mittels reduzierten Glutathions

Der Comet-Assay stellt ein einfaches und zugleich beeindruckendes Verfahren zur direkten Veranschaulichung von DNA-Schäden dar. Durch die Stimulation der HepG2 Zellen mit SEA und GSH vor Durchführung des Assays, konnten deren Auswirkungen auf die DNA-Schäden durch Auszählung der Schweife quantitativ analysiert werden.

Die gesteigerte DNA-Schädigung in SEA stimulierten HepG2 Zellen wurde durch Zugabe des Reduktionsäquivalents GSH verringert.

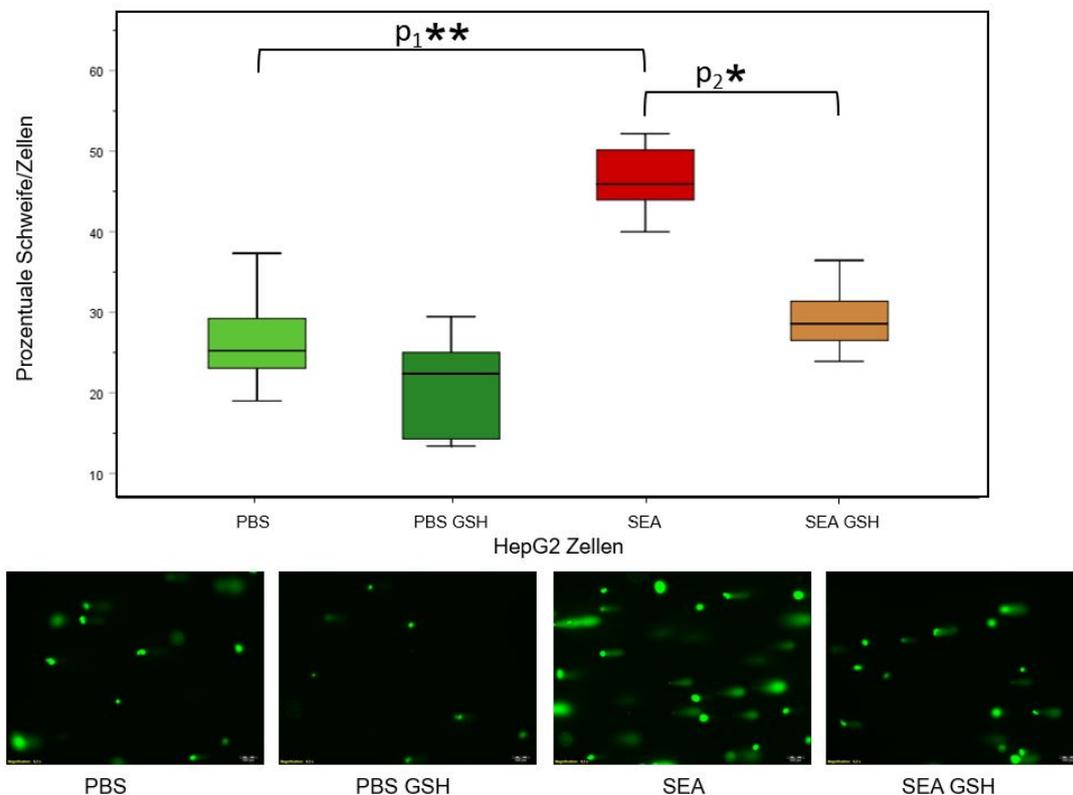


Abbildung 27: GSH reduzierte die SEA-induzierte Zunahme der DNA-Schäden in Zellkultur. Statistische Auswertung der Mittelwerte der prozentualen Schweife aus vier Zellkulturversuchen nach Durchführung des Comet-Assays. Den HepG2 Zellen wurde in vier Versuchen PBS oder SEA zugegeben ($n=4$) und es wurden drei Zellkulturversuche mit der zusätzlichen Applikation von 10 mM GSH durchgeführt ($n=3$). SEA wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur Stimulation verwendet, daraus ergab sich bei einer 48-stündigen Stimulation eine Endkonzentration von 18,4 $\mu\text{g/ml}$. Die vier unterschiedlichen Gruppen PBS, PBS+GSH, SEA und SEA+GSH wurden in Doppelbestimmung analysiert. Pro Gel wurden 10^5 Zellen

verwendet und daraus wiederum jeweils zweimal 100 Zellen pro Gruppe ausgezählt. H₂O₂ wurde als Positivkontrolle verwendet. Gezeigt wird jeweils ein repräsentatives Fluoreszenzbild der vier Gruppen. Eine Zunahme der SEA-induzierten DNA-Schäden wird durch die Schweifzunahme verdeutlicht.

Die Grafik zeigt die Auswertung der HepG2 Zellschweife des Comet-Assays. Für den Comet-Assay wurden die Zellen in vier verschiedenen Ansätzen behandelt: PBS Kontrolle, PBS Kontrolle + Reduktionsäquivalent GSH, SEA Stimulation, SEA + GSH Stimulation. Es erfolgte eine Stimulation mit SEA an zwei aufeinanderfolgenden Stimulationstagen mit einer Endkonzentration von 18,4 µg/ml. Die Auswirkung von Reduktionsäquivalenten auf die DNA-Schädigung wurde bei einer Konzentration von 10 mM GSH untersucht. Die „Schweife“ im Comet-Assay zeigen die DNA-Schädigung an. Die Abbildung 27 oben zeigt, dass die Verteilung der DNA-Schädigung über die vier Zellgruppen nicht identisch war ($p < 0,01$). Der prozentuale Anteil der DNA-Schädigung war in den SEA stimulierten Zellen signifikant höher gegenüber der Kontrollgruppe PBS ($p_1^{**} = 0,001$). Darüber hinaus wurde die DNA-Schädigung durch Zugabe von Reduktionsäquivalenten in Form reduzierten GSHs wieder auf Normalniveau abgesenkt ($p_2^* = 0,02$). Die Abbildung 27 unten zeigt vier repräsentative Aufnahmen der Zellen im inversen Fluoreszenzmikroskop.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in zwei Kategorien zusammenfassen: Untersucht wurde der *S. mansoni*-induzierte oxidative Stress und die Mechanismen der DNA-Schädigung. Die folgende Grafik stellt den Zusammenhang der beiden Parameter inklusive der *S. mansoni*-aktivierten Karzinogenese-assoziierten Signalwege JNK und STAT3 dar. Die Inhibitionsversuche wurden mit GSH und JNK2 Inhibitor durchgeführt.

Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse

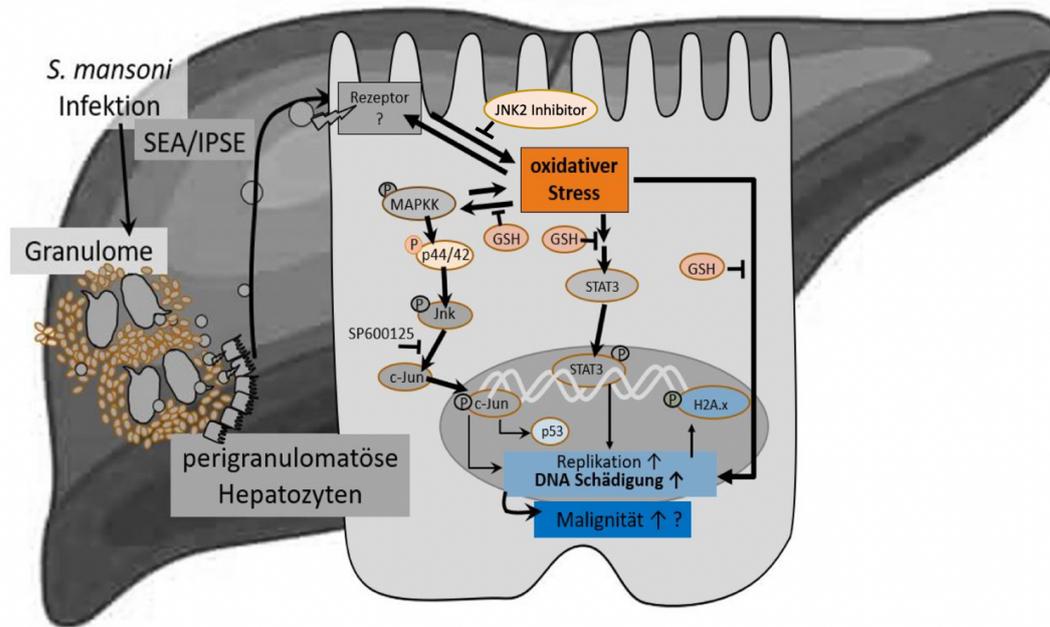


Abbildung 28: Übersicht der Ergebnisse. Die Grafik zeigt die Ergebnisse zum oxidativen Stress in orange und der DNA-Schädigung in hellblau bei *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern sowie mit SEA stimulierten HepG2 Zellen. Es zeigten sich sowohl Einflüsse des oxidativen Stresses auf die Aktivierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege JNK/STAT3, sowie im Gegenzug auch die JNK2-Inhibition verringerte MDA Spiegel zeigte. Die Effekte des oxidativen Stresses ließen sich unter Einsatz des Reduktionsäquivalents GSH als *proof of principle* normalisieren. Es wurde *S. mansoni*-induzierte DNA-Schädigung im Comet-Assay gezeigt, die sich unter GSH Einsatz normalisierte.

5 Diskussion

Die Tropenkrankheit Schistosomiasis gehört zu den weltweit häufigsten parasitären Infektionskrankheiten (World Health Organization 2016). Die höchsten Infektionszahlen werden durch *S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. haematobium* verursacht (Costain et al. 2018). Die Mehrzahl der Infizierten lebt in Afrika, Südamerika und Südostasien, aber auch in Europa spielt die Infektion mit Schistosomen eine immer größere Rolle. Schon seit 2013 werden infizierte Süßwasserschnecken auf Korsika beobachtet (Oleaga et al. 2019). Migration, verstärkte Mobilität und Klimaveränderungen könnten für die Ausbreitung der endemischen Gebiete in Europa verantwortlich sein. Die Infektion stellt nicht nur medizinisch ein Problem dar, sondern ist auch eine sozioökonomische Belastung (Löscher and Burchard 2010; Sacolo et al. 2018). Neben den akuten Folgen zeigt sich in diversen Studien ein Zusammenhang zwischen der chronischen *S. mansoni* Infektion und der hepatischen Karzinogenese (Inzidenz des Hepatozellulären Karzinom (HCC)) (El-Tonsy et al. 2013; Gomaa et al. 2008; Toda et al. 2015). Die dauerhafte Aktivierung der Jak/STAT sowie der Ras Signalwege scheint essentiell für die Entstehung von Mutationen im Verlauf der HCC Entstehung zu sein (Calvisi et al. 2006; El-Serag and Rudolph 2007). Die MAPK Aktivierung geht mit einer verstärkten Zellproliferation in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren einher, welche zur Tumorentstehung führen kann (Marra et al. 2011). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Aktivierung der Jak/STAT Signalwege durch *S. mansoni* am Tiermodell Schistosomen-infizierter Hamster gezeigt (Roderfeld et al. 2020).

Die vorliegende Arbeit untersucht nun die Frage des Zusammenhangs zwischen den aktivierten HCC-assoziierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT3 und der Zellzyklusregulation bei *S. mansoni* Infektionen im Gesamtorganismus und in Leberzellkulturstudien. Da in bisherigen Studien noch kein direkter Nachweis einer DNA-Schädigung durch *S. mansoni* gelungen ist, lag der Fokus dieser Studie auf der DNA-Replikation, der DNA-Schädigung und der DNA-Reparaturmechanismen. In diversen Studien wird *S. mansoni*-induzierter oxidativer Stress beschrieben (Abdallahi et al. 1999; Cunha et al. 2012; Gharib et al. 1999; de Oliveira et al. 2013; Pascal et al. 2000). Daraus leitet sich die Fragestellung des therapeutischen Potentials von Antioxidantien wie reduziertem Glutathion (GSH) ab, welches in der Arbeit untersucht wird. Zur Klärung der molekularbiologischen Zusammenhänge stimulierten wir in den Zellkulturversuchen HepG2 Zellen mit löslichen *S. mansoni* Ei-Antigenen und untersuchten im Tiermodell Hamsterlebern aus drei unterschiedlichen Versuchsgruppen: nicht infizierte Tiere, monosex infizierte und bisex mit *S. mansoni* infizierte Tiere.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass *S. mansoni* in der Leber oxidativen Stress induziert.

Weiterhin induziert SEA (siehe Abbildung 27, Ergebnisse des Comet-Assays) in HepG2 Zellen DNA-Schäden. Die Zugabe von GSH, als therapeutischer Ansatz, unterdrückt oxidativen Stress und reduziert SEA-induzierte DNA-Schäden.

Eine SEA-bedingte Aktivierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege c-Jun und STAT3 kann in Zellkulturexperimenten durch den Einsatz von Reduktionsäquivalenten normalisiert werden (siehe Abbildung 11 & 12). Dies deutet daraufhin, dass der durch SEA-induzierte oxidative Stress für die Aktivierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege, auf die ich in den folgenden Abschnitten näher eingehe, eine Rolle spielt.

5.1 Hepatischer oxidativer Stress ausgelöst durch parasitäre Erkrankungen und speziell durch SEA

Oxidativer Stress tritt in Zellen auf, wenn das Gleichgewicht aus Oxidation und Antioxidantien gestört ist. Ein Überschuss der ROS, welcher zum Großteil in den Mitochondrien, aber auch im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten gebildet wird, kommt sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen in der Leber vor (Glantzounis et al. 2005; Sies et al. 2017). Ein weiterer Grund für vermehrte ROS kann die erreichte Kapazität der antioxidativen Mechanismen sein: Enzyme (Katalase, SOD), Glutathion, Vitamin E etc. (Dryden et al. 2005; Li et al. 2015). ROS spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der zellulären Signalübertragung und den Abwehrmechanismen des Immunsystems und haben Einfluss auf die Proteinexpression, Apoptose und Transkription der DNA (Li et al. 2015).

In diversen Studien wird sowohl in Tierversuchen, als auch in humanen Studien parasitär-induzierter oxidativer Stress beschrieben (Abd Ellah 2013; Sarin et al. 1993; Smith and Bryant 1989). *Theileria*-Arten erhöhen in Erythrozyten den MDA Spiegel, bilden ROS und vermindern die anti-oxidativen Mechanismen. Oxidativer Stress wird auch bei Malaria Infektionen beobachtet: *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten zeigen eine verminderte Aktivität der Katalase, der SOD, der Glutathion-Peroxidase sowie von Vitamin E (Müller 2004). Der Hämoglobin-Metabolismus des Parasiten führt zur ROS Produktion und verringert das intrazelluläre GSH. In Studien mit *Trypanosoma brucei* infizierten Mäusen wird unter Einsatz eines Stickstoffmonoxid(NO)-Blockers eine signifikante Reduktion der Anämie beschrieben (Abd Ellah 2013). Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem NO \cdot Level und der

Schwere einer humanen Chagasinfektion mit *Trypanosoma cruzi* (Pérez-Fuentes et al. 2007). Das Vorkommen von oxidativem Stress bei *S. mansoni* Infektionen ist bereits von mehreren Autoren vorbeschrieben. Bisher wurden hierfür ausschließlich Zellen des Immunsystems des Wirtes als Auslöser vermutet (Abdallahi et al. 1999; de Oliveira et al. 2013).

Vergleicht man nun den oxidativen Stress der *S. mansoni* Infektion *in vivo* und *in vitro* mittels MDA Marker, sind die MDA Spiegel der SEA stimulierten HepG2 Zellen und des Lebergewebes aus *S. mansoni* infizierten Hamstern gegenüber den Kontrollgruppen erhöht (siehe Abbildungen 5 und 6). Die Aktivität der enzymatischen Antioxidans Katalase ist ebenfalls in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und korreliert mit dem Infektionsgrad der Hamster (siehe Abbildung 8). Dies bestätigt, dass die infizierten Hamsterlebern verstärkt oxidativem Stress ausgesetzt sind.

Bei kompletter Abwesenheit von Zellen des Immunsystems wurde in Zellkulturversuchen an einer reinen Hepatomzelllinie eine oxidative Schädigung durch SEA beobachtet (siehe Abbildungen 26 und 27). Wir schließen aus unseren Beobachtungen, dass während der *S. mansoni* Infektion hepatischer oxidativer Stress neben den Immunzellen auch durch SEA direkt ausgelöst werden kann.

5.2 Allgemeine therapeutische Ansätze bei oxidativem Stress, GSH als therapeutischer Ansatz bei *S. mansoni* Infektion

Für therapeutische Ansätze bei oxidativem Stress stehen inzwischen zahlreiche isolierte Substanzen oder Stoffverbindungen aus Pflanzen zur Verfügung, die zum Teil in Tierversuchen untersucht wurden (z.B. Epicatechin aus grünem Tee, Phenole aus *Amaranthus hypochondriacus* Samen oder mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäuren) (Augustyniak, Waszkiewicz, and Skrzydlewska 2005; Li et al. 2015; López et al. 2011). Versuche an Ratten und Mäusen zeigen, dass Ethanol-induzierte Erhöhungen der Transaminasen und MDA Spiegel, sowie eine reduzierte Aktivität der Enzyme SOD und Katalase durch eine Therapie mit L-Theanin und Vitamin E normalisiert werden können (Kaur, Shalini, and Bansal 2010; Li et al. 2012). Raxofelast, ein Vitamin E Derivat, kann die GSH Spiegel, TNF und die Transaminasen nach Ethanol-induziertem oxidativen Stress bei Ratten normalisieren (Altavilla et al. 2005).

Da eine unspezifische Reduktion der ROS in diversen klinischen Studien gescheitert war, werden aktuell Versuche einer gezielten Therapie auf spezifische Enzymreaktionen angestrebt um isoliert den schädlichen ROS Überschuss bei chronischen Lebererkrankungen beeinflussen zu können (Chandel and Tuveson 2014; Harris and DeNicola 2020). Hierzu zählen Inhibitoren der mitochondrialen Dysfunktion (CoenzymQ10, Mitoquinol Mesylat), des Endoplasmatischen Retikulum Stresses, NADPH Oxidase (NOX)-Inhibitoren und Toll-like-Rezeptorinhibitoren. Die wesentlichen Erkenntnisse zu diesen neuen vielversprechenden Medikamenten stammen aus präklinischen Versuchen. Systematische klinische Studien und Untersuchungen stehen jedoch noch aus (Chandel and Tuveson 2014; Harris and DeNicola 2020; Luangmonkong et al. 2018).

In klinischen Studien wurde vor allem Vitamin E als Reduktionsmittel bei diversen Lebererkrankungen getestet (Phase 2 und 3) (Li et al. 2015). Sanyal et al. zeigen eine Verbesserung der Steatosis hepatis bei Therapie mit Vitamin E. Die Kombination aus Vitamin E und Pioglitazon war allerdings deutlich effektiver gegenüber der Einzeltherapie zur Behandlung der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (Sanyal et al. 2004). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Reduktionsmittel als Ergänzung zu bisherigen Therapeutika die beste Wirkung zeigen. Medikamente wie Silymarin, Metadoxin und N-Acetylcystein reagieren teilweise als Antioxidantien und werden in Phase 4 Studien bei nicht-alkoholischer und alkoholischer Steatohepatitis sowie bei Leberfibrose eingesetzt (Li et al. 2015). Ein großes Problem der Therapie mit Reduktionsmitteln ist, dass die bereits guten Erfolge in klinischen Studien mit Tieren bisher nur zum Teil auf den Menschen übertragbar sind (Chandel and Tuveson 2014; Dobbstein and Sørensen 2015). Schwierigkeiten bei der Therapie des oxidativen Stresses bestehen durch die vielen physiologischen Prozesse in denen ROS benötigt wird, sowie durch die fehlenden klinischen Marker zum Monitoring des Redox-Status (Luangmonkong et al. 2018). Laut Li et al. fehlen derzeit noch Kenntnisse zur Bioverfügbarkeit, Absorption im Darm sowie Dauer und Dosierung der Reduktionsmittelgabe bei Menschen (Li et al. 2015). Weitere klinische Versuche stehen aktuell noch aus.

Die Experimente dieser Arbeit zeigen vielfache Effekte des GSHs *in vitro*. GSH reduziert in SEA-stimulierten Zellen DNA-Schäden, Zellzyklusveränderungen und der die Aktivierung Karzinogenese-assoziiertes Signalwege. Dies wird in den semiquantitativen Western Blot Analysen der folgenden Proteine deutlich: Es kommt zu statistisch signifikant reduzierter p-H2AX Aktivierung, und damit indirekt zu weniger DNA-Doppelstrangbrüchen (siehe Abbildung 26). Weiterhin deutet sich durch die

Zugabe von GSH eine Normalisierung des Proliferationsmarkers PCNA, der Karzinogenese-assoziierten Signalwege ERK, c-Jun und STAT3, sowie des Cyclin D1 an (siehe Abbildungen 11, 12, 13, 17 und 19). GSH senkt die Anzahl der Zellschweife im Comet-Assay (siehe Abbildung 27). Dies lässt auf eine direkte GSH-bedingte Reduktion der DNA-Schäden schließen. Zur Therapie des oxidativen Stresses wurde GSH in ersten klinischen Studien bereits erfolgreich eingesetzt: Honda et al. zeigen eine klinische Verbesserung der Laborparameter von 29 Patienten mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung nach oraler GSH Therapie und auch Qian et al. erreichten mit intravenösen GSH Gaben in einer 104 Patienten umfassenden klinischen Studie eine Verbesserung der hepatischen Laborwerte bei Hepatitis B infizierten Patienten (Honda et al. 2017; Qian et al. 2017). Nach aktuellem Kenntnisstand ist der Einsatz von oral eingesetzten Antioxidantien zur Reduktion der Inzidenz von Karzinomen in prospektiven klinischen Studien allerdings bisher durchgängig gescheitert (Chandel and Tuveson 2014). Trotzdem gelang uns mit der Verwendung von GSH in Zellkulturversuchen der Proof-of-Principle-Nachweis, die prinzipielle Machbarkeit: Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche zeigen, dass Reduktionsmittel zur Bekämpfung der DNA-Schäden und Normalisierung der aktivierten Karzinogenese-assoziierten Signalwege bei einer *S. mansoni* Infektion durchaus eine Therapiemöglichkeit bieten. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf *in vivo* Studien steht aktuell noch aus. Hierbei könnten die beiden Ansätze von Chandel und Tuveson zur Therapie des oxidativen Stresses in Betracht gezogen werden: Neben dem Einsatz von direkten Inhibitoren der mitochondrial oder mittels der membranständigen NADPH Oxidase gebildeten ROS sollte auch ein antioxidatives Profiling der speziell verwendeten ROS Wege der einzelnen Tumorarten bedacht werden (Chandel and Tuveson 2014). Ein Diethylnitrosamin (DEN)-induziertes HCC Model mit *S. mansoni* infizierten Mäusen und oral eingesetzten ROS Inhibitoren oder unspezifischen Antioxidantien wie Vitamin E könnte z.B. zur Klärung genutzt werden.

5.3 *S. mansoni* Infektion und Karzinogenese

Die Karzinogenese von Hepatozyten ist als mehrstufiger Prozess beschrieben, bei dem mehrere Mutationen und kontinuierliche entzündliche Reize über die Leberzirrhose schließlich zum HCC führen (Marra et al. 2011). Adulte gepaarte Schistosomen produzieren im Laufe einer *S. mansoni* Infektion täglich hunderte Eier, welche kontinuierlich hepatotoxische und immunmodulatorische Antigene ausschütten (Colley et al. 2014; Roderfeld et al. 2020). Marra et al. bezeichnen die Aktivierung der MAPK,

durch die Phosphorylierung von p44/42 (=ERK1/2) als eine zelluläre Modifikation, die zur Karzinogenese und zur HCC Entwicklung führen kann. Neben der MAPK Aktivierung, führen auch die Aktivierung von p53, ROS und die Jak/STAT-Aktivierung zu diesen mehrstufigen Mutationsprozessen. Roderfeld et al. beschreiben in Vorarbeiten die Aktivierung diverser Karzinogenese-assoziiertes Signalwege (c-Jun, STAT3), sowie die gesteigerte Expression der Proteine MCM2, PCNA und p27 in bisex *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern und SEA stimulierten Zellen (Roderfeld et al. 2020). In Gewebeschnitten bisex infizierter Hamsterlebern ließen sich die Aktivierung von c-Jun, MCM2, PCNA und p-H2AX in Granulomnähe ausfindig machen. Hepatische Gewebeschnitte von *S. mansoni* erkrankten Patienten zeigten c-Jun verstärkt in Granulomnähe exprimiert (Roderfeld et al. 2020).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darüber hinaus auf eine gesteigerte p53 Expression und p44/42 Aktivierung in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster hin. Die Aktivierung von p44/42 durch SEA deutet sich auch in den Zellkulturversuchen mit SEA stimulierten HepG2 Zellen an. Des Weiteren konnte die gesteigerte PCNA und p27 Expression in bisex infizierten Hamsterlebern bestätigt werden und eine weitere Kontrollgruppe der monosex infizierten Hamster wurde eingeführt. Zusätzlich konnte eine Normalisierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege c-Jun, STAT3 und p44/42, sowie der PCNA durch GSH in SEA-stimulierten HepG2 Zellen gezeigt werden (siehe Abbildungen 11, 12, 17 und 19). Die Ergebnisse der gesteigerten p-H2AX Expression in bisex infizierten Hamsterlebern und SEA-stimulierten HepG2 Zellen werden unter 5.4.1 diskutiert.

5.3.1 Zusammenhang des oxidativen Stresses und der MAPK/JNK Signalweg Aktivierung bei *S. mansoni* Infektion

Die direkte Wirkung von ROS und der MAPK/JNK Aktivierung auf die Karzinogenese der Hepatozyten ist von Marra et al. bereits vorbeschrieben (Marra et al. 2011). Sowohl verstärkter oxidativer Stress als auch aktivierte MAPK/JNK Signalwege werden bei Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster und SEA stimulierten Zellen beobachtet (siehe Abbildungen 5 und 6; Roderfeld et al. 2020). Hierfür sprechen ebenfalls die erhöhten MDA Spiegel und die Aktivierung von c-Jun, STAT3 und p44/42 in SEA stimulierten Zellen, und die erhöhten MDA Level und Aktivierung von p44/42 in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern (siehe Abbildungen 11, 12, 18 und 19).

Zur Klärung des Zusammenhangs zwischen dem oxidativen Stress und den aktivierten MAPK/JNK Signalwegen bei einer *S. mansoni* Infektion dient der MDA Assay und der

c-Jun Proteinnachweis (Western Blot). Unter Einsatz des JNK2 Inhibitors zeigt sich eine Abnahme der SEA-induzierten MDA Spiegel. Der oxidative Stress wird durch den MAPK/JNK Signalweg beeinflusst. Im Gegenzug deutet der verminderte relative Proteingehalt c-Jun/GAPDH aus explorativen Versuchen bei Verwendung von GSH ebenfalls auf eine Wechselwirkung zwischen oxidativem Stress, dem Einsatz von Reduktionsäquivalenten und der darauffolgenden normalisierten c-Jun Expression hin. Damit deutet sich ein Einfluss des oxidativen Stresses auf die Aktivierung des MAPK/JNK Signalwegs an. Diese Ergebnisse beruhen bisher nur aus explorativen Versuchen. Zur eindeutigen Klärung der Wechselwirkungen des oxidativen Stresses auf die Karzinogenese-assoziierten Signalwege stehen konfirmatorische Versuche aus, die eine statistisch signifikante Aussage ermöglichen würden. Bisher deuten die Versuche, die dieser Arbeit zugrunde liegen, auf gegenseitige Wechselwirkungen hin, die im Detail noch weiter untersucht werden sollten. Die Hinweise darauf, dass eine Therapie des oxidativen Stresses die durch *S. mansoni* induzierte Aktivierung der Karzinogenese-assoziierten Signalwege verhindern kann, könnten erste Hinweise sein, dass eine antioxidative Therapie der *S. mansoni* Infektion eine Reduktion der HCC Entstehung im chronischen Verlauf reduzieren könnte.

5.3.2 Bedeutung der neuen Erkenntnisse vor dem Hintergrund HCC & *S. mansoni* Infektion

Die SEA-induzierte Aktivierung der HCC-assoziierten Signalwege zeigt einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines HCC und einer *S. mansoni* Infektion (Gomaa et al. 2008; Roderfeld et al. 2020; Ross et al. 2002; Thun et al. 2017; Williams 2006). Die Zellkulturversuche dieser Arbeit mit GSH deuten auf eine therapeutische Option der Reduktionsagentien im Hinblick auf eine Normalisierung der Aktivität der Karzinogenese-assoziierten Signalwege hin. ROS haben ebenfalls durch das Auslösen von DNA-Schäden eine maßgebliche Rolle bei der allgemeinen Tumorentstehung, sowie in konkreten Fällen der Mutagenese eines HCC bei chronischen Infektionen mit Hepatitis B und C (Marra et al. 2011). Dies könnte zu neuen Versuchen ermutigen, in denen Reduktionsmittel als Ergänzung zur bisherigen antibiotischen Therapie der *S. mansoni* Infektion in Betracht gezogen werden. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es hierzu noch keine Studien. Die Hypothese, dass GSH einen therapeutischen Einfluss auf die SEA-induzierte Aktivierung Karzinogenese-assoziierten Signalwege hat, leitet sich aus den bisherigen explorativen Versuchen ab und wurde im Rahmen der vorliegenden Studie konfirmatorisch untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse

zeigen, dass die Behandlung mit Reduktionsäquivalenten eine therapeutische Option zur Normalisierung Karzinogenese-assoziiierter Effekte durch Schistosomiasis darstellt. Eine der Intentionen des Einsatzes von Antioxidantien im Falle einer *S. mansoni* Infektion wäre die Verhinderung der Entstehung von HCC assoziierten Mutationen und damit ein präventives Vorgehen.

5.4 *S. mansoni* Infektion und epigenetische Regulationen

5.4.1 Regulation der Replikation / DNA-Reparaturmechanismen (p53, ACSS2, p-H2AX, CHK1) bei *S. mansoni* Infektion

p-H2AX gilt als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche. Bisher wurde dieser Marker in Gewebeschnitten bisex infizierter Hamsterlebern in Granulomnähe vorbeschrieben (Roderfeld et al. 2020). p-H2AX zeigt indirekt durch signifikante Aktivitätssteigerung sowohl in HepG2 Zellen durch SEA-induziert, als auch in Hepatozyten *S. mansoni* infizierter Hamster eine DNA-Schädigung an (siehe Abbildungen 25 und 26). Diese Befunde werden im Comet-Assay bestätigt. Hier zeigt sich durch SEA eine signifikant erhöhte Anzahl von Zellen mit DNA-Schäden (siehe Abbildung 27). Durch diese Arbeit gelang es erstmals SEA-induzierte DNA-Schäden direkt nachzuweisen.

Unsere Arbeitsgruppe hat bisher eine SEA-induzierte gesteigerte Expression von PCNA und Cyclin D1 in Zellkultur zeigen können (Roderfeld et al. 2020). Die für die Replikation erforderliche Ringklemme PCNA, welche die Bindung der Polymerasen an die DNA ermöglicht und aufrechterhält, gilt als Marker der Replikation. Die durch GSH normalisierten relativen Proteinkonzentrationen PCNA/GAPDH und Cyclin D1/GAPDH legen einen präventiven Schutz des Reduktionsäquivalents auf die Zellzykluskontrolle und gesteigerte Replikation nahe (siehe Abbildungen 13 und 17). Die Normalisierung der Replikationsmechanismen durch den therapeutischen Einsatz von Reduktionsmitteln bietet Möglichkeiten für weitere klinische Versuche auf diesem Gebiet.

Im Gegensatz dazu deuten die Western Blot Analysen der *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern auf einen verminderten relativen Proteingehalt der Acetyl-CoA-Synthetase2/GAPDH hin (siehe Abbildung 23). Daraus leitet sich eine metabolische Regulation in Form einer verminderten Fettsäuresynthese ab. Die hepatischen Stoffwechselfunktionen bei *S. mansoni* Infektion werden in Folgestudien weiter untersucht werden und liegen außerhalb des Fokus dieser Dissertation.

Als Nebeneffekt führt die Regulation der Acetyl-CoA-Synthetase 2 im Zellkern (siehe Abbildung 24) zu einer verminderten Acetylierung der DNA und damit zu einer kondensierten Verpackung. Die Replikation wird durch fehlende Acetylierung erschwert. Da die Zell-Proliferation in allen anderen Versuchen verstärkt war (siehe Abbildungen 16, 17, 21 und 22), scheint die Acetyl-CoA Synthetase 2 Regulation einen eher geringen Effekt auf die Replikation zu haben. Die *S. mansoni* Infektion führt zu einer deutlichen Steigerung von Proliferation, Replikation und Replikationsstress.

Weitere explorativ durchgeführte Versuche geben Hinweise auf die Regulation des Zellzyklus und der Replikation durch *S. mansoni* Infektionen: Die relativen Proteinkonzentrationen (p)-CHK1/GAPDH, p53/GAPDH und p27/GAPDH deuten bei den infizierten Hamsterlebern eine Expressionssteigerung der für den Zellzyklus relevanten Proteine hin. p53 und dessen Zielprotein p27 zählen zu den Zellzyklus Kontrollpunkten. Eine gestörte Zellzykluskontrolle gilt als Hauptkennzeichen der hepatischen Karzinogenese (El-Serag and Rudolph 2007). Die angedeutete Expressionssteigerung von p53 (siehe Abbildung 15), dem sogenannten Wächter des Genoms, lässt auf weitreichende Eingriffe der *S. mansoni* Infektion auf den Zellzyklus schließen. p53 ist der Hauptakteur der Tumor-Suppressor Proteine und hat damit entscheidende Bedeutung für DNA-Replikation, Kontrolle der Stabilität des Erbguts und ist richtungsweisend für die Proliferation und die Apoptose der Hepatozyten. Im Gegensatz zu dem physiologisch niedrigen p53 Spiegel, steigt die Expression des p53 unter zellulärem Stress oder bei DNA-Schäden deutlich an (Turgeon et al. 2018). Eine gesteigerte p53 Expression deutet also auf einen hohen Zellumsatz, zellulären Stress und DNA-Schäden bei der *S. mansoni* Infektion hin.

Dies wird ebenfalls durch die gesteigerte Expression und Aktivierung von CHK1 untermauert (siehe Abbildung 20). Das Protein hat eine maßgebliche Rolle in der Kontrolle des Erbguts unter Stress und gilt zusammen mit der ATR-Phosphorylierungsstelle Ser345, die wir in dieser Studie analysieren, als präklinisch wichtigster Marker für Replikationsstress (Taylor and Lindsay 2016).

5.4.2 Replikationsstress bei *S. mansoni* Infektion

Es gibt deutliche Hinweise auf hepatischen Replikationsstress in den Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster. In hepatischen Gewebeschnitten *S. mansoni* infizierter Hamster wird simultan MCM2 und p-H2AX angefärbt, wie auch Ki67 und p-H2AX. Die proliferierenden Hepatozyten mit simultaner DNA-Schädigung in

Hamstergewebeschnitten sprechen für den Replikationsstress der perigranulomatösen Zellen. Die gegensätzlichen Ergebnisse der Aktivierung von sowohl Zellzyklus aktivierenden als auch inhibierenden Proteinen wie p27, p53 und CHK1 sprechen gemeinsam mit den resultierenden SEA-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen für erhöhten Stress während der Replikation. Die Replikationsstressmarker p-H2AX und phosphoryliertes CHK1 sind beide in den Lebern bisex *S. mansoni* infizierter Hamster erhöht (siehe Abbildungen 20 und 21). p-H2AX als Marker lässt dabei Spielraum für Interpretationen, da H2AX neben der Phosphorylierung durch ATR auch bei DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert ist (Taylor and Lindsay 2016).

Die Erkenntnisse zum Replikationsstress bei einer *S. mansoni* Infektion bieten für die zukünftige Forschung zwei Anwendungsmöglichkeiten: Marker des Replikationsstress können zur molekularen Frühdiagnostik der Karzinogenese dienen. Daneben lassen sich auch neue Angriffspunkte für eine Therapie ableiten (Gaillard et al. 2015). Obwohl sich die Übertragung der *in vitro* etablierten Biomarker auf die Klinik häufig durch hohe Kosten, mangelnde Sensitivität und Validitätsprobleme schwierig gestaltet, sind inzwischen einige Marker und Therapeutika wie Nucleosid Analoga, Gemcitabine und PARP1-Inhibitoren zugelassen (Dobbelstein and Sørensen 2015; Ludwig and Weinstein 2005; Ren et al. 2017). Es kommt hinzu, dass die meisten aktuell eingesetzten krebsbekämpfenden Medikamente DNA-Schäden hervorrufen, was direkt oder indirekt eine Steigerung des Replikationsstress bedeutet. Dies führt zu unkontrollierter Proliferation, die den Krebszellen zum eigenen Verhängnis wird (Dobbelstein and Sørensen 2015). Substanzen der DNA-Schadungsreparatur stehen ebenfalls zur krebsbekämpfenden Therapie zur Verfügung. In klinischen Versuchen wurden Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) Inhibitoren zur Therapie der soliden Brusttumoren eingesetzt (Lord and Ashworth 2012). Eine molekularbiologische Untersuchung der Tumorzellen und individualisierte Therapie mit gezielten molekularbiologischen Therapeutika sollte gegenüber der konventionellen Chemotherapie bei Brustkrebs, Ovarial- und Prostatakarzinomen in Betracht gezogen werden (Fong et al. 2009). Dies gilt es nun auch auf die HCC Therapie zu übertragen. Da Krebszellen mit hohem Replikationsstress zum Überleben auf die ATR-CHK1 Aktivierung angewiesen sind, können ATR und CHK1 Inhibitoren zukünftig ebenfalls zur Therapie genutzt werden (Taylor and Lindsay 2016). Beide werden derzeit sowohl als Monotherapie als auch in Kombinationen mit bisher eingesetzten Medikamenten getestet (Gaillard et al. 2015).

5.5 Translationale Anwendbarkeit

Diese Arbeit nutzt in Zellkulturversuchen GSH zur Minderung des oxidativen Stresses bei *S. mansoni* Infektion. Erste klinische Versuche untersuchen Reduktionsmittel zur Minderung des oxidativen Stresses bei hepatischer Steatose und Fibrosierung (siehe Kapitel 5.2). Zur Therapie der *S. mansoni* Infektion wird bisher noch keines dieser Reduktionsmittel getestet. Da erhöhter oxidativer Stress bei *S. mansoni* Infektionen neben der Leber auch vermehrt in den Nieren und der Milz beschrieben ist (de Oliveira et al. 2013), könnten Versuche mit Reduktionsmitteln mit *S. mansoni* infizierten Tieren gleich in mehreren Organen therapeutische Lösungsansätze bieten.

Durch gezieltes Angreifen der Auslöser wird in die Balance des Redoxsystems eingegriffen. Es gilt zu beachten, dass oxidativer Stress allerdings auch physiologischerweise von Zellen genutzt wird. Kommt es hier zum Gegensteuern, könnten z.B. die Zellen des Immunsystems an Wirkung bei der parasitären Abwehr verlieren. Tierversuche mit Reduktionsmitteln zur Minderung des oxidativen Stresses bei *S. mansoni* Infektion können eine Antwort auf die Frage der positiven oder negativen Dysbalance des Redoxsystems geben. Eine Kombination der bisherigen Medikation aus Praziquantel in Kombination mit Reduktionsmitteln (z.B. Vitamin E oder neue gezielt ROS-reduzierende Medikamente) sollte in Betracht gezogen werden.

Des Weiteren wurde durch die vorliegende Arbeit dem Replikationsstress in *S. mansoni* infizierten Lebern nachgegangen. Die Erkenntnisse über die Art des Replikationsstress erlauben ein zukünftig gezielteres Eingreifen und damit eine Verbesserung der Diagnostik und Therapie der *S. mansoni* Infektion.

5.6 Limitationen der Arbeit

Eine wesentliche Limitation dieser Arbeit war die begrenzte Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe. Trotz der relativ hohen Anzahl von 21 *S. mansoni* infizierten Hamstern der *in vivo* Versuche kann nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, da lediglich drei nicht infizierte Hamster als Kontrollgruppe dienten. Mit einer größeren Anzahl an Tieren könnte man eine Normalverteilung erreichen und statistisch vorgeben. Die begrenzte Anzahl an Versuchstieren ist dennoch statistisch auswertbar.

Die Einteilung in Haupt- und Nebenzielparameter führt zu Einschränkungen der statistischen Aussagekraft hinsichtlich der Nebenzielparameter. Trotzdem lassen sich die Hauptzielparameter und damit die wichtigsten Hypothesen der Arbeit (siehe Kapitel

4.1 / 4.4) statistisch bestätigen. Die Ergebnisse der Nebenzielparameter ($p < 0,05$) werden zur Herleitung weiterer Hypothesen und konfirmatorischer Versuche verwendet.

Des Weiteren sind ausschließlich weibliche Versuchstiere verwendet worden wie unter 3.1.9 beschrieben. Die in der vorliegenden Studie identifizierten durch *S. mansoni* regulierten Parameter für oxidativen Stress und DNA-Schädigung werden in einer Folgestudie auch in männlichen Wirten überprüft werden. Die Folgestudie wird Geschlechtsunterschiede oder -gemeinsamkeiten der Tiere in Bezug auf oxidative Stresslevel und die Zellzyklusveränderungen bearbeiten. Zur besseren Übertragbarkeit auf den Menschen sind zudem Färbungen humaner Lebergewebeschnitte geplant.

Das Feld der Karzinogenese-assoziierten Signalwege, Zielparameter des Zellzyklus, Replikationsstress, sowie der DNA-Reparatur setzt sich aus unzähligen Proteinen zusammen. In der vorliegenden Studie wurde lediglich eine kleine Auswahl der wichtigsten Marker und Proteine zur Abdeckung der unterschiedlichen Bereiche als Zielparameter gewählt um die statistische Aussagekraft zu erhalten. Die Untersuchung von PARP, ATM, ATR, weiterer Cycline, Apoptosemarker und vieler anderer Parameter bietet einen Mehrwert zur Einschätzung der genauen Karzinogenese-assoziierten Auswirkungen der *S. mansoni* Infektion und sollte für Folgestudien in Betracht gezogen werden.

Die vorliegende Studie untersuchte ausschließlich Signaltransduktion durch SEA in HepG2 Zellen. Karzinogenese-Versuche wurden bislang nicht durchgeführt. Die Analyse der regulierten Parameter für oxidativen Stress und DNA-Schädigung in einem HCC Modell mit *S. mansoni* infizierten Mäusen wird aktuell durchgeführt. Dies wird die Analyse der karzinogenen molekularbiologischen Prozesse ermöglichen, die für eine moderne gezielte individuelle Therapie von Bedeutung sein können. Ein breites Feld an neuen Chemotherapeutika mit individuellen Zielproteinen könnte die Therapie verbessern.

6 Zusammenfassung

Schistosomiasis zählt zu den häufigsten parasitären Erkrankungen der Welt mit schätzungsweise 250 Millionen Infizierten. Durch Migration, Globalisierung und die damit verbundene Mobilität breitet sich die früher Bilharziose genannte Infektionserkrankung auch in Europa aus. Sowohl medizinisch als auch sozioökonomisch ist die Infektion eine große Belastung für die Bevölkerung in den endemischen Gebieten. In zahlreichen Studien zeigen sich Korrelationen zwischen der Infektion mit *S. mansoni* und dem Hepatozellulären Karzinom sowie ein gesteigertes Karzinogenese Risiko bei Koinfektionen mit Hepatitis B und C. Die Aktivierung diverser Karzinogenese-assoziiertes Signalwege, sowie erhöhte Proliferations- und Apoptosemarker in Hamsterlebern deuten auf eine Beeinträchtigung der Zellzyklusregulation durch Schistosomiasis hin.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Zusammenhang des oxidativen Stresses und der Karzinogenese-assoziierten molekularbiologischen Mechanismen der *S. mansoni* Infektion aufzuklären. Dazu wurden *in vivo* und *in vitro* Versuche mit HepG2 Zellen und *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern durchgeführt. In den Zellkulturversuchen wurden die Auswirkungen von löslichen *S. mansoni* Ei-Antigenen auf die Zellzyklusveränderungen und DNA-Schädigung untersucht mit Augenmerk auf den oxidativen Stress als potentiellen Auslöser. Als anti-oxidatives Agens (*proof of principle*) wurde reduziertes Glutathion in Zellkultur eingesetzt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass SEA in HepG2 Zellen DNA-Schäden induziert. Durch Zugabe von GSH wurde oxidativer Stress reduziert und die SEA-induzierten DNA-Schäden minimiert. Vergleicht man den oxidativen Stress *in vivo* und *in vitro* mittels MDA Marker, waren die MDA Spiegel der SEA stimulierten HepG2 Zellen und des Lebergewebes aus *S. mansoni* infizierten Hamstern gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Die Inhibition von JNK sowie die Zugabe des Reduktionsäquivalents GSH führte in SEA stimulierten HepG2 Zellen zu normalen MDA Spiegeln. Die Aktivität der enzymatischen Antioxidans Katalase war in Lebern *S. mansoni* infizierter Hamster gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und korrelierte mit dem Infektionsgrad der Hamster. p-H2AX, ein Protein zur Aktivierung der DNA-Reparaturmechanismen, war in SEA stimulierten Zellen und in *S. mansoni* infizierten Hamsterlebern aktiviert. In Gewebeschnitten *S. mansoni* infizierter Hamster wurde simultan MCM2 und p-H2AX detektiert, wie auch Ki67 und p-H2AX. Die proliferierenden Hepatozyten mit DNA-Schädigung der Hamstergewebeschnitte deuten Replikationsstress in perigranulomatösen Zellen an. Unsere explorativen Versuche deuten auf eine

Normalisierung der durch SEA induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalwege, DNA-Replikationsmarker und Zellzykluskontrollen durch reduziertes Glutathion hin.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *S. mansoni* hepatischen oxidativen Stress *in vivo* und *in vitro* induziert. In Zellkulturversuchen wird in Abwesenheit von Zellen des Immunsystems durch SEA eine oxidative Schädigung und damit DNA-Schädigung verursacht. Während der *S. mansoni* Infektion wird folglich hepatischer oxidativer Stress neben den Immunzellen zusätzlich direkt durch SEA ausgelöst. GSH kann SEA-stimulierte Zellen vor DNA-Schäden, Zellzyklusveränderungen und der Aktivierung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege schützen.

Unsere Ergebnisse dienen der Aufklärung der Pathologie der *S. mansoni* Infektion und ihrer molekularbiologischen Prozesse. Diese Erkenntnisse können als Grundlage zum Verständnis des erhöhten Karzinogenese Risikos bei *S. mansoni* Infektion und zur Vorbereitung therapeutischer Ansätze dienen. In weiteren Studien sollte der Einsatz von Reduktionsäquivalenten als Karzinogenese-reduzierendes Agens weiter vertieft werden.

7 Summary

Schistosomiasis is one of the most common parasitic diseases worldwide with about 250 million infected people. Due to immigration, globalization and new gained mobility schistosomiasis has spread to Europe. The disease is a medical and socioeconomic burden in endemic areas. Several studies show a correlation between *S. mansoni* infection and hepatocellular carcinoma as well as a higher carcinogenic risk in case of hepatitis B or C coinfection. Activation of different carcinogenesis-associated pathways and increased proliferation and apoptosis markers in *S. mansoni*-infected hamster livers suggest an impairment of the cell cycle regulation by schistosomiasis.

This work aims to clarify the context of oxidative stress and carcinogenesis-associated molecular biological mechanisms of *S. mansoni* infection. *In vivo* and *in vitro* experiments were performed using HepG2 cells and *S. mansoni*-infected hamster livers. The impact of soluble *S. mansoni* egg antigens on changes of the cell cycle and DNA damage were examined especially regarding oxidative stress. Reduced glutathione was used as a potential therapeutical agent (proof of concept).

Our results show SEA induces DNA damage in HepG2 cells. GSH prevents oxidative stress and thus normalizes SEA-induced DNA damage. Comparing the oxidative stress levels, SEA-treated HepG2 cells and *S. mansoni*-infected hamsters show higher levels

of the oxidative stress marker MDA than the control groups. Either inhibiting JNK, or adding GSH, both leads to normal MDA levels in SEA-treated HepG2 cells. Catalase activity was increased in *S. mansoni*-infected hamster livers and correlated with their degree of infection. The DNA repair mechanism protein p-H2AX was activated in SEA-stimulated cells and *S. mansoni*-infected hamsters. Tissue sections of *S. mansoni*-infected hamster livers show simultaneous activation of MCM2 and p-H2AX as well as Ki67 and p-H2AX. These proliferating hepatocytes with DNA damage indicate replicative stress in perigranulomatous cells. Explorative experiments indicate a normalization of SEA-induced JNK/STAT3 pathway activation, DNA replication markers and cell cycle control mechanisms by simultaneous GSH-treatment

From the results of our experiments we conclude that *S. mansoni* induces hepatic oxidative stress *in vivo* and *in vitro*. Oxidative damage and consequently DNA damage is caused by SEA even during a lack of cells of the immune system in cell culture experiments. This implicates that the oxidative stress is not only caused by cells of the immune system, but additionally SEA itself causes hepatic oxidative stress. GSH is able to prevent SEA-treated cells from DNA damage, changes in the cell cycle and carcinogenesis-associated pathway activation.

These results serve to clarify *S. mansoni* infection and its molecular biological processes. Our findings might be used for deeper understanding of the elevated carcinogenic risk in *S. mansoni* infection and serve as an approach for therapeutic agents. Further studies should clarify the use of reducing agents with regard to carcinogenesis in Schistosomiasis.

8 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovines Serumalbumin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (Englisch cyclin-dependent kinase)
CER	Cytoplasmic Extraction Reagent
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA damage response
DEN	Diethylnitrosamine
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FZB	Forschungszentrum Borstel-Leibniz-Lungenzentrum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Reduziertes Glutathion
H2A.x	Histonvariante des Histon H2A
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	Horseradish Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz

IL-4	Interleukin 4
IPSE	IL-4 inducing principle of schistosome eggs
JLU	Justus-Liebig-Universität
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
M	Molare Masse
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdehyd
NER	Nuclear Extraction Reagent
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NAPDH Oxidase
$O_2^{\cdot-}$	Superoxidradikalanion
OH^{\cdot}	Hydroxylradikal
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCC	schistosomal colitis-associated colorectal cancer
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEA	Lösliche Ei-Antigene (Englisch <i>S. mansoni</i> soluble egg antigens)
<i>S. mansoni</i>	Schistosoma mansoni
SOD	Superoxid-Dismutase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBA(RS)	Thiobarbitursäure (reactive substances)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Tyramid Signal Amplifikation
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (Englisch World Health Organization)

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stand der Erkenntnisse zwischen <i>S. mansoni</i> Infektion und Karzinogenese zu Beginn der vorliegenden Arbeit.....	2
Abbildung 2: Schäden und Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies.....	5
Abbildung 3: Aktivierung der Kontrollmechanismen nach DNA-Doppelstrangbrüchen	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fragestellung der Dissertation.....	12
Abbildung 5: Erhöhte hepatische MDA Konzentration in Lebern der <i>S. mansoni</i> infizierten Hamster.....	36
Abbildung 6: Gesteigerte MDA Konzentration in SEA induzierten HepG2 Zellen wurde durch GSH normalisiert.....	37
Abbildung 7: Gesteigerte MDA Konzentration in SEA induzierten HepG2 Zellen wurde durch JNK2-Inhibition normalisiert.....	38
Abbildung 8: Korrelation der gesteigerten Katalase-Aktivität mit dem Infektionsgrad der Hamsterlebern	39
Abbildung 9: Verringerte hepatische Expression der Katalase in Lebern <i>S. mansoni</i> infizierter Hamster.....	41
Abbildung 10: GSH normalisierte die SEA-induzierte verringerte Expression der Katalase in HepG2 Zellen.....	42
Abbildung 11: GSH normalisierte den SEA-induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalweg c-Jun in HepG2 Zellen.....	44
Abbildung 12: Normalisierung des durch SEA-induzierten Karzinogenese-assoziierten Signalwegs STAT3 in Zellkultur durch GSH.....	45
Abbildung 13: Normalisierung der SEA-induzierten erhöhten Cyclin D1 Expression in Zellkultur durch GSH.....	46

Abbildung 14 : Gesteigerte hepatische p27 Expression in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamstern.	47
Abbildung 15: Gesteigerte hepatische p53 Expression in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamstern.	48
Abbildung 16: Erhöhte hepatische Expression der PCNA in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamsterlebern.	49
Abbildung 17: Normalisierung der SEA-induzierten gesteigerten PCNA Expression in HepG2 Zellen durch GSH.	50
Abbildung 18: Durch <i>S. mansoni</i> erhöhte hepatische Expression des Markers p44/42 in Hamstern.	52
Abbildung 19: GSH normalisierte den SEA-induzierten p44/42 Signalweg in Zellkultur.	53
Abbildung 20: Gesteigerte hepatische CHK1 Expression und Aktivierung in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamstern.	54
Abbildung 21: Proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schäden in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamstern. Gezeigt ist eine MCM2 und p-H2AX Doppelfärbung der Zellkerne.	56
Abbildung 22: Proliferierende Hepatozyten mit DNA-Schäden in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamstern. Gezeigt ist eine Ki67 und p-H2AX Doppelfärbung der Zellkerne.	57
Abbildung 23: Die hepatische Expression der Acetyl-CoA Synthetase 2 war in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamstern verringert.	58
Abbildung 24: Verminderte hepatische Expression der Acetyl-CoA Synthetase 2 in nukleären und zytoplasmatischen Extrakten der <i>S. mansoni</i> infizierten Hamster	59
Abbildung 25: Gesteigerte hepatische Aktivierung des Histons p-H2AX in <i>S. mansoni</i> infizierten Hamsterlebern.	60
Abbildung 26: Normalisierung der SEA-induzierten gesteigerten p-H2AX Expression in Zellkultur durch GSH.	61
Abbildung 27: GSH reduzierte die SEA-induzierte Zunahme der DNA-Schäden in Zellkultur	62
Abbildung 28: Übersicht der Ergebnisse	64
Abbildung 29: Plattenbelegung Zellkulturversuche HepG2 mit SEA und GSH stimuliert für Western Blot Analysen	93

Abbildung 30: Plattenbelegung für den MDA-Assay mit GSH und SEA behandelten HepG2 Zellen.....	93
Abbildung 31: Plattenbelegung für den MDA-Assay mit JNK2 Inhibitor (SP600125) und SEA behandelten HepG2 Zellen.....	93
Abbildung 32: Plattenbelegung für den Comet-Assay mit HepG2 Zellen	94

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	13
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien	15
Tabelle 4: Antikörper.....	18
Tabelle 5: Kommerzielle Kits	19
Tabelle 6: Zelllinie.....	19
Tabelle 7: Medien, Inhibitoren und Zusatzstoffe.....	20

11 Literaturverzeichnis / Quellenangaben

- Abd Ellah, Mahmoud R. 2013. "Involvement of Free Radicals in Parasitic Infestations." *Journal of Applied Animal Research* 41(1):69–76. doi: 10.1080/09712119.2012.739093.
- Abdallahi, OM, S. Hanna, M. De Reggi, and B. Gharib. 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.
- Aebi, H. 1984. "Catalase in Vitro." *Methods in Enzymology* 105:121–26. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Altavilla, D., P. Seminara, G. Squadrito, L. Minutoli, M. Passaniti, A. Bitto, G. Calapai, M. Calò, AP Caputi, and F. Squadrito. 2005. "Protective Effects of Antioxidant Raxofelast in Alcohol-Induced Liver Disease in Mice." *Pharmacology* 74(1):6–14. doi: 10.1159/000082939.
- Anthony, B. J., G. A. Ramm, and D. P. McManus. 2012. "Role of Resident Liver Cells in the Pathogenesis of Schistosomiasis." *Trends in Parasitology* 28(12):572–79. doi: 10.1016/j.pt.2012.09.005.
- Attwood, J. T., R. L. Yung, and B. C. Richardson. 2002. "DNA Methylation and the Regulation of Gene Transcription." *Cellular and Molecular Life Sciences* 59(2):241–57. doi: 10.1007/s00018-002-8420-z.
- Augustyniak, A., E. Waszkiewicz, and E. Skrzydlewska. 2005. "Preventive Action of

- Green Tea from Changes in the Liver Antioxidant Abilities of Different Aged Rats Intoxicated with Ethanol." *Nutrition* 21(9):925–32. doi: 10.1016/j.nut.2005.01.006.
- Ayala, A., M. F. Muñoz, and S. Argüelles. 2014. "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014. doi: 10.1155/2014/360438.
- Badawi, A. F., and M. S. Michael. 1999. "Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma in Egypt: The Role of Hepatitis-B Viral Infection and Schistosomiasis." *Anticancer Res.* 19(5C):4565–69.
- Barsoum, R. S., G. Esmat, and T. El-Baz. 2013. "Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review." *Journal of Advanced Research* 4(5):433–44. doi: 10.1016/j.jare.2013.01.005.
- Bartkova, Jirina, Zuzana Hořejší, Karen Koed, Alwin Krämer, Frederic Tort, Karsten Zieger, Per Guldberg, Maxwell Sehested, Jahn M. Nesland, Claudia Lukas, Torben Orntoft, Jiri Lukas, and Jiri Bartek. 2005. "DNA Damage Response as a Candidate Anti-Cancer Barrier in Early Human Tumorigenesis." *Nature* 434(7035):864–70. doi: 10.1038/nature03482.
- Bassing, C. H., K. F. Chua, J. Sekiguchi, H. Suh, S. R. Whitlow, J. C. Fleming, B. C. Monroe, D. N. Ciccone, C. Yan, K. Vlasakova, D. M. Livingston, D. O. Ferguson, R. Scully, and F. W. Alt. 2002. "Increased Ionizing Radiation Sensitivity and Genomic Instability in the Absence of Histone H2AX." *Proc Natl Acad Sci USA* 99(12):8173–78. doi: 10.1073/pnas.122228699.
- Blasina, A., J. Hallin, E. Chen, M. E. Arango, E. Kraynov, J. Register, S. Grant, S. Ninkovic, P. Chen, T. Nichols, P. O'Connor, and K. Anderes. 2008. "Breaching the DNA Damage Checkpoint via PF-00477736, a Novel Small-Molecule Inhibitor of Checkpoint Kinase 1." *Molecular Cancer Therapeutics* 7(8):2394–2404. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2391.
- Brooks, K., V. Oakes, B. Edwards, M. Ranall, P. Leo, S. Pavey, A. Pinder, H. Beamish, P. Mukhopadhyay, D. Lambie, and B. Gabrielli. 2013. "A Potent Chk1 Inhibitor Is Selectively Cytotoxic in Melanomas with High Levels of Replicative Stress." *Oncogene* 32(6):788–96. doi: 10.1038/onc.2012.72.
- Calvisi, D. F., S. Ladu, A. Gorden, M. Farina, E. A. Conner, J. S. Lee, V. M. Factor, and S. S. Thorgeirsson. 2006. "Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC." *Gastroenterology* 130(4):1117–28. doi: 10.1053/j.gastro.2006.01.006.
- Celeste, A., S. Petersen, P. J. Romanienko, O. Fernandez-Capetillo, H. T. Chen, O. A. Sedelnikova, B. Reina-San-Martin, V. Coppola, E. Meffre, M. J. Difilippantonio, C. Redon, D. R. Pilch, A. Olaru, M. Eckhaus, R. D. Camerini-Otero, L. Tessarollo, F. Livak, K. Manova, W. M. Bonner, M. C. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2002. "Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX." *Science* 296(5569):922–27. doi: 10.1126/science.1069398.
- Chandel, N. S., and D. A. Tuveson. 2014. "The Promise and Perils of Antioxidants for Cancer Patients." *New England Journal of Medicine* 371(2):177–78. doi: 10.1056/nejmcibr1405701.
- Chaudhuri, L., N. D. Vincelette, B. D. Koh, R. M. Naylor, K. S. Flatten, K. L. Peterson, A. McNally, I. Gojo, J. E. Karp, R. A. Mesa, L. O. Sproat, J. M. Bogenberger, S. H. Kaufmann, and R. Tibes. 2014. "CHK1 and WEE1 Inhibition Combine Synergistically to Enhance Therapeutic Efficacy in Acute Myeloid Leukemia Ex

- Vivo." *Haematologica* 99(4):688–96. doi: 10.3324/haematol.2013.093187.
- Colley, D. G., A. L. Bustinduy, W. E. Secor, and C. H. King. 2014. "Human Schistosomiasis." *Lancet* 383(9936):2253–64. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.
- Colley, D. G., and W. E. Secor. 2014. "Immunology of Human Schistosomiasis." *Parasite Immunology* 36(8):347–57. doi: 10.1111/pim.12087.
- Collins, A. R., V. L. Dobson, M. Dušinská, G. Kennedy, and R. Štětina. 1997. "The Comet Assay: What Can It Really Tell Us?" *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 375(2):183–93. doi: 10.1016/S0027-5107(97)00013-4.
- Collins, A. R., M. Dusinska, C. M. Gedik, and R. Stetina. 1996. "Oxidative Damage to DNA: Do We Have a Reliable Biomarker?" 104(3):465–69.
- Costain, A. H., A. S. MacDonald, and H. H. Smits. 2018. "Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses." *Frontiers in Immunology* 9(December):3042. doi: 10.3389/fimmu.2018.03042.
- Cunha, G. M., V. M. Silva, K. D. Bessa, M. A. Bitencourt, U. B. Macêdo, F. P. Freire-Neto, R. R. Martins, C. F. Assis, T. M. Lemos, M. G. Almeida, and A. C. Freire. 2012. "Levels of Oxidative Stress Markers: Correlation with Hepatic Function and Worm Burden Patients with Schistosomiasis." *Acta Parasitologica* 57(2):160–66. doi: 10.2478/s11686-012-0026-5.
- Delves, P. J., and I. M. Roitt. 2000. "Advances in Immunology: The Immune System." *N Engl J Med* 343(1):37–49. doi: 10.1056/NEJM200007063430107.
- Dickey, J. S., C. E. Redon, A. J. Nakamura, B. J. Baird, O. A. Sedelnikova, and W. M. Bonner. 2009. "H2AX: Functional Roles and Potential Applications." *Chromosoma* 118(6):683–92. doi: 10.1007/s00412-009-0234-4.
- Dobbelstein, M., and C. S. Sørensen. 2015. "Exploiting Replicative Stress to Treat Cancer." *Nature Reviews Drug Discovery* 14(6):405–23. doi: 10.1038/nrd4553.
- Downey, M., and D. Durocher. 2006. "GammaH2AX as a Checkpoint Maintenance Signal." *Cell Cycle* 5(13):1376–81.
- Drudge-Coates, L., and B. Turner. 2013. "Schistosomiasis-an Endemic Parasitic Waterborne Disease." *Br J Nurs* 22(9):S10.
- Dryden, G. W., I. Deaciuc, G. Arteel, and C. J. McClain. 2005. "Clinical Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapy." *Current Gastroenterology Reports* 7(4):308–16. doi: 10.1007/s11894-005-0024-y.
- Eisenbrand, G., J. Schuhmacher, and P. Gölzer. 1995. "The Influence of Glutathione and Detoxifying Enzymes on DNA Damage Induced by 2-Alkenals in Primary Rat Hepatocytes and Human Lymphoblastoid Cells." *Chemical Research in Toxicology* 8(1):40–46. doi: 10.1021/tx00043a005.
- El-Serag, H. B., and K. L. Rudolph. 2007. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis." *Gastroenterology* 132(7):2557–76. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- El-Tonsy, M. M., H. M. Hussein, Tel-S. Helal, R. A. Tawfik, K. M. Koriem, and H. M. Hussein. 2013. "Schistosoma Mansoni Infection: Is It a Risk Factor for Development of Hepatocellular Carcinoma?" *Acta Tropica* 128(3):542–47. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.07.024.

- Elsammak, M. Y., R. M. Al-Sharkaweey, M. S. Ragab, G. A. Amin, and M. H. Kandil. 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.
- Eppinger, Hans. 1937. *Die Leberkrankheiten*.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive, and K. L. O'Neill. 1995. "The Comet Assay: A Comprehensive Review." *Mutat Res.* 339(1):37–59.
- La Flamme, A. C., E. A. Patton, B. Bauman, and E. J. Pearce. 2001. "IL-4 Plays a Crucial Role in Regulating Oxidative Damage in the Liver during Schistosomiasis." *The Journal of Immunology* 166(3):1903–11. doi: 10.4049/jimmunol.166.3.1903.
- Fong, P. C., D. S. Boss, T. A. Yap, A. Tutt, P. Wu, M. Mergui-Roelvink, P. Mortimer, H. Swaisland, Lau, M. J. O'Connor, A. Ashworth, J. Carmichael, S. B. Kaye, J. H. Schellens, and J. S. de Bono. 2009. "Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers." *New England Journal of Medicine* 361(2):123–34. doi: 10.1056/nejmoa0900212.
- Gaillard, H., T. García-Muse, and A. Aguilera. 2015. "Replication Stress and Cancer." *Nature Reviews Cancer* 15(5):276–89. doi: 10.1038/nrc3916.
- Gasparotto, J., A. Kunzler, M. R. Senger, C. D. Souza, S. G. Simone, R. C. Bortolin, N. Somensi, F. Dal-Pizzol, J. C. Moreira, A. L. Abreu-Silva, K. D. Calabrese, F. P. Jr Silva, and D. P. Gelain. 2017. "N-Acetyl-Cysteine Inhibits Liver Oxidative Stress Markers in BALB/c Mice Infected with *Leishmania Amazonensis*." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 112(2):146–54. doi: 10.1590/0074-02760160403.
- Gharib, B., O. M. Abdallahi, H. Desein, and M. De Reggi. 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.
- Glantzounis, G. K., E. C. Tsimoyiannis, A. M. Kappas, and D. A. Galaris. 2005. "Uric Acid and Oxidative Stress." *Current Pharmaceutical Design* 11(32):4145–51. doi: 10.2174/138161205774913255.
- Gomaa, A. I., S. A. Khan, M. B. Toledano, I. Waked, and S. D. Taylor-Robinson. 2008. "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Risk Factors and Pathogenesis." *World Journal of Gastroenterology* 14(27):4300–4308. doi: 10.3748/wjg.14.4300.
- Gryseels, B., K. Polman, J. Clerinx, and L. Kestens. 2006. "Human Schistosomiasis." *Lancet* 368(9541):1106–18. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69440-3.
- Gutteridge, J. M. C., and B. Halliwell. 1990. "The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems." *Trends in Biochemical Sciences* 15(4):129–35.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press.
- Halliwell, B. 2015. "Free Radicals and Other Reactive Species in Disease." *John Wiley and Sons* 1–9. doi: 10.1002/9780470015902.a0002269.pub3.
- Hams, Emily, Gabriella Aviello, and Padraic G. Fallon. 2013. "The *Schistosoma* Granuloma: Friend or Foe?" *Frontiers in Immunology* 4(APR):1–9. doi: 10.3389/fimmu.2013.00089.
- Harris, I. S., and G. M. DeNicola. 2020. "The Complex Interplay between Antioxidants

- and ROS in Cancer." *Trends in Cell Biology* 30(6):440–51.
- He, G., G. Y. Yu, V. Temkin, H. Ogata, C. Kuntzen, T. Sakurai, W. Sieghart, M. Peck-Radosavljevic, H. L. Leffert, and M. Karin. 2010. "Hepatocyte IKKbeta/NF-KappaB Inhibits Tumor Promotion and Progression by Preventing Oxidative Stress-Driven STAT3 Activation." *Cancer Cell* 17(3):286–97. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.048.
- Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi. 2000. "Roles of STAT3 in Mediating the Cell Growth, Differentiation and Survival Signals Relayed through the IL-6 Family of Cytokine Receptors." *Oncogene* 19(21):2548–56. doi: 10.1038/sj.onc.1203551.
- Honda, Y., T. Kessoku, Y. Sumida, T. Kobayashi, T. Kato, Y. Ogawa, W. Tomeno, K. Imajo, K. Fujita, M. Yoneda, K. Kataoka, M. Taguri, T. Yamanaka, Y. Seko, S. Tanaka, S. Saito, M. Ono, S. Oeda, Y. Eguchi, W. Aoi, K. Sato, Y. Itoh, and A. Nakajima. 2017. "Efficacy of Glutathione for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Open-Label, Single-Arm, Multicenter, Pilot Study." *BMC Gastroenterology* 17. doi: 10.1186/s12876-017-0652-3.
- Inoguchi, T., N. Sonoda, and Y. Maeda. 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.
- Kaur, J., S. Shalini, and M. P. Bansal. 2010. "Influence of Vitamin E on Alcohol-Induced Changes in Antioxidant Defenses in Mice Liver." *Toxicol Mech Methods* 20(2):82–89. doi: 10.3109/15376510903559950.
- Kelly, K. A., C. M. Havrilla, T. C. Brady, K. H. Abramo, and E. D. Levin. 1998. "Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems." *Environmental Health Perspectives* 106(7):375–84.
- Kuo, L. J., and L. X. Yang. 2008. "Gamma-H2AX - a Novel Biomarker for DNA Double-Strand Breaks." *In Vivo* 22(3):305–9.
- De Laval, F., H. Savini, E. Biance-Valero, and F. Simon. 2014. "Human Schistosomiasis: An Emerging Threat for Europe." *Lancet* 384(9948):1094–95. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61669-X.
- Li, G., Y. Ye, J. Kang, X. Yao, Y. Zhang, W. Jiang, M. Gao, Y. Dai, Y. Xin, Q. Wang, Z. Yin, and L. Luo. 2012. "L-Theanine Prevents Alcoholic Liver Injury through Enhancing the Antioxidant Capability of Hepatocytes." *Food and Chemical Toxicology* 50(2):363–72. doi: 10.1016/j.fct.2011.10.036.
- Li, S., H. Y. Tan, N. Wang, Z. J. Zhang, L. Lao, C. W. Wong, and Y. Feng. 2015. "The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 16(11):26087–124. doi: 10.3390/ijms161125942.
- Liu, T., H. Ma, W. Shi, J. Duan, Y. Wang, C. Zhang, C. Li, J. Lin, S. Li, J. Lv, and L. Lin. 2017. "Inhibition of STAT3 Signaling Pathway by Ursolic Acid Suppresses Growth of Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Oncology* 51(2):555–62. doi: 10.3892/ijo.2017.4035.
- López, V. R., G. S. Razzeto, M. S. Giménez, and N. L. Escudero. 2011. "Antioxidant Properties of Amaranthus Hypochondriacus Seeds and Their Effect on the Liver of Alcohol-Treated Rats." *Plant Foods Hum Nutr.* 66(2):157–62. doi: 10.1007/s11130-011-0218-4.
- Lord, C. J., and A. Ashworth. 2012. "The DNA Damage Response and Cancer Therapy." *Nature* 481(7381):287–94. doi: 10.1038/nature10760.

- Löscher, T., and G. D. Burchard. 2010. *Tropenmedizin in Klinik Und Praxis*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag.
- Luangmonkong, T., S. Suriguga, H. A. M. Mutsaers, G. M. M. Groothuis, P. Olinga, and M. Boersema. 2018. "Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 175:71–102. doi: 10.1007/112_2018_10.
- Ludwig, J. A., and J. N. Weinstein. 2005. "Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection." *Nature Reviews Cancer* 5(11):845–56. doi: 10.1038/nrc1739.
- Lüllmann-Rauch, R. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage. Thieme.
- Macheret, M., and T. D. Halazonetis. 2015. "DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 10:425–48. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040424.
- Madbouly, K. M., A. J. Senagore, A. Mukerjee, A. M. Hussien, M. A. Shehata, P. Navine, C. P. Delaney, and V. W. Fazio. 2007. "Colorectal Cancer in a Population with Endemic Schistosoma Mansoni: Is This an at-Risk Population?" *International Journal of Colorectal Disease* 22(2):175–81. doi: 10.1007/s00384-006-0144-3.
- Markowitz, S. D., and M. M. Bertagnolli. 2009. "Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer." *The New England Journal of Medicine* 361(25):2449–60.
- Marra, M., I. M. Sordelli, A. Lombardi, M. Lamberti, L. Tarantino, A. Giudice, P. Stiuso, A. Abbruzzese, R. Sperlongano, M. Accardo, M. Agresti, M. Caraglia, and P. Sperlongano. 2011. "Molecular Targets and Oxidative Stress Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma: An Overview." *Journal of Translational Medicine* 9. doi: 10.1186/1479-5876-9-171.
- Matés, J. M., C. Pérez-Gòmez, and I. Núñez de Castro. 1999. "Antioxidant Enzymes and Human Diseases." *Clinical Biochemistry* 32(8):595–603.
- Mathieson, W., and R. A. Wilson. 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.
- McManus, D. P., D. W. Dunne, M. Sacko, J. Utzinger, B. J. Vennervald, and X. N. Zhou. 2018. "Schistosomiasis." *Nature Reviews Disease Primers* 4(1). doi: 10.1038/s41572-018-0013-8.
- Miller, J. L., and P. A. Grant. 2013. "The Role of DNA Methylation and Histone Modifications in Transcriptional Regulation in Humans." Pp. 289–317 in *Subcell Biochemistry*.
- Møller, P. 2018. "The Comet Assay: Ready for 30 More Years." *Mutagenesis* 33(1):1–7. doi: 10.1093/mutage/gex046.
- Müller, S. 2004. "Redox and Antioxidant Systems of the Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Molecular Microbiology* 53(5):1291–1305. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04257.x.
- Murga, M., S. Campaner, A. J. Lopez-Contreras, L. I. Toledo, R. Soria, M. F. Montaña, L. Artista, T. Schleker, C. Guerra, E. Garcia, M. Barbacid, M. Hidalgo, B. Amati, and O. Fernandez-Capetillo. 2011. "Exploiting Oncogene-Induced Replicative Stress for the Selective Killing of Myc-Driven Tumors." *Nat Struct Mol Biol*.

18(12):1331–35.

- Niedrig, M., B. Reinhardt, G. D. Burchard, H. Schmitz, E. Tannich, K. Tintelnot, G. Laude, K. Alpers, K. Stark, and J. Mehlhose. 2006. *Steckbriefe Seltener Und Importierter Infektionskrankheiten*.
- Oleaga, A., O. Rey, B. Polack, S. Grech-Angelini, Y. Quilichini, R. Pérez-Sánchez, P. Boireau, S. Mulero, A. Brunet, A. Rogon, Is Vallée, J. Kincaid-Smith, J. F. Allienne, and J. Boissier. 2019. “Epidemiological Surveillance of Schistosomiasis Outbreak in Corsica (France): Are Animal Reservoir Hosts Implicated in Local Transmission?” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(6). doi: 10.1371/journal.pntd.0007543.
- de Oliveira, R. B., M. R. Senger, L. M. Vasques, J. Gasparotto, J. P. dos Santos, M. A. Pasquali, J. C. Moreira, F. P. Jr Silva, and D. P. Gelain. 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):371–79.
- Ozden, M., H. Maral, D. Akaydin, P. Cetmalp, and B. Kalender. 2002. “Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity, Plasma Malondialdehyde and Erythrocyte Glutathione Levels in Hemodialysis and CAPD Patients.” *Clinical Biochemistry* 35(4):269–73. doi: 10.1016/S0009-9120(02)00307-7.
- Palumbo, E. 2007. “Association between Schistosomiasis and Cancer: A Review.” *Infectious Diseases in Clinical Practice* 15(3):145–48. doi: 10.1097/01.idc.0000269904.90155.ce.
- Pascal, M., O. M. Abdallahi, N. M. Elwali, Mergni, M. A. Qurashi, M. Magzoub, M. de Reggi, and B. Gharib. 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.
- Pérez-Fuentes, R., A. López-Colombo, G. Ordóñez-Toquero, I. Gomez-Albino, J. Ramos, E. Torres-Rasgado, H. Salgado-Rosas, M. Romero-Díaz, P. Pulido-Pérez, and M. C. Sánchez-Guillén. 2007. “Correlation of the Serum Concentrations of Tumour Necrosis Factor and Nitric Oxide with Disease Severity in Chronic Chagas Disease (American Trypanosomiasis).” *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101(2):123–32. doi: 10.1179/136485907X154593.
- Pisarski, K. 2019. “The Global Burden of Disease of Zoonotic Parasitic Diseases: Top 5 Contenders for Priority Consideration.” *Tropical Medicine and Infectious Disease* 4(1). doi: 10.3390/tropicalmed4010044.
- Qian, L., W. Wang, Y. Zhou, and J. Ma. 2017. “Effects of Reduced Glutathione Therapy on Chronic Hepatitis B.” *Central European Journal of Immunology* 42(1):97–100. doi: 10.5114/ceji.2016.65894.
- Ren, L., L. Chen, W. Wu, L. Garribba, H. Tian, Z. Liu, I. Vogel, C. Li, I. D. Hickson, and Y. Liu. 2017. “Potential Biomarkers of DNA Replication Stress in Cancer.” *Oncotarget* 8(23):36996–8.
- Roderfeld, M., S. Padem, J. Lichtenberger, T. Quack, R. Weiskirchen, T. Longerich, G. Schramm, Y. Churin, K. Irungbam, A. Tschuschner, A. Windhorst, C. G. Grevelding, and E. Roeb. 2020. “Schistosoma Mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes.” *Hepatology* 72(2):626–41. doi: 10.1002/hep.30192.

- Ross, A. G., P. B. Bartley, A. C. Sleight, G. R. Olds, Y. Li, G. M. Williams, and D. P. McManus. 2002. "Schistosomiasis." *New England Journal of Medicine* 346(16):1212–20.
- Ross, A. G., D. Vickers, G. R. Olds, S. M. Shah, and D. P. McManus. 2007. "Katayama Syndrome." *Lancet Infectious Diseases* 7(3):218–24. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70053-1.
- von der Saal, K. 2020. *Biochemie*. Springer Spektrum.
- Sacolo, H., M. Chimbari, and C. Kalinda. 2018. "Knowledge, Attitudes and Practices on Schistosomiasis in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review." *BMC Infectious Diseases* 18(1). doi: 10.1186/s12879-017-2923-6.
- Sanyal, A. J., P. S. Mofrad, M. J. Contos, C. Sargeant, V. A. Luketic, R. K. Sterling, R. T. Stravitz, M. L. Shiffman, J. Clore, and A. S. Mills. 2004. "A Pilot Study of Vitamin E versus Vitamin E and Pioglitazone for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis." *Clinical Gastroenterology Hepatology* 2(12):1107–15.
- Sarin, K., A. Kumar, A. Prakash, and A. Sharma. 1993. "Oxidative Stress and Antioxidant Defence Mechanism in Plasmodium Vivax Malaria before and after Chloroquine Treatment." *Indian J Malariol.* 30(3):127–33.
- Sies, H., C. Berndt, and D. P. Jones. 2017. "Oxidative Stress." *Annual Review of Biochemistry* 86:715–48.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider. 1988. "A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells." *Experimental Cell Research* 175(1):184–91. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Smith, N. C., and C. Bryant. 1989. "Free Radical Generation during Primary Infections with Nippostrongylus Brasiliensis." *Parasite Immunology* 11(2):147–60. doi: 10.1111/j.1365-3024.1989.tb00655.x.
- Souza, M. R., C. F. Toledo, and D. R. Borges. 2000. "Thrombocytopenia as a Predictor of Portal Hypertension in Schistosomiasis." *Digestive Diseases and Sciences* 45(10):1964–70. doi: 10.1023/A:1005535808464.
- Stumbo, A. D., C. P. Goater, and A. Hontela. 2012. "Parasite-Induced Oxidative Stress in Liver Tissue of Fathead Minnows Exposed to Trematode Cercariae." *Parasitology* 139(12):1666–71. doi: 10.1017/S0031182012001023.
- Svinka, J., W. Mikulits, and R. Eferl. 2014. "STAT3 in Hepatocellular Carcinoma: New Perspectives." *Hepatic Oncology* 1(1):107–20. doi: 10.2217/hep.13.7.
- Taylor, E. M., and H. D. Lindsay. 2016. "DNA Replication Stress and Cancer: Cause or Cure?" *Future Oncology* 12(2):221–37. doi: 10.2217/fon.15.292.
- Tchuem Tchuenté, L. A., D. Rollinson, J. R. Stothard, and D. Molyneux. 2017. "Moving from Control to Elimination of Schistosomiasis in Sub-Saharan Africa: Time to Change and Adapt Strategies." *Infectious Diseases of Poverty* 6(1). doi: 10.1186/s40249-017-0256-8.
- Thun, M. J., M. S. Linet, J. R. Cerhan, and C. A. Haiman. 2017. *Cancer Epidemiology and Prevention*. Oxford University Press.
- Toda, K. S., L. Kikuchi, A. L. Chagas, R. Y. Tanigawa, D. C. Paranaguá-Vezozzo, T. Pfiffer, Mde S. Rocha, V. A. Alves, and F. J. Carrilho. 2015. "Hepatocellular Carcinoma Related to Schistosoma Mansoni Infection: Case Series and Literature Review." *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 3(4):260–64. doi:

10.14218/jcth.2015.00027.

- van Tong, H., P. J. Brindley, C. G. Meyer, and T. P. Velavan. 2017. "Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy." *EBioMedicine* 15:12–23. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.11.034.
- Trierweiler, C., B. Hockenjos, K. Zatloukal, R. Thimme, H. E. Blum, E. F. Wagner, and P. Hasselblatt. 2016. "The Transcription Factor C-JUN/AP-1 Promotes HBV-Related Liver Tumorigenesis in Mice." *Cell Death and Differentiation* 23(4):576–82. doi: 10.1038/cdd.2015.121.
- Tsikis, D. 2017. "Assessment of Lipid Peroxidation by Measuring Malondialdehyde (MDA) and Relatives in Biological Samples: Analytical and Biological Challenges." *Analytical Biochemistry* 524:13–30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
- Turgeon, M. O., N. J. S. Perry, and G. Poulgiannis. 2018. "DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism." *Frontiers in Oncology* 8(15). doi: 10.3389/fonc.2018.00015.
- Turner, H. C., M. D. French, A. Montresor, C. H. King, D. Rollinson, and J. Toor. 2020. "Economic Evaluations of Human Schistosomiasis Interventions: A Systematic Review and Identification of Associated Research Needs." *Wellcome Open Research* 5(45).
- Vennervald, B. J., and K. Polman. 2009. "Helminths and Malignancy." *Parasite Immunology* 31(11):686–96. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01163.x.
- Wahib, A. A., A. A. Masoud, A. A. Halem, A. N. Haseeb, A. R. Hassan, M. A. Darwish, M. Hegazi, and K. F. Abdallah. 1998. "Cell Mediated Immune Response in Chronic Liver Diseases: Schistosomal, Viral and Neoplastic." *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 28(3):929–39.
- Wang, J., and G. Tai. 2016. "Role of C-Jun N-Terminal Kinase in Hepatocellular Carcinoma Development." *Targeted Oncology* 11(6):723–38.
- Williams, R. 2006. "Global Challenges in Liver Disease." *Hepatology* 44(3):521–26. doi: 10.1002/hep.21347.
- World Health Organization. 2016. *GHE2016_Deaths_Global_2000_2016*.
- Wynn, T. A., R. W. Thompson, A. W. Cheever, and M. M. Mentink-Kane. 2004. "Immunopathogenesis of Schistosomiasis." *Immunological Reviews* 201(1):156–67.
- Yang, J., Z. P. Xu, Y. Huang, H. E. Hamrick, P. J. Duerksen-Hughes, and Y. N. Yu. 2004. "ATM and ATR: Sensing DNA Damage." *World Journal of Gastroenterology* 10(2):155–60.

12 Anhang

	1	2	3	4	5	6
A	HepG2 DMEM 2 µl PBS	HepG2 DMEM 2 µl SEA	HepG2 DMEM + GSH 2 µl PBS	HepG2 DMEM + GSH 2 µl SEA		
B						
C						
D						

Abbildung 29: Plattenbelegung Zellkulturversuche HepG2 mit SEA und GSH stimuliert für Western Blot Analysen

	1	2	3	4	5	6
A	HepG2 DMEM 2 µl PBS	HepG2 DMEM 2 µl SEA	HepG2 DMEM + GSH 2 µl PBS	HepG2 DMEM + GSH 2 µl SEA		
B	HepG2 DMEM 2 µl PBS	HepG2 DMEM 2 µl SEA	HepG2 DMEM + GSH 2 µl PBS	HepG2 DMEM + GSH 2 µl SEA		
C	HepG2 DMEM 2 µl PBS	HepG2 DMEM 2 µl SEA	HepG2 DMEM + GSH 2 µl PBS	HepG2 DMEM + GSH 2 µl SEA		
D						

Abbildung 30: Plattenbelegung für den MDA-Assay mit GSH und SEA behandelten HepG2 Zellen

	1	2	3	4	5	6
A	HepG2 DMEM + DMSO 2 µl PBS	HepG2 DMEM + DMSO 2 µl PBS	HepG2 DMEM + DMSO 2 µl PBS			
B	HepG2 DMEM + JNK-Inh. 2 µl PBS	HepG2 DMEM + JNK-Inh. 2 µl PBS	HepG2 DMEM + JNK-Inh. 2 µl PBS			
C	HepG2 DMEM + DMSO 2 µl SEA	HepG2 DMEM + DMSO 2 µl SEA	HepG2 DMEM + DMSO 2 µl SEA			
D	HepG2 DMEM + JNK-Inh. 2 µl SEA	HepG2 DMEM + JNK-Inh. 2 µl SEA	HepG2 DMEM + JNK-Inh. 2 µl SEA			

Abbildung 31: Plattenbelegung für den MDA-Assay mit JNK2 Inhibitor (SP600125) und SEA behandelten HepG2 Zellen

	1	2	3	4
A	HepG2 DMEM Tag 1: 10 µl PBS Tag 2: 10 µl PBS	HepG2 DMEM Tag 1: 10 µl SEA Tag 2: 10 µl SEA	HepG2 DMEM + GSH Tag 1: 10 µl SEA Tag 2: 10 µl SEA	HepG2 DMEM + GSH Tag 1: 10 µl PBS Tag 2: 10 µl PBS
B	HepG2 DMEM Tag 3: H2O2			
C				

Abbildung 32: Plattenbelegung für den Comet-Assay mit HepG2 Zellen

13 Publikationsverzeichnis

Buß N, von Bülow V, Hehr L, Gindner S, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E.

Schistosoma mansoni dereguliert den Zellzyklus von Hepatozyten im Hamster- und in Zellkulturversuchen. Z Gastroenterol 2020 58(08): e176. Abstract, Vortrag DGVS 2020. DOI: 10.1055/s-0040-1716204

Gindner SM, von Bülow V, Hehr L, **Buß N**, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E.

Schistosoma mansoni-Eier regulieren den hepatischen Kohlenhydrat-Stoffwechsel des Wirts. Z Gastroenterol 2020 58(08): e176. Abstract, Vortrag DGVS 2020. DOI: 10.1055/s-0040-1716203

Buß N, von Bülow V, Hehr L, Gindner S, Baier A, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E.

Schistosoma mansoni infection induces DNA damage in hamster liver. Z Gastroenterol 2021 59(01): e8. Abstract, Vortrag GASL 2021. DOI: 10.1055/s-0040-1721962

Gindner S, von Bülow V, Hehr L, **Buß N**, Baier A, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E.

Parasite eggs induce metabolic stress in *Schistosoma mansoni*-infected hamster livers. Z Gastroenterol 2021 59(01): e8. Abstract, Vortrag GASL 2021. DOI: 10.1055/s-0040-1721963

Hehr L, von Bülow V, Gindner S, **Buß N**, Baier A, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Gerbig S, Kadesch P, Peter Ventura A, Wiedemann KR, Spengler B, Roderfeld M, Roeb E.

Schistosoma mansoni eggs modulate the host's hepatic lipid metabolism. Z Gastroenterol 2021 59(01): e11. Abstract, Vortrag GASL 2021. DOI: 10.1055/s-0040-1721971

von Bülow V, Baier A, Hehr L, Gindner S, **Buss N**, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E.

Sex-specific differences of hepatic metabolism in *Schistosoma mansoni*. Z Gastroenterol 2021 59(01): e13. Abstract, Vortrag GASL 2021. DOI: 10.1055/s-0040-1721976

von Buelow V, Hehr L, Baier A, **Buss N**, Gindner S, Wirth V, Russ L, Wrobel S, Tabatabai K, Quack T, Häberlein S, Kadesch P, Gerbig S, Wiedemann K, Spengler B, Mehl A, Morlock G, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Tschammer J, Köhler K, Grevelding CG, Falcone F, Roeb E, Roderfeld M.

S. mansoni ova-induced metabolic reprogramming facilitates replenishment of parasitic energy reserves in hamster and human hepatocytes.

Paper in Vorbereitung für die Einreichung.

14 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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.“

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst bedanke ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Elke Roeb für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die ausgezeichnete Betreuung und die wertvollen Anregungen.

Darüber hinaus richtet sich ein großes Dankeschön an PD Dr. Martin Roderfeld, den Laborleiter der Gastroenterologischen Arbeitsgruppe Prof. Dr. Roeb, und an das gesamte Laborteam mit Annette Tschuschner, Heike Müller, Dr. Verena von Bülow, Sarah Gindner, Anne Baier und Laura Hehr. Die gute Einweisung, die Anregungen zu Experimenten, die unermüdliche Geduld und das stets offene Ohr leiteten mich bis zur Fertigstellung der Arbeit so wundervoll durch die Laborzeit. Vielen Dank!

Weiterhin möchte ich mich bei meinem statistischen Berater Jonas Tschammer aus dem Institut der Medizinischen Informatik bedanken für die fachkundige Beratung und die hilfreichen Anregungen zur statistischen Aufarbeitung der Daten.

Ich bedanke mich beim JLU Trainee Programm des Fachbereichs Medizin für die finanzielle Unterstützung und die inspirierenden Vorträge der Dozenten und Mitstipendiaten.

Danke an die Mittwoch-Mädelsrunde: Ihr seid für mich wahre Herzensmenschen. ♥

Ein riesiges Dankeschön richtet sich an meine Eltern, die mich all die Jahre über das gesamte Studium und die Zeit der Entstehung der Dissertation liebevoll unterstützt und motiviert haben. Danke, für euren Glauben an meine Fähigkeiten. Danke möchte ich auch meinen Geschwistern sagen: Egal wie weit wir auseinander sind, ich kann immer auf euch zählen und bin euch für die Unterstützung und den stetigen Rat wahnsinnig dankbar.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Großeltern bedanken. Ich bin froh, dass ihr die vielen glücklichen Momente mit mir teilt, an meiner Seite steht und ich bei euch stets Liebe und Unterstützung erfahre.

Being a family means you are part of something very wonderful.
It means you will love and be loved for the rest of your life.

Zuletzt danke ich Jonas, für deine wahnsinnige Geduld, deine Liebe und deine bedingungslose Unterstützung. Ich freue mich riesig auf die großen und kleinen Abenteuer, die wir zusammen noch erleben werden. Vielen Dank für alles!