

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten und Sektion Nephrologie

(Direktor: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger)

„Charakterisierung der murinen Immunantwort auf die eingeschlechtliche *Schistosoma mansoni* Infektion“

Kumulative Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Dipl.-Biol. Nicole Koslowski, geb. am 14. April 1987 in Stralsund

wohnhaft in Rostock

Rostock, den 18. Juli 2018

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten und Sektion Nephrologie, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland
2. Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, Arbeitsgruppe Klinische Immunologie, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock, Deutschland
3. Prof. Dr. med. univ. Robert Krause, Klinische Abteilung für Infektiologie, Universitätsklinik für Innere Medizin, Universitätsmedizin Graz, Österreich

Datum der Einreichung: 18. Juli 2018

Datum der Verteidigung: 13. März 2019

*„Die schönste Harmonie entsteht durch Zusammenbringen der
Gegengensätze.“*

Heraklit

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	II
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Die Schistosomiasis - Infektion, Therapie und Prävention	- 1 -
1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund - Die eingeschlechtliche <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion ..	- 3 -
2. Fragestellung	- 6 -
3. Methoden.....	- 8 -
3.1 Fibrose, makroskopisches Bewertungssystem und Biosensor	- 8 -
3.2 Zweistufiges <i>Schistosoma mansoni</i> Infektionsmodell.....	- 9 -
3.3 „Air Pouch“-Modell	- 10 -
4. Ergebnisse	- 12 -
4.1 Ein Fibrose-Scoring-System und ein <i>ex vivo</i> Hepatozyten-basierter Biosensor zur Beurteilung der hepatischen Fibrose im <i>Schistosoma mansoni</i> Mausmodell.....	- 12 -
4.2 Weibliche <i>Schistosoma mansoni</i> reduzieren die hepatische Fibrose im <i>Schistosoma mansoni</i> Mausmodell	- 12 -
4.3 Parasitenabwehr oder Immunsuppression: Männliche und/oder weibliche <i>Schistosoma mansoni</i> beeinflussen das Immunsystem auf unterschiedliche Art und Weise zum Schutz gegen eindringende Zerkarien	- 13 -
5. Diskussion	- 15 -
6. Zusammenfassung.....	- 21 -
7. Literaturverzeichnis	- 22 -
Anhang.....	IV
Teil-I Publikation:	V
<i>Biosensor for Hepatocellular Injury Corresponds to Experimental</i>	V
<i>Scoring of Hepatosplenic Schistosomiasis in Mice</i>	V
Teil-II Publikation:	XIII
<i>Single-sex infection with female Schistosoma mansoni cercariae</i>	XIII
<i>mitigates hepatic fibrosis after secondary infection</i>	XIII
Teil-III Publikation:	XXVIII
<i>Host Defense Versus Immunosuppression: Unisexual Infection With Male and Female Schistosoma mansoni Differentially Impacts the Immune Response Against Invading Cercariae</i>	XXVIII
Danksagung und Förderung	XXXIX
Selbstständigkeitserklärung	XLI
Beruflicher Werdegang und Publikationen	XLII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bewertungssystem und Biosensor	8
Abbildung 2:	Zweistufiges <i>Schistosoma mansoni</i> Infektionsmodell	9
Abbildung 3:	„Air Pouch“-Modell	11

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Arg1	Arginase 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
Foxp3	Fork head protein 3
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-10	Interleukin 10
IL-12p70	Interleukin 12p70
IL-13	Interleukin 13
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Retnla	Resistin like alpha

Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis

<i>S. guineensis</i>	<i>Schistosoma guineensis</i>
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SR	Sirius-Red
Th1/Th2	T-Helferzellen vom Subtyp 1/2
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tregs	Regulatorische T-Zellen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Die Schistosomiasis - Infektion, Therapie und Prävention

Die Schistosomiasis, eine Infektionskrankheit verursacht durch Trematoden der Gattung *Schistosoma spp.*, ist vor allem in den Tropen und Subtropen verbreitet. Es sind derzeit sechs humanpathogene Schistosomenarten bekannt. Eine Infektion mit *S. haematobium* führt zur urogenitalen Schistosomiasis. *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* und *S. guineensis* sind die Erreger der intestinalen Schistosomiasis (World Health Organization 2017).

In Sub-Sahara Afrika sterben jährlich mehr als 200.000 Menschen an den Folgen einer Schistosomiasis. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erhalten jährlich mehr als 258 Millionen Menschen eine Therapie gegen die adulten Würmer (World Health Organization 2015). Seit vielen Jahren verfolgt die Firma Merck zusammen mit der WHO eine Strategie zur Eindämmung der Erkrankung, indem sie jedes Jahr Massenbehandlungen bei Schulkindern mit dem Anthelminthikum Praziquantel in Endemiegebieten durchführt (Colley 2014). Dieses Medikament wirkt ausschließlich gegen die adulten Würmer. Es hat keine Wirkung auf die heranreifenden Würmer, schützt nicht vor Neuinfektion und hat keinen Einfluss auf die durch die Parasiteneier verursachten Schäden in Leber, Darm oder der Blase/Genitaltrakt (King 2009; Matthews 2011). Da die Infektion über Süßwasserkontakt erfolgt, infizieren sich die Menschen in den Endemiegebieten täglich neu. Der chronische Verlauf der Erkrankung führt bei den betroffenen Menschen meist zu einem lebenslangen Leidensweg und zu sozialen Problemen, wie Arbeitsunfähigkeit, Armut, Isolation und Anfälligkeit gegenüber anderen Erregern (z.B. Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)). Zudem leiden vor allem Kinder unter Symptomen wie Eisenmangelanämie, Unterernährung, Wachstumshemmung und geistiger Unterentwicklung (Colley et al. 2014; Ezeamama et al. 2018).

Um diesen Menschen helfen zu können und auch die erhöhte Infektionsgefahr anderer Infektionskrankheiten (HIV) zu minimieren, die beispielsweise durch Läsionen einer Schistosomeninfektion begünstigt werden, wird dringend ein Impfstoff benötigt. Auf Basis moderner molekularbiologischer Methoden (Genom-, Transkriptom- und Proteomanalysen) zielen die Arbeiten unterschiedlicher Arbeitsgruppen zur Impfstoffentwicklung derzeit in erster Linie auf Tegumentproteine der Würmer ab, um so eine gezielte Abwehrreaktion des Körpers hervorzurufen (El Ridi und Tallima 2013; Figueiredo et al. 2015). Bislang befinden sich nur drei Impfstoffkandidaten in klinischen Studien beim Menschen, die maximal eine Teilimmunität von 50-60% hervorrufen. Damit kann die Verbreitung der Schistosomiasis und die Folgen des chronischen Verlaufes hinausgezögert, aber nicht verhindert werden (Lebens et al. 2004). Als Forschungsmodell für die Therapie- und Impfstoffentwicklung wird häufig die Maus als Versuchstier herangezogen. *In vivo* Studien zeigten,

dass die abgelegten Parasiten-Eier in der Leber sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus, eine im zeitlichen Verlauf ähnliche T-Zell-Polarisation mit Granulombildung und anschließender Leberfibrose hervorrufen (Brunet et al. 1998; Dunne und Pearce 1999).

Die Fortpflanzung von Schistosomen erfolgt über einen Vertebraten/Invertebraten Zyklus bestehend aus ungeschlechtlicher und geschlechtlicher Fortpflanzung. Zur ungeschlechtlichen Fortpflanzung benötigen Schistosomen eine Süßwasserschnecke (*Biomphalaria glabrata* bei *S. mansoni*) als Zwischenwirt. Hier reifen über mehrere ungeschlechtliche Entwicklungsstadien, die für den Menschen (Endwirt und geschlechtliche Fortpflanzung) infektiösen Zerkarien heran. Durch Lichtreiz strömen die Zerkarien 5-6 Wochen nach Infektion aus der Schnecke heraus ins Süßwasser. Über einen chemotaktischen Gradienten finden freischwimmende Zerkarien ihren Endwirt (Mensch, Maus oder andere Säugetiere). Nachdem die Zerkarien durch die Haut des Endwirtes eingedrungen sind, entwickeln sich die juvenilen Larven während ihrer Migration durch die Lunge und das Herz zu adulten Würmern, bis sie sich in der Pfortader verpaaren. Von dort aus wandern die verpaarten Würmer über die Portalvene blutabwärts in das Mesenterium, wo sie anschließend verbleiben und mit der Eiablage beginnen. Ein *S. mansoni*-Pärchen produziert bis zu 300 Eier täglich (Gryseels 2012). Diese gelangen ins Blutgefäßsystem und zum Großteil über die Blutgefäßwand in das Darmlumen und werden mit dem Stuhl ausgeschieden. Im Verlauf kann es zur Polypen-Bildung und Fibrosierung des Darms kommen. Etwa ein Drittel der Eier wird mit dem Blutstrom zurück in die Leber geschwemmt. Hier bleiben die Eier in den feinen Lebersinusoiden stecken und verursachen so das klinische Bild der hepatolienalen Schistosomiasis (Gryseels et al. 2006).

Zum Zeitpunkt der ersten Eiablage herrscht ein vorwiegend von T-Helfer-Zellen des Subtyps 1 (Th1) dominiertes Entzündungsmilieu induziert durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon gamma (IFN γ) oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), wobei verschiedene Entzündungszellen, wie Makrophagen, Eosinophile und CD4⁺ T-Helferzellen angelockt werden. Erst mit zunehmendem Infektionsverlauf und der Chronifizierung der Erkrankung erfolgt eine Verschiebung der Immunreaktion in Richtung profibrotischer Th2-Antwort (Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13)) (Wynn et al. 2004). Dies führt zur Bildung von extrazellulärer Matrix und zur Fibrosierung der Leber (Pearce und MacDonald 2002), welche letztendlich zur Deformation und Sklerosierung der intrahepatischen Blutgefäße führt (Loebermann et al. 2009). Die klinischen Folgen der Fibrosierung der Leber sind portaler Hochdruck und die daraus resultierenden Komplikationen wie Hepatosplenomegalie, Aszites und Ösophagusvarizenblutungen (Colley et al. 2014). Die Regulation der Th2-Antwort und die Chronifizierung des Krankheitsverlaufes werden über die modifizierte Th2-Antwort gesteuert. Die Th2-Antwort fällt auf ein gleichbleibendes Level, woraufhin regulatorische T-

Zellen (Tregs) rekrutiert werden, was zur Folge hat, dass im weiteren Verlauf gebildete Granulome wesentlich kleiner sind (Pearce und MacDonald 2002; Fairfax et al. 2012; Lundy und Lukacs 2013).

1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund - Die eingeschlechtliche *Schistosoma mansoni* Infektion

Im Vergleich zu anderen Trematoden, ist die Besonderheit der Schistosomen die Getrenntgeschlechtlichkeit. Morphologisch zeigen männliche und weibliche Schistosomen große Unterschiede. Das dünnere und längere Weibchen liegt in der Bauchfalte (*Canalis gynaecophorus*) des kürzeren und dickeren Männchens. So verbleiben die Würmer lebenslang verpaart im Mesenterium, wobei das Weibchen nur zum Teil aus dem Männchen herausragt (Ribeiro-Paes und Rodrigues 1997).

Bei der immunologischen Reaktion des Wirtes auf den Parasiten *S. mansoni* handelt es sich um eine Hypersensitivitätsreaktion vom verspäteten Typ (Typ 4) vermittelt durch spezifische T-Zellen. Während die Parasiteneier stark immunogen sind und somit die eigentliche Krankheitsursache der Schistosomiasis darstellen, haben die adulten Würmer im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um nicht durch das Immunsystem des Wirtes abgetötet zu werden (Braschi und Wilson 2006; Liu et al. 2007; Castro-Borges et al. 2011; Da'dara et al. 2017). Dennoch hat das Wurmantigen Einfluss auf die zelluläre Immunantwort des Wirtes. Bereits vor Beginn der Eiablage sind alternativ aktivierte Makrophagen, die IL-4 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, nachweisbar (Oliveira Fraga et al. 2010). Für die genaue Untersuchung der Immunantwort gegen den Wurm ohne Einfluss der organ-schädigenden Eiablage, wurden in älteren Studien Infektionsmodelle entwickelt mit einer sterilen, eingeschlechtlichen Infektion mit nur männlichen oder nur weiblichen Würmern (Moné und Boissier 2004). Das Verständnis für die unterschiedlichen Immunantworten auf männliche und weibliche Schistosomen im Endwirt könnte in Zukunft weitere Ansätze zur Entwicklung geeigneter Infektions-Prophylaxen bringen.

Erste Vakzinierungsversuche wurden mit radioaktiv inaktivierten Zerkarien im Mausmodell durchgeführt. Dies führte zu einem 50-70%igen Schutz vor Neuinfektion allerdings unabhängig vom Geschlecht (Bickle 1982; Lebens et al. 2004). Im Gegensatz zu vitalen Zerkarien benötigen radioaktiv inaktivierten Zerkarien 25% länger für die Hautpassage, wodurch eine stärkere Th1-Antwort hervorgerufen wird und mehr Entzündungszellen in die Haut einwandern, im Vergleich zu einer normalen Infektion (Mountford et al. 1988). Die Immunisierung mit radioaktiv inaktivierten Zerkarien ist bislang die erfolgreichste Immunisierungsstrategie im Mausmodell. Der protektive Effekt kann durch die zusätzliche Gabe von Interleukin 12 (IL-12) als Adjuvans noch gesteigert werden (Lebens et al. 2004; Stephenson et al. 2014). Eine unterschiedlich ausgeprägte geschlechtsspezifische Wirkung auf das Immunsystem des Wirtes zeigen die adulten Würmer. Zur Beeinflussung des Immunsystems

durch männliche und weibliche Schistosomen gibt es einige ältere Untersuchungen, die zeigen, dass Männchen in der Lage sind das Immunsystem zu beeinflussen, sowohl über die Bildung von Antikörper, als auch durch Entzündungsprozesse (Nash 1978; Mahmoud und Woodruff 1978; Attallah et al. 1979; Baki und Grimaud 1985; Cutts und Wilson 1997; Jacobs et al. 1997; Baki et al. 1998; Silva et al. 2003). Im Vergleich zur eingeschlechtlichen Infektion mit Weibchen ist nach eingeschlechtlicher Infektion mit männlichen Würmern die Ausprägung des Ohr-*Delayed-type-hypersensitivity*-Tests (als Parameter für eine spezifische Immunreaktion) stärker und die Zahl an Leukozyten und die Gewichte von Lebern und Milzen deutlich angestiegen (Boissier et al. 2003a). Es wird vermutet, dass Männchen aufgrund ihrer größeren Oberfläche immunogener sind als Weibchen (Boissier et al. 2003a). Dennoch besitzt nicht nur das Tegument der Würmer eine immunogene Wirkung, sondern auch die Exkretionsprodukte und Antigene des Darmtraktes sind von Bedeutung (Figueiredo et al. 2015). Eine *in vitro* Studie zeigte, dass die Ausscheidung von Sekretionsprodukten in der Kulturschale nach 5 Tagen außerhalb des Wirtes bei weiblichen Schistosomen signifikant stärker ist (van Dam et al. 1996). Zudem ist die Aufnahme von Erythrozyten durch das Weibchen (für die Eiproduktion) in einer Verpaarung 10-mal höher als beim Männchen (Weibchen über 330.000 und Männchen über 39.000 Erythrozyten pro Stunde) (Moné und Boissier 2004).

Nach Reinfektion konnte gezeigt werden, dass eine eingeschlechtliche Vorinfektion mit männlichen oder weiblichen Zerkarien keinen oder nur geringen Einfluss auf die Wurm- oder Eilast oder Bildung der hepatischen Fibrose aufweist (Dean et al. 1978; Bickle et al. 1979; Boissier et al. 2003a; Moné und Boissier 2004). Andere Studien weisen auf eine protektive Wirkung hin, die sowohl abhängig von der Zerkarienzahl als auch dem Infektionszeitraum zwischen der ersten und zweiten Infektion ist. Nach Vorinfektion mit hoher Zerkarienzahl von 300 konnte ein protektiver Effekt durch beide Geschlechter gezeigt werden (Moloney et al. 1986), wobei die Wurmlastreduktion durch Vorinfektion mit männlichen Würmern (18,7%) doppelt so hoch war wie die Reduktion durch weibliche Vorinfektion (8,5%). Im Lungengranulommodell, in dem Parasiten-Eier über die Schwanzvene injiziert werden und so zu einer synchronen Granulombildung in der Lunge führen, zeigen sich nach eingeschlechtlicher Vorinfektion mit weiblichen und männlichen Zerkarien vergleichbar große Granulome in der Lunge (Cheever et al. 1997).

Bezüglich der Unterschiede in der Infektiosität zwischen männlichen und weiblichen Zerkarien bestehen immer noch Unklarheiten. Frühere Studien zeigten entweder keinen Unterschied in Bezug auf das Eindringen männlicher und weiblicher Zerkarien (Stirewalt und Fregeau 1968; Rowntree und James 1977; Boissier et al. 2003b; Moné und Boissier 2004) oder beschreiben eine höhere Infektiosität der männlichen Zerkarien (Boissier und Moné 2000, 2001). Diese Unterschiede könnten auf unterschiedliche Perfusionszeitpunkte (heraus spülen der Würmer) der Würmer zurück zu führen sein.

Es wurde gezeigt, dass sowohl nach 3 Stunden in der Haut, nach 6 Tagen in der Lunge und auch nach 14 Tagen in der Leber keine Unterschiede in der Anzahl von männlichen und weiblichen Schistosomen bestehen. Erst nach 28 Tagen wurden nach Perfusion der Leber mehr Männchen als Weibchen gezählt (Rowntree und James 1977). Für diese Beobachtung kommen zwei Theorien in Frage: 1. Männchen können tatsächlich allein besser im Wirt überleben oder 2. männliche Würmer lassen sich besser herausspülen, da die weiblichen Würmer auf Grund ihrer geringeren Größe weiter in das Lebergewebe eindringen können (Stirewalt und Fregeau 1968).

Die Lokalisation der adulten männlichen und weiblichen Schistosomen unterscheidet sich im Endwirt deutlich. Vier Wochen nach Infektion befindet sich das Weibchen in der Leber, wandert von dort in die Portalvene und wartet dort ca. zwei Wochen auf ein geeignetes Männchen. Kommt es nicht zur Verpaarung wird das Weibchen zurück in die Leber gespült und verbleibt dort. Männchen hingegen wandern weiter in das Mesenterium (Moné und Boissier 2004). In früheren Studien wurde gezeigt, dass nach 8 Wochen 85% der Weibchen bei einer eingeschlechtlichen Infektion in der Leber lokalisiert sind, 15 % in den Mesenterialvenen und 0% in den feinen Mesenterialgefäßen. Bei den Männchen sind nur 65% in der Leber, 20% in den Mesenterialvenen und 15% in den Mesenterialgefäßen zu finden (Standen 1953; Moné und Boissier 2004). Außerdem entwickelt sich das Weibchen bei einer eingeschlechtlichen Infektion nicht komplett zur Geschlechtsreife (Popiel et al. 1984). Hierfür benötigt das Weibchen immer den direkten Kontakt zum Männchen (Ribeiro-Paes und Rodrigues 1997). Die unreifen Weibchen sind wesentlich dünner und kleiner als verpaarte Weibchen. Durch die dauerhafte Lokalisation in der Leber, zeigten Blutgefäße mit weiblichen Wurmern aus einer eingeschlechtlichen Infektion und auch das sie umgebende Lebergewebe eine starke Akkumulation von Entzündungszellen. Es zeigt sich somit eine deutliche Immunreaktion auf unverpaarte Weibchen, im Gegensatz zu verpaarten Männchen oder unverpaarten Männchen (Beobachtungen Vorversuche der Arbeitsgruppe der Abteilung Tropenmedizin und Infektionskrankheiten und Sektion Nephrologie der Universitätsmedizin Rostock).

2. Fragestellung

Das Mausmodell ist ein vielfach beschriebenes und etabliertes Modell zur Untersuchung von immunologischen Vorgängen nach einer Infektion mit *Schistosoma mansoni*. Aufgrund der zum Teil geringen Probenmengen, die in der Maus zur Analyse gewonnen werden können, ist es häufig notwendig, beispielweise Wurmlasten und fibrotische Veränderungen in unterschiedlichen Tieren zu analysieren und ein Großteil des Probenmaterials wird bereits verbraucht und kann für andere Untersuchungen nicht genutzt werden. Auch die Wurm- und Elast korreliert nicht zwangsweise mit der hepatischen Fibrose. In der Humanmedizin wird zudem die transiente Elastographie (Fibroscan™), ein Ultraschallverfahren zur Messung der Lebersteifigkeit als Maß für die Leberfibrose, angewendet (Sandrin et al. 2003). Auch diese Methode ist aufgrund der Größe einer Mausleber nicht realisierbar. Leberwerte, wie Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), alkalische Phosphatase (AP) und Bilirubin, die normalerweise im Serum gemessen werden und auf eine Hepatozytenschädigung hinweisen, sind in der Schistosomiasis nicht erhöht (Loebermann et al. 2009; Sombetzki et al. 2015). Die Beurteilung der Leberfibrose ist in der Therapie- und Impfstoffforschung ebenso wichtig wie in der Humanmedizin, daher werden auch im Mausmodell einfache Methoden zur Bewertung des Schweregrades der Leberfibrose benötigt, nicht zuletzt um die Anzahl an Versuchstieren zu reduzieren.

Bislang gibt es keinen wirksamen Impfschutz gegen eine Infektion mit *Schistosoma spp.*, da zahlreiche offene Fragen in Bezug auf die immunologische Abwehr des Wirtes gegen den Parasiten bestehen. Die Schwierigkeit liegt hier in der Komplexität des Parasiten mit seinen unterschiedlichen Entwicklungsstadien im Endwirt, den Parasiteneiern und Unterschieden in der Immunogenität zwischen männlichen und weiblichen Würmern. Daher ist es wichtig die Hintergründe und Grundlagen der unterschiedlichen Immunreaktionen auf den Wirt der beiden *S. mansoni* Wurmgeschlechter auf zellulärer und humoraler Ebene aufzuklären, um sich die geschlechtsspezifische Immunantwort zur Etablierung eines Impfmodells nutzbar zu machen. Folgende Fragestellungen wurden in dieser Arbeit bearbeitet:

- I. Ist es möglich die Leberschädigung makroskopisch mit Hilfe eines Punktesystems zu bewerten?
 - Korreliert diese Bewertung mit den histologischen Untersuchungen (Sirius-Red-Färbung)?
 - Ist es möglich die Leberschädigung in einem Biosensor nachzuweisen, der die schädigende Wirkung von Plasma auf eine hepatische Zelllinie nachweist?
- II. Haben männliche und weibliche Würmer ein unterschiedlich hohes Potential, um im Rahmen einer sterilen eingeschlechtlichen Vorinfektion eine zweigeschlechtliche Reinfektion zu beeinflussen?

2 Fragestellung

- Welchen Einfluss hat die eingeschlechtliche Vorinfektion auf die Wurm- und Eilast, T-Zell-Polarisierung, Antikörperlevel, Toleranzfaktoren, Granulombildung in der Leber und hepatische Fibrose einer Reinfektion?

III. Beeinflusst eine eingeschlechtliche Vorinfektion auch die Parasitenabwehr in der Haut?

- Wie beeinflusst die Art der Vorinfektion die Rekrutierung von Entzündungszellen, dem Zytokin / Chemokinlevel oder Th1-/Th2-Antwort nach Injektion von Zerkarien in eine „Air Pouch“?
- Wie beeinflusst die Art der Vorinfektion die Expression von Anergie-assoziierten Genen?
- Hat der systemische Effekt der eingeschlechtlichen Vorinfektion Einfluss auf die Wurm- oder Eilast einer Reinfektion?

3. Methoden

3.1 Fibrose, makroskopisches Bewertungssystem und Biosensor

In der ersten Studie dieser Arbeit sollten NMRI Mäuse mit unterschiedlichen Infektionsstärken (25, 50 und 100 Zerkarien) in Hinblick auf ihre Leberschädigung makroskopisch beurteilt werden (Sombetzki et al. 2016). Hierfür wurden die Mauslebern 12 Wochen nach Infektion mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Punktesystem bewertet. Das Punktesystem bewertet das Leber- und Milzgewicht, die Farbe und die Konsistenz der Leber, sowie Sichtbarkeit und Verteilung von Granulomen in der Leber von nicht, schwach, mittel und stark infizierten Mäusen. Dabei erhalten gesunde Tiere einen maximalen Punktwert von 1 während stark infizierte Tiere einen maximalen Wert von 12 erreichen können. Verifiziert wurde diese makroskopische Beurteilung durch histologische Färbungen (Sirius-Red-Färbung (SR) und Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)). Außerdem wurden die Leberwerte, wie Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), alkalische Phosphatase (AP) und Bilirubin im Serum der Mäuse bestimmt. Zudem wurde ein weiteres ebenfalls neu-etabliertes Testsystem zur Beurteilung des Infektions-assoziierten Hepatozytenschadens angewandt. Dabei wurde das Lithium-Plasma der unterschiedlich stark-infizierten Tiere in einem Biosensorsystem auf eine potentiell zellschädigende Wirkung analysiert. Das Biosensorsystem basiert auf der Hepatozytenzelllinie HepG2/C3A. Nach Inkubation der Zellen mit dem Plasma infizierter Mäuse wurde die Vitalität der Zellen mittels XTT (Dehydrogenase – Aktivität in den Mitochondrien) quantifiziert und die Zellzahl durch Trypan-Blau-Färbung bestimmt. Zusätzlich wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) in den Zellkulturüberständen gemessen. Entwickelt wurde dieser Sensor für den Vergleich von Plasma aus septischen und nicht septischen Patienten. Plasma von Patienten mit septischen Schock mindern die Zellfunktion und Viabilität von HepG2/C3A Zellen (Sauer 2006; Sauer et al. 2012).

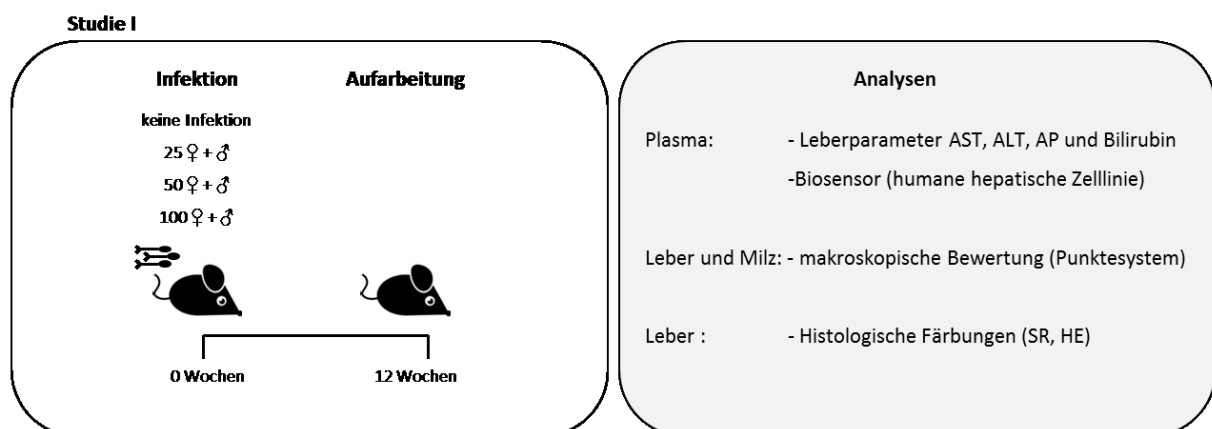


Abbildung 1: Bewertungssystem und Biosensor. Infektionsschema und Analysen der Studie I (Sombetzki et al. 2016).

In der zweiten Studie dieser Arbeit sollte gezeigt werden, inwieweit eine Vorinfektion mit nur männlichen oder weiblichen Schistosomen eine beidgeschlechtliche Reinfektion (mit Eiablage) beeinflusst (Kosłowski et al. 2017). Der Abstand zwischen Vorinfektion und Reinfektion betrug in diesem Versuch 11 Wochen. Das Geschlecht von Schistosomen ist bereits im befruchteten Ei determiniert. Das bedeutet, dass sich in der Wasserschnecke aus einem Mirazidium über ungeschlechtliche Vermehrung ca. 1000 Zerkarien eines Geschlechts entwickeln. Über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) besteht die Möglichkeit das Geschlecht im Larvenstadium (Zerkarie) zu bestimmen (Grevelding et al. 1997; Boissier et al. 2001; Quack et al. 1998; Gasser et al. 1991). Für diese Arbeit wurden C57BL/6J Mäuse mit 100 männlichen, 100 weiblichen oder 100 männlichen und weiblichen Zerkarien vorinfiziert und nach 11 Wochen mit 50 bzw. 150 Zerkarien beidgeschlechtlich reinfiziert. Nach weiteren 8 Wochen wurden die Mäuse aufgearbeitet und der Einfluss auf die Wurm- und Eilast, T-Zell-Polarisierung, Antikörperlevel, Toleranzfaktoren, Granulombildung in der Leber und hepatische Fibrose untersucht. Hierfür wurden histologische Färbungen der Lebern angefertigt (SR und HE) und messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Analysen mittels real-time PCR, sowie Multiplexanalysen zur Zytokinbestimmung im Serum durchgeführt.

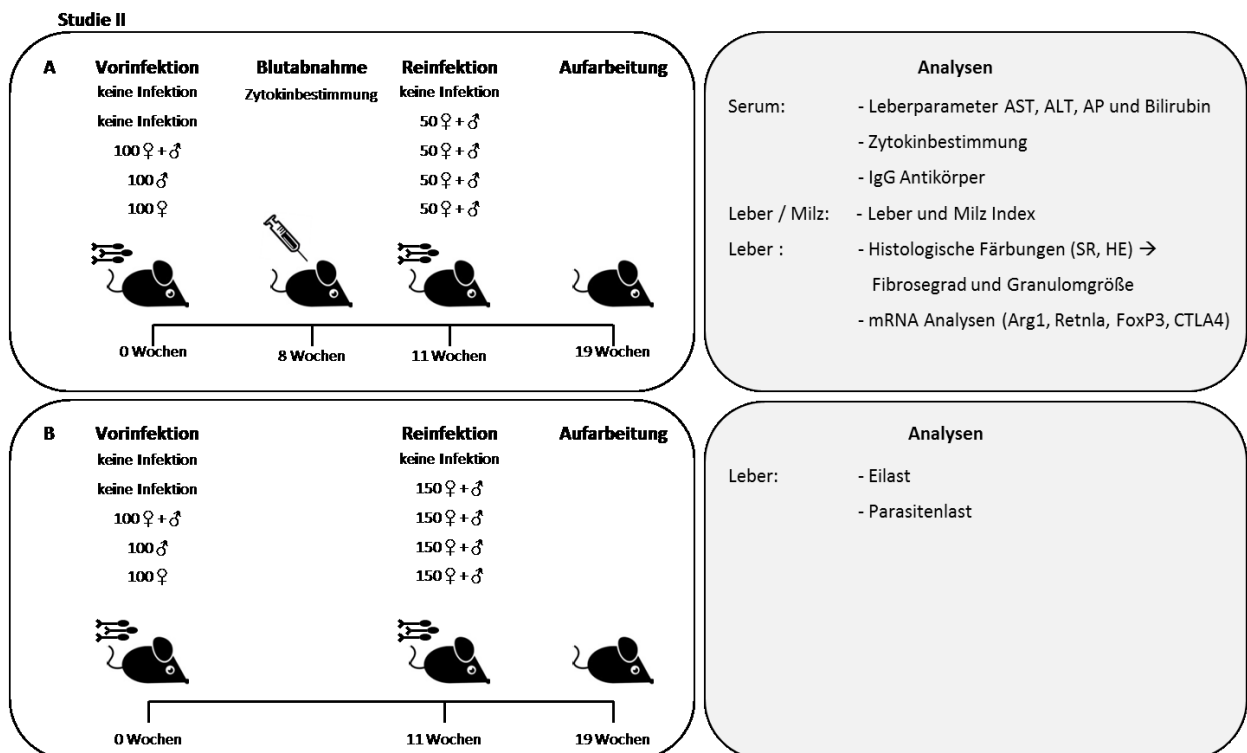


Abbildung 2: Zweistufiges *Schistosoma mansoni* Infektionsmodell. Infektionsschema und Analysen der Studie II. In Abbildung A und B sind zwei unabhängige Tierversuche dargestellt (Koslowski et al. 2017).

3.3 „Air Pouch“-Modell

In der dritten Studie dieser Arbeit sollte die Immunantwort in der Haut bei eingeschlechtig vorinfizierten C57BL/6J Mäusen untersucht werden (Sombetzki et al. 2018). Es wurden C57BL/6J Mäuse mit 100 männlichen, 100 weiblichen oder 100 männlichen und weiblichen Zerkarien infiziert. Zur Stimulation der Zerkarienabwehr in der Haut wurde das „Air Pouch“-Modell verwendet. Sechs Wochen nach der ersten Infektion erfolgte die Injektion von 100 Zerkarien beider Geschlechter in einer Trägerflüssigkeit (Phosphat-gepufferte Saline (PBS)) in eine sogenannte „Air Pouch“ (Kontrollgruppe erhielt nur PBS). Dabei handelt es sich um einen luftgefüllten Hohlraum im Nacken der Mäuse. Hierfür wurde den Mäusen unter Isofluran-Anästhesie dreimal im Abstand von 2 Tagen subkutan 2-4 ml sterile Luft in den Nacken injiziert. Es bildete sich ein luftgefüllter Ballon, der von einer zusätzlichen dünnen Bindegewebshaut umgeben war. Die Immunantwort gegen die Zerkarien in der „Air Pouch“ wurde 6 Stunden nach Injektion analysiert. Die eingewanderten Entzündungszellen und entsprechenden Entzündungsparameter wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Zusätzlich wurden Antikörperlevel im Serum und mRNA Expressionslevel von Toleranzfaktoren mittels real-time PCR im Lebergewebe bestimmt. Die Effekte in der „Air Pouch“ wurden in einem weiteren Tierversuch untersucht. Hierfür wurden C57BL/6J Mäuse mit 100 männlichen, 100 weiblichen oder 100 männlichen und weiblichen Zerkarien vorinfiziert und nach 6 Wochen mit 50 bzw. 150 Zerkarien beidgeschlechtlich reinfiziert. Nach weiteren 8 Wochen wurden die Mäuse aufgearbeitet und der Einfluss auf Wurm- und Eilast, Granulombildung in der Leber und hepatische Fibrose untersucht. Hierfür wurden histologische Färbungen der Lebern angefertigt (SR und HE).

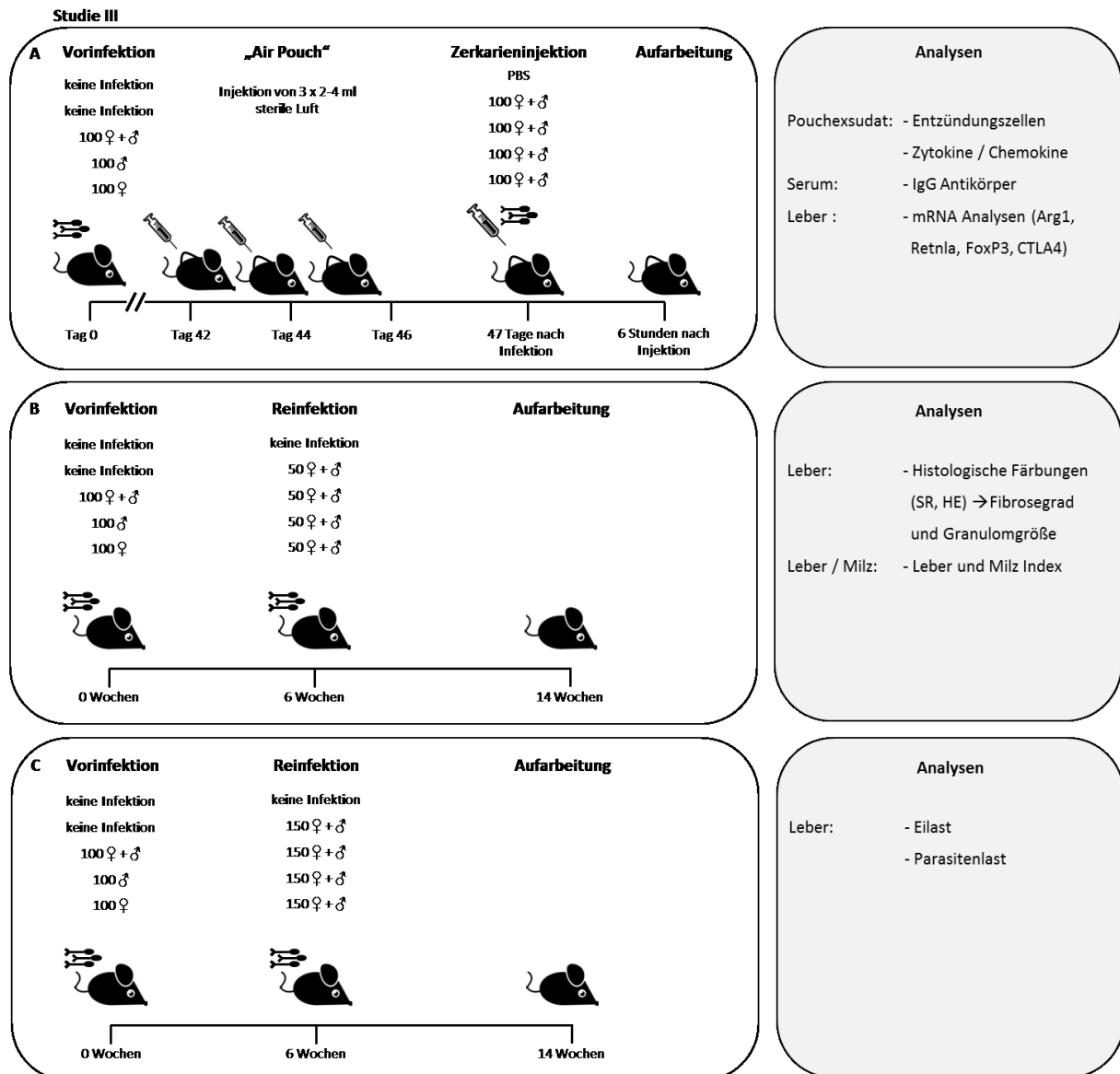


Abbildung 3: „Air Pouch“-Modell. Infektionsschema und Analysen der Studie III. In Abbildung A, B und C sind drei unabhängige Tierversuche dargestellt (Sombetzki et al. 2018).

4. Ergebnisse

4.1 Ein Fibrose-Scoring-System und ein *ex vivo* Hepatozyten-basierter Biosensor zur Beurteilung der hepatischen Fibrose im *Schistosoma mansoni* Mausmodell

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurden die Lebern von *S. mansoni* infizierten Mäusen unterschiedlicher Infektionsintensitäten (25, 50 und 100 Zerkarien) makroskopisch nach der Leberschädigung quantifiziert und mit einem makroskopischen Punktesystem bewertet (Sombetzki et al. 2016). Es waren signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Infektionsintensitäten zu sehen. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der makroskopischen Bewertung der fibrotischen Lebern und den histologischen Untersuchungen. Die Lebern der mit 100 Zerkarien infizierten Mäuse waren grau, blass und mit deutlich sichtbaren Granulomen versehen und wurden mit $10 \pm 0,1$ Punkten bewertet. Die Lebern der mit 50 Zerkarien infizierten Mäuse zeigten eine eher rötliche Färbung und deutlich weniger Granulome ($7 \pm 1,9$). Ein signifikanter Anstieg von fibrotischen Arealen in den Lebern (Anteil der roten Areale in der SR-Färbung) korrelierte mit der steigenden Infektionslast. Eine Verifikation des Punktesystems mit dem verwendeten Biosensor zeigte ebenfalls eine Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Zellvitalität, nach Inkubation mit dem Plasma infizierter Tiere. Die Zellen, die mit Plasma der mit 100 Zerkarien infizierten Gruppe behandelt wurden, zeigten die stärkste Beeinträchtigung im Zellwachstum und in der Vitalität. Das Plasma der Tiere aus der naiven Kontrollgruppe führte zu einer leichten Abnahme der Zellzahl und Extinktion im XTT - Test und zeigte höhere Werte von LDH in den Zellkulturüberständen im Vergleich zur Medium-Kontrolle. Leberwerte, wie ALT, AST, AP und Bilirubin im Serum der infizierten Mäuse zeigten keinen signifikanten Anstieg, im Vergleich zu den gesunden Mäusen.

4.2 Weibliche *Schistosoma mansoni* reduzieren die hepatische Fibrose im *Schistosoma mansoni* Mausmodell

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde untersucht, ob männliche oder weibliche Schistosomen ein unterschiedlich hohes Potential besitzen, um im Rahmen einer sterilen eingeschlechtlichen Vorinfektion eine beidgeschlechtliche Reinfektion zu beeinflussen (Koslowski et al. 2017). Die Lebern der Mäuse, die mit weiblichen Zerkarien vorinfiziert waren, wiesen makroskopisch weniger pathologische Veränderungen auf. Es zeigten sich weniger sichtbare Granulome, die Oberfläche war glatt und die Färbung dunkelrot, ähnlich wie bei den naiven Tieren. Lebern und Milzen zeigten keine Gewichtsunterschiede im Vergleich zu den Organen der naiven Gruppe. Durch die Vorinfektion mit weiblichen Zerkarien zeigte sich interessanterweise eine signifikante Reduktion der hepatischen Fibrose. Im Vergleich zeigten die Lebern der Mäuse, die entweder nicht vorinfiziert oder mit männlichen Zerkarien vorinfiziert waren, deutlich ausgeprägte Granulome, signifikante

Gewichtserhöhung und eine gräuliche Färbung. Die Parasitenlast war in allen vorinfizierten Gruppen vergleichbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die Leberschädigung durch die Vorinfektion mit weiblichen Schistosomen, trotz vergleichbarer Parasitenlast, verringert wurde. Die Th1-Zytokine TNF α und IFN γ waren in allen infizierten Gruppen vergleichbar. Im Serum von Mäusen mit weiblicher Vorinfektion wurden signifikant weniger profibrotische Zytokine, IL-4 und IL-13, gemessen, im Vergleich zu den anderen infizierten Gruppen. Die Ausprägung der Th2-Antwort wurde zudem durch die mRNA Expression von Arginase 1 (Arg1) und *resistin like alpha* (Retnla) in der Leber dargestellt, welche als Marker für M2 Makrophagen verwendet werden. Retnla war signifikant erniedrigt in den Mäusen mit weiblicher Vorinfektion, im Vergleich zu den anderen infizierten Gruppen. Das *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4* (CTLA4), welches auf der Oberfläche von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, ist ein wichtiger Marker für die Ausbildung von Anergie (Taylor et al. 2007). Einen signifikanten Anstieg von CTLA4 konnte ausschließlich in den Mäusen, die mit weiblichen Zerkarien vorinfiziert waren, gemessen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der weibliche Wurm nach elfwöchiger Vorinfektion die Th2-Antwort unterdrückt ohne aber die Th1-Antwort zu beeinflussen. Zusätzlich wurde durch den weiblichen Wurm die CTLA4-Expression hochreguliert. CTLA4 ist ein Marker für die Präsenz von regulatorischen T-Zellen, was die Ursache für die reduzierte hepatische Fibrose und Granulomgröße in der Leber sein könnte. Währenddessen hat der weibliche Wurm keinen Einfluss auf die Wurm- und Eilast.

4.3 Parasitenabwehr oder Immunsuppression: Männliche und/oder weibliche *Schistosoma mansoni* beeinflussen das Immunsystem auf unterschiedliche Art und Weise zum Schutz gegen eindringende Zerkarien

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob die durch die Vorinfektion mit weiblichen Würmern hervorgerufene Suppression der Immunantwort einen systemischen Effekt auf die Abwehr der Erreger in der Haut hat (Sombetzki et al. 2018). Dazu wurde das „Air Pouch“-Modell verwendet. Untersucht wurde das immunologische Geschehen in der „Air Pouch“ 6 Stunden nach Injektion der Zerkarien, exemplarisch für eindringende Zerkarien.

In den „Air Pouch“-Exsudaten der Gruppen ohne Vorinfektion und Vorinfektion mit männlichen Zerkarien fand eine starke Infiltration von Entzündungszellen, mit entsprechenden Chemokin- bzw. Zytokin-Level statt. Die Anzahl an Zellen des angeborenen Immunsystems, wie GR1+ Monozyten, Eosinophile und Neutrophile waren in beiden Gruppen signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen infizierten Mausgruppen. Ein erhöhter Einstrom von Makrophagen konnte ausschließlich in der Gruppe mit männlicher Vorinfektion detektiert werden. Zusätzlich konnten in der männlich

vorinfizierten Gruppe erhöhte Immunglobulin G1- (IgG1) und G2b (IgG2b) Antikörperlevel detektiert werden. Des Weiteren war die Expression des *Fork head protein 3 (Foxp3)*, ein Marker für regulatorischen T-Zellen, in der Gruppe mit männlicher Vorinfektion reduziert.

Im Gegensatz dazu zeigten die Gruppen mit Vorinfektion durch weibliche bzw. beidgeschlechtliche Zerkarien eine signifikante Reduktion sowohl der Anzahl der Entzündungszellen als auch der Chemokin- und Zytokinlevel in den „Air Pouch“-Exsudaten. Auch die Th1- (IFN γ , TNF α , IL-1 β und IL-12) und Th2-Zytokine (IL-5 und IL-13) waren nach weiblicher Vorinfektion signifikant reduziert, im Vergleich zur männlichen Vorinfektion. Die Expressionslevel Anergie-assoziiierter Gene wie *Il-10* und *Ctla4*, von denen bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der granulomatösen Hyporesponsivität spielen (Smith et al. 2004; Walsh et al. 2007), waren nur in den Mäusen mit weiblicher und beidgeschlechtlicher Vorinfektion erhöht. Die stärkste Expression der Anergie-assoziierten Gene konnte in der beidgeschlechtlichen Gruppe gezeigt werden, wo zum Zeitpunkt der Messung bereits eine Eiablage erfolgte. In keiner der infizierten Versuchsgruppen konnten Unterschiede in der Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen gemessen werden.

Aufgrund der gesteigerten Immunabwehr in den Gruppen mit männlicher Vorinfektion und ohne Vorinfektion im Vergleich zu den anderen infizierten Gruppen sollte untersucht werden, ob die oben beschriebenen Parameter einen Einfluss auf die Wurm- und Eilast nach sechs-wöchiger Reinfektion haben. Es konnte eine signifikante Reduktion der Wurm- und Eilast nach Reinfektion gezeigt werden. Die reduzierte Wurm- und Eilast hat jedoch keinen Einfluss auf die hepatische Fibrose.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der weibliche Wurm durch die Reduktion der Anzahl an Entzündungszellen und durch die Beteiligung von CTLA4 und IL-10 die Immunantwort des Wirtes supprimieren kann, aber keinen Effekt auf den Infektionserfolg hat. Demgegenüber besteht ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Anzahl an rekrutierten Entzündungszellen und IgG Antikörpern und dem Abtöten der Zerkarien in der Haut bei männlicher eingeschlechtlicher Vorinfektion.

5. Diskussion

Die Schistosomiasis ist mit über 258 Millionen Infizierten eine der bedeutendsten Wurmparasitosen der Welt, mit zum Teil schwerwiegenden Komplikationen, wie Leberfibrose, portaler Hypertension und Ösophagusvarizenblutungen (Colley et al. 2014). Bislang gibt es keinen wirksamen Impfschutz gegen eine Infektion mit *Schistosoma* spp. (Tebeje et al. 2016). Die Schwierigkeit liegt in der Komplexität des Parasiten mit seinen unterschiedlichen Entwicklungsstadien im Endwirt, Unterschieden in der Immunogenität dieser Larvenstadien und Unterschieden zwischen männlichen und weiblichen Parasiten. Trotz Massenbehandlungen in den Endemiegebieten mit dem gut wirksamen Anthelmintikum Praziquantel konnte die Schistosomiasis bislang nicht eingedämmt werden (Matthews 2011; King 2009), da Praziquantel zwar eine Entwurmung herbeiführt aber nicht vor Neuinfektion schützt. Zudem kann sich der Zwischenwirt (Süßwasserschnecke) durch die Klimaerwärmung immer weiter ausbreiten. Im Jahr 2013 wurden die ersten Fälle der Übertragung von *S. haematobium* in Europa (Korsika, Frankreich) beschrieben (Boissier et al. 2016). Auch Strategien wie Vektorkontrollen (Schnecken), Umweltmodifikationen, Aufklärung und Verbesserung der Hygienestandards in den Endemiegebieten sind nur mäßig erfolgreich und zum Teil bürokratisches Wunschdenken bzw. massive Eingriffe in das Ökosystem (Mo et al. 2014; Chitsulo et al. 2000). Die Entwicklung eines Impfstoffes ist eine erfolgsversprechende Möglichkeit die Schistosomiasis einzudämmen. Hierfür benötigt es allerdings ein umfangreiches Verständnis von noch weitreichend unbekannten immunologischen Mechanismen der Wirt-Parasiten-Wechselwirkung. Aber nicht nur die Impfstoffentwicklung ist von großer Bedeutung, sondern auch die Entwicklung von Therapien. Insbesondere antifibrotische Therapien, sind notwendig, um schwere Krankheitsverläufe zu verhindern. Dabei ist das Mausmodell der *Schistosoma mansoni* Infektion unverzichtbar zur Aufklärung von immunologischen Abläufen während der Infektion und zur Entwicklung bzw. Testung schistosomizider Medikamente und Impfstoffe.

In Studie I dieser Arbeit wurde ein Punktesystem entwickelt, welches speziell die Infektion-assoziierten Organveränderungen, und somit das Krankheitsbild der intestinalen Schistosomiasis bewertet (Sombetzki et al. 2016). Aufgrund der zum Teil geringen Probenmengen, die in der Maus zur Analyse gewonnen werden können, ist es häufig notwendig, beispielweise Wurmlasten und fibrotische Veränderungen in unterschiedlichen Tieren zu analysieren. Ziel der Entwicklung dieses Punktesystems war es daher, ein einfaches zur Quantifizierung der hepatischen Fibrose nutzbares Meßsystem zu etablieren, um künftig Versuchstiere einsparen zu können. Eine leichte Infektion mit 25, eine moderate Infektion mit 50 bzw. eine schwere Infektion mit 100 *S. mansoni* Zerkarien stellen etablierte Infektionsdosen dar, die für Versuche im Mausmodell verwendet werden (Dunne und Pearce 1999). Bei der experimentellen Schistosomiasis wird eine hohe Infektionsdosis gewählt, um charakteristische

Krankheitsbilder in kurzer Zeit herbeiführen zu können (Cheever 1969; Loebermann et al. 2009; Sombetzki et al. 2015). Jedoch wurden bei Autopsien im Menschen nur selten mehr als 5 Wurmpaare pro Kilogramm Körpergewicht gefunden (Warren 1966). Zur Verifizierung des Punktesystems wurde zudem eine zellbasierte Analyse des infektionsbedingten Hepatozytenschadens über einen Biosensor basierend auf HepG2 / C3A Hepatozyten durchgeführt (Sauer 2006; Sauer et al. 2012). Die Inkubation der Zellen mit Lithium-Plasma aus den drei experimentellen Gruppen (gering: 25; moderat: 50; stark: 100 Zerkarien) führte zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Testzellen in Bezug auf Vitalität und Zellwachstum. Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Konzentrationen an Chemokinen und Zytokinen im Plasma der infizierten Tiere sein. Die makroskopische Bewertung der Leberschädigung über das entwickelte Punktesystem korrelierte in diesem Versuch mit den Aussagen des Biosensors, was von hervorzuhebender Bedeutung ist, da die *S. mansoni* induzierte Schädigung der Leber über die Messung klassischer Markerenzyme wie AP, AST oder ALT im Serum der Tiere nicht zu erfassen ist. Im chronischen Verlauf der Schistosomiasis korreliert der Grad der Leberfibrose mit dem Serumspiegel der profibrotischen Interleukine 4 und 13 (Mentink-Kane et al. 2011; Schwartz et al. 2014). Dennoch ist es fraglich in welchem Umfang proinflammatorische Zytokine an der Beeinträchtigung von Zellfunktion und Lebensfähigkeit in HepG2/C3A Zellen beteiligt sind, da bei einer chronischen Schistosomiasis die Th1-Antwort durch die Th2-Zytokine unterdrückt wird (Herbert et al. 2004). Proinflammatorische Zytokine sind dafür bekannt, die Lebensfähigkeit von Zellen zu beeinflussen, indem sie eine Mitochondrienfehlfunktion verursachen (Regueira et al. 2009), die Albumin-Synthese herunterregulieren (el-Saadany et al. 2008) und eine hemmende Funktion auf P450-Cytochromen, wie Cytochrom P450-1A2, Cytochrom P450-2E1 und Cytochrom P450-7A1, auslösen (Li et al. 2006; Nakai et al. 2008). Bisher wurde der Biosensor zur Bestimmung der Hepatotoxizität auf HepG2/C3A Zellen von Plasma aus septischen und nichtseptischen Patienten in einer prospektiven klinischen Studie getestet (Sauer 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das Plasma von Patienten mit septischem Schock die Zellfunktion und Lebensfähigkeit von HepG2/C3A-Zellen beeinträchtigt. Erhöhte Werte zur Vitalität der Zellen konnten nur im Vergleich von überlebenden zu nicht überlebenden Patienten gemessen werden.

Obwohl diese experimentellen Infektionsdosen nicht mit einer natürlichen Infektion des Menschen vergleichbar sind, bedeutet das makroskopische Bewertungssystem künftig eine Reduktion der Mausezahlen im Tierexperiment. Darüber hinaus wäre ein nächster denkbarer Schritt, den HepG2 / C3A-Biosensor zur Beurteilung der humanen Schistosomiasis zu verwenden.

In Studie II sollte untersucht werden, ob männliche oder weibliche *S. mansoni* im Rahmen einer eingeschlechtlichen Vorinfektion, den Verlauf einer beidgeschlechtlichen (natürlichen) Reinfektion beeinflussen (Kosłowski et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass mit weiblichen *S. mansoni*

Zerkarien vorinfizierte Mäuse eine signifikant reduzierte Th2-vermittelte Leberfibrose nach Reinfektion aufwiesen (11 Wochen nach eingeschlechtlicher Erstinfektion), verbunden mit kleineren hepatischen Granulomen. Zudem zeigten sich in dieser Gruppe verringerte Leber- und Milzgewichte in Relation zum Körpergewicht, was auf einen milderen Krankheitsverlauf hindeutet. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in früheren Arbeiten unter Verwendung des Lungengranulommodells, kein Unterschied der Granulomgröße zwischen Mäusen, die einer früheren männlichen, weiblichen oder beidgeschlechtlichen Infektion ausgesetzt waren, gezeigt werden. Im Lungengranulommodell werden die Parasiteneier in die Schwanzvene injiziert, diese gelangen in die Lunge und es bilden sich, wie in der Leber auch, Ei-Granulome, die sich alle im gleichen Entwicklungsstadium befinden (Cheever et al. 1997). Allerdings fehlt in diesem Modell durch die direkte Applikation der Eier die zweite Wurmreifung. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eventuell ein kompletter zweiter Entwicklungszyklus nötig ist, um einen Effekt auf das Krankheitsbild hervorzurufen.

Übereinstimmend mit der verringerten Granulomgröße und Leberfibrose in der Gruppe mit weiblicher Vorinfektion wurden niedrigere Serumzytokinspiegel der profibrotischen Interleukine IL-4 und IL-13 gemessen. Ein kombinierter Knock-out der IL-4 und IL-13 Gene in Mäusen in einer früheren Studie führte zu einem Anstieg der Th1-regulierten Entzündung begleitet von nekrotischer Gewebeerstörung und höherer Mortalität (Brunet et al. 1997; Fallon et al. 2000). Dennoch wurde in unserer Studie keine erhöhte Th1-Antwort trotz verminderter Th2-Antwort gemessen. Die Expression von Arg1 in den Lebern aller infizierten Mäuse bestätigte zudem eine adäquate Th2-Antwort. Eine vergleichbar starke Reduktion der Th2-Antwort und somit der Expression der profibrotischen Zytokine IL-4 und IL-13 konnte ebenfalls über die medikamentöse Hemmung der T-Zell-Proliferation über 24-nor-Ursodeoxycholsäure gezeigt werden (Sombetzki et al. 2015). Zudem war in unserer Studie Retnla (resistin-like molecule alpha) ausschließlich in der Gruppe mit weiblicher Vorinfektion signifikant erniedrigt, im Vergleich zu allen weiteren infizierten Gruppen. Es ist bekannt, dass die Ablagerung von *S. mansoni*-Hämозoin-Pigment in den Mauslebern mit der Anwesenheit von Arg1-positiven Makrophagen assoziiert ist, denen insbesondere die Expression von Retnla fehlt (Truscott et al. 2013). Darüber hinaus sind während der Infektion mit *S. mansoni* Foxp3-positive Tregs Schlüsselregulatoren der Immunhomöostase. CTLA4 wird konstitutiv auf Foxp3-positiven Tregs exprimiert und bildet einen weiteren wirksamen Inhibitor der Th2-Antwort durch die Induktion von T-Zell-Anergie und -Toleranz (Taylor et al. 2007). CTLA4 war in dieser Studie signifikant erhöht in der Gruppe mit weiblicher Vorinfektion, während Foxp3 in allen infizierten Gruppen einheitlich exprimiert wurde. Wie schon in früheren Studien gezeigt werden konnte, führt die Blockade von CTLA4 während des akuten Stadiums der *S. mansoni* Infektion zu einer überschießenden Th2-Antwort. Wenn eine CTLA4-Blockade zu einer massiven Th2-Reaktion und gesteigerter Fibrosierung führt, könnte die verstärkte CTLA4-Expression

das Gegenteil bewirken und einen Erklärungsansatz für die reduzierte Fibrosierung in den weiblich vorinfizierten Mäusen liefern.

In der Studie III sollte geklärt werden, ob die oben beschriebene Immunsuppression durch den weiblichen Wurm systemische Auswirkungen hat und die Abwehr von Zerkarien in der Haut beeinflusst (Sombetzki et al. 2018). Oder ob sich die gezeigte Immunsuppression nur auf die Ei-induzierte Fibrosierung in der Leber beschränkt. Die angeborene Immunantwort in der Haut hat einen wichtigen Einfluss auf sich entwickelnde Schistosoma-Larven (Mountford und Trottein 2004) und ist erforderlich, um diese Larven bereits beim Eindringen in die Haut zu bekämpfen (Riengrojpitak et al. 1998; Hogg et al. 2003). Mit Hilfe des „Air Pouch“-Modells ist es möglich, die Zellrekrutierung und die Produktion von Chemokinen (RANTES, Eotaxin, Macrophage Inflammatory Protein -1 α /1 β , Monocyte Chemoattractant Protein 1, Chemokine Ligand 2 / 10) und Zytokinen (IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10) nach Injektion eines Entzündungsstimulus zu untersuchen und zu quantifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass Weibchen und Wurmpaare im Gegensatz zu männlichen Würmern (bzw. ohne Vorinfektion) die angeborene Immunantwort in der Haut als Reaktion auf injizierte Zerkarien unterdrücken. Wobei die Vorinfektion mit Weibchen einen signifikant stärkeren Effekt auf die angeborene Immunantwort zeigte, als die Wurmpaare. Dies spiegelt sich in den niedrigeren Konzentrationen von Chemokinen und Zytokinen in den „Air Pouch“-Exsudaten wider und kann wiederum zu einer verringerten chemotaktischen Anlockung von Immunzellen führen. Eine *S. mansoni*-Infektion löst einen anfänglichen Einstrom von Neutrophilen in die Haut aus, gefolgt von Eosinophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen (Incani und McLaren 1984; Hogg et al. 2003). Letzteres kann von infiltrierenden Monozyten abgelöst werden (Yang et al. 2014). Die Anzahl von T-Zellen, B-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen wurde durch Vorinfektion mit männlichen oder weiblichen Schistosomen, Wurmpaaren bzw. ohne Vorinfektion nicht erhöht. Dies schließt aber eine mögliche Beteiligung dieser Zellen nicht unbedingt aus. Die durch die Parasiten ausgelöste Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion tritt typischerweise erst 48 h nach der Exposition gegenüber einem Antigen auf (Lichtenberg et al. 1976), daher ist es durchaus möglich, dass die Reaktions-/Rekrutierungszeit dieser Zellen in die „Air Pouch“ nicht ausreichend war, um eine adäquate T- oder B-Zell-Reaktion zu ermöglichen.

Wie schon in Studie II zeigte sich auch in Studie III ein Anstieg der Expressionsraten von CTLA4 und zusätzlich von IL10 in den Milzen der Mäuse mit weiblicher Vorinfektion im Vergleich zu Mäusen mit männlicher Vorinfektion und nicht vorinfizierten Mäusen. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass Anergie-relevante Mechanismen zeitabhängig sind. Darüber hinaus konnte eine Expression von IL33 und seinem Rezeptor gezeigt werden, welcher als wirksamer Mediator der Immunsuppression bei infektiösen oder sterilen Entzündungen beschrieben wird (Siede et al. 2016; Nascimento et al. 2017).

Die Induktion von Anergie durch *S. mansoni*-Würmer ist bereits bekannt (Smith et al. 2004). Die Neuwertigkeit dieser Studie liegt darin, dass vermutlich hauptsächlich der weibliche Wurm für dieses Phänomen verantwortlich ist. Die starke Induktion der CTLA4 und IL10 Expression in den Milzen der Mäuse, die mit Wurmpaaren vorinfiziert waren, ist höchstwahrscheinlich auf die bereits eingesetzte Ei-Ablage zurückzuführen. Beide Gene spielen eine Rolle bei der granulomatösen Hyporesponsivität (Walsh et al. 2007). Es ist bekannt, dass Parasiteneier die Expression von Anergie-assoziierten Genen induzieren.

Neutrophile und eosinophile Granulozyten können Parasiten abtöten, indem sie Elastase und Wasserstoffperoxid produzieren (Freudenstein-Dan et al. 2003). Die starke Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunabwehr bei mit männlichen Zerkarien vorinfizierten Mäusen sollte demnach zu einer Verringerung der Parasiten- und Eilast führen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Mäuse in einem zweistufigen Infektionsmodell mit männlichen, weiblichen oder männlichen und weiblichen Schistosomen vorinfiziert und nach 6 Wochen erneut beidgeschlechtlich infiziert (Reinfektion). Wie erwartet, wurden die niedrigsten Wurmzahlen und Parasiten-Eier in den Mäusen gemessen, die mit männlichen Zerkarien vorinfiziert waren. Obwohl die Mäuse ohne Vorinfektion eine vergleichbar starke dermale Immunantwort aufwiesen, wie die Mäuse mit männlicher Vorinfektion, kam es hier zu keiner Reduktion der Parasitenlast. Vermutlich liegt es an der fehlenden Möglichkeit protektive IgG1- und IgG2b-Antikörperreaktionen zu entwickeln oder vor der Infektion Makrophagen in die Haut zu rekrutieren. Dennoch hat die Reduktion der Parasitenlast durch männliche Vorinfektion nur eine begrenzte Wirkung auf die Leberfibrose und Granulomgröße. Die Verhältnisse von Leber/Körpergewicht und Milz/Körpergewicht waren vergleichbar in allen infizierten Gruppen. Obwohl im Gewebe eingeschlossene Eier als inflammatorische Stimuli wirken, sind die profibrotischen Interleukine-4 und -13 der Hauptantrieb für die Progression der Leberfibrose. Ab einem bestimmten Infektionsniveau (Eilast in der Leber) wird die Th2-vermittelte Fibrose hochreguliert und schreitet unabhängig von der Eilast fort (Cheever 1997). IL-4 und IL-13 bestimmen das Ausmaß der Fibrosierung (Barron und Wynn 2011). Eine alleinige Verringerung der Parasitenlast zur Behandlung von Leberschäden, insbesondere Leberfibrose, ist somit möglicherweise nicht ausreichend.

Die hier präsentierten Daten und die Daten anderer zeigen, dass sich männliche und weibliche Schistosomen nicht nur morphologisch unterscheiden, sondern auch verschiedene immunologische Antworten im Endwirt auslösen (Moné und Boissier 2004). Da es eher selten zu eingeschlechtlichen Infektionen in der freien Natur kommt, ist dies, evolutionär gesehen, ein geschickter Schachzug, Aufgaben zwischen männlichen und weiblichen Würmern aufzuteilen. Das Ziel jedes Parasiten ist es, möglichst lange im Wirt zu überleben und sich zu reproduzieren. Auf der anderen Seite darf aber der Wirtsorganismus nicht zu sehr geschädigt werden, da der Parasit dann sein Habitat verliert. Die

Immunsuppression, vermittelt durch Helminthen, stellt einen Mechanismus dar, der bekanntermaßen nicht nur das Überleben von Parasiten erleichtert, sondern auch die Chronifizierung von Krankheitsverläufen fördert. Männliche Schistosomen schützen, ernähren und transportieren das Ei-produzierende Weibchen. Sie werden zunächst, mehr oder minder, durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems abgewehrt. Das Weibchen sorgt für eine Parasiten-freundliche Umgebung durch die Abschwächung der Immunabwehr und sichert somit das eigene Überleben und das des Wirtes.

Auf der im März 2013 stattgefundenen internationalen Fachtagung zum Thema „Schistosomiasis Elimination Strategy and Potential Role of a Vaccine in Achieving Global Health Goals“, welche durch das National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) und der Bill & Melinda Gates Foundation gesponsert wurde, wurden drei wesentliche Punkte zusammengefasst, die ein möglicher zukünftiger Impfstoff leisten muss. Es werden daher in Zukunft Impfstoffentwicklungen gefördert, die mindestens eines der folgenden Ziele anvisieren: 1) ein prophylaktisch wirkender Impfstoff der eine präventive oder reduzierende Infektionsrate bewirkt und somit die Übertragung verringert oder/und den Wirt von Parasiten befreit, 2) ein Impfstoff der eine Neuinfektion verhindert oder abschwächt durch die Beeinflussung des weiblichen Wurms (Überleben) oder Hemmung der Eiproduktion und 3) ein therapeutischer Impfstoff der das Krankheitsbild reduziert (passiver Effekt). Optimal wäre aber eine Kombination aus allen drei Eigenschaften (Mo et al. 2014). Angesichts der in dieser Arbeit zusammengefassten Daten wird deutlich, dass männliche und weibliche Würmer ein unterschiedliches Potential für die Impfstoffentwicklung mitbringen. Sollte es gelingen die immunmodulierenden Mechanismen der Würmer zu entschlüsseln, könnte dies Erfolge für alle 3 Ansätze bringen.

6. Zusammenfassung

Die Infektion mit dem intravaskulären Trematoden *Schistosoma spp.* stellt mit über 258 Millionen Infizierten weltweit ein ernsthaftes Gesundheitsproblem dar, vor allem in den Entwicklungsländern. Während einer chronischen *Schistosoma mansoni* Infektion rufen komplexe Immunantworten auf die im Gewebe eingeschlossenen Parasiten-Eier eine granulomatöse Entzündung hervor, die zu ernsthaften Schäden in der Leber und im Darm führen. Eine anschließende fibrotische Narbenbildung und Deformierung/Sklerosierung der intrahepatischen Pfortaderven führt zu portaler Hypertension, Aszites und Ösophagusvarizenblutungen. Das murine Modell der *Schistosoma mansoni* Infektion ist geeignet, die schweren hepatosplenalen Schädigungen der Erkrankung innerhalb einer angemessenen Zeit nachzuweisen. Das Ziel der Studie I war die Implementierung eines makroskopischen Bewertungssystems für Maus-Lebern zur Bestimmung infektionsbedingter Organveränderungen der *S. mansoni* Infektion. Das hier entwickelte makroskopische Bewertungssystem stellt ein wertvolles Werkzeug bei der experimentellen Schistosomiasis dar, um den Schweregrad der hepatosplenalen Schistosomiasis zu bestimmen und die Anzahl der Tiere zu reduzieren. Experimentelle Therapie- und Impferfolge im Mausmodell können in Zukunft leichter bewertet werden.

Eine Immunisierung ist die beste langfristige Strategie zur Kontrolle der Schistosomiasis. Die Schistosomen haben Mechanismen entwickelt, das Immunsystem des Wirtes zu unterdrücken, um ihr eigenes Überleben zu sichern, aber gleichzeitig den Wirt vor infektionsbedingten Organschädigungen der fehlgeleiteten Eier in der Leber zu schützen. Männliche und weibliche Würmer haben diesbezüglich offenbar unterschiedliche Aufgaben. Es ist bekannt, dass männliche Schistosomen, induzierten Immunabwehrmechanismen entgehen können und weibliche Würmer im Blutstrom tragen und ernähren. In Studie II und III konnte erstmals gezeigt werden, dass der weibliche Wurm nicht nur für die Ei-Produktion zuständig ist, sondern durch die Suppression des Immunsystems eine offenbar Parasiten-freundliche Umgebung schafft. Weibliche Schistosomen unterdrücken die Wirts-Immunantwort gegen eindringende Zerkarien in der Haut und verstärken die Expression Anergie-assoziiierter Gene, wie beispielsweise CTLA4. Männliche Schistosomen dagegen lösen eine starke Immunreaktion aus, die letztendlich zu einer Verringerung der Wurm- und Eilast führt. Die Daten legen nahe, dass der weibliche Wurm ein vernachlässigter Faktor bei der Regulation der Immunantwort des Wirts ist und daher ein vielversprechendes Ziel für neue immunmodulatorische Therapien darstellt. Daher wird Bestandteil zukünftiger Arbeiten der Arbeitsgruppe die Aufklärung der immunmodulierenden Mechanismen der männlichen und weiblichen Würmer sein um neue Impfstoff- und Therapieansätze zu schaffen.

7. Literaturverzeichnis

- Attallah, A. M.; Smith, A. H.; Murrell, K. D.; Fleischer, T.; Woody, J.; Vannier, W. E. et al. (1979): Characterization of the immunosuppressive state during *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 122 (4), S. 1413–1420.
- Baki, C. A.; Grimaud, J. A. (1985): Unisexual murine schistosomiasis: portal hepatitis in subacute infections. *Experientia* 41 (11), S. 1423–1426.
- Baki, C. A.; Guerret, S.; Grimaud, J. A.; Chevallier, M. (1998): Liver fibrosis in unisexual murine Schistosomiasis: quantitative study and morphological changes in mice with chronic infection. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 44 (4), S. 627–633.
- Barron, L.; Wynn, T. A. (2011): Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *European Journal of Immunology* 41 (9), S. 2509–2514.
- Bickle, Q.; Bain, J.; McGregor, A.; Doenhoff, M. (1979): Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse: III. The failure of primary infections with cercariae of one sex to induce resistance to reinfection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (1), S. 37–41.
- Bickle, Q. D. (1982): Studies on the relationship between the survival of *Schistosoma mansoni* larvae in mice and the degree of resistance produced. *Parasitology* 84 (1), S. 111–122.
- Boissier, J.; Moné, H. (2000): Experimental observations on the sex ratio of adult *Schistosoma mansoni*, with comments on the natural male bias. *Parasitology* 121 (Pt 4), S. 379–383.
- Boissier, J.; Durand, P.; Moné, H. (2001): PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial populations. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112 (1), S. 139–141.
- Boissier, J.; Moné, H. (2001): Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology* 31 (4), S. 352–358.
- Boissier, J.; Chlichlia, K.; Digon, Y.; Ruppel, A.; Moné, H. (2003a): Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 91 (2), S. 144–150.
- Boissier, J.; Rivera, E. R.; Moné, H. (2003b): Altered behavior of the snail *Biomphalaria glabrata* as a result of infection with *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 89 (3), S. 429–433.
- Boissier, J.; Grech-Angelini, S.; Webster, B. L.; Allienne, J. F.; Huyse, T.; Mas-Coma, S. et al. (2016): Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases* 16 (8), S. 971–979.
- Braschi, S.; Wilson, R. A. (2006): Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 5 (2), S. 347–356.
- Brunet, L. R.; Dunne, D. W.; Pearce, E. J. (1998): Cytokine Interaction and Immune Responses during *Schistosoma mansoni* Infection. *Parasitology Today (Personal ed.)* 14 (10), S. 422–427.
- Brunet, L. R.; Finkelman, F. D.; Cheever, A. W.; Kopf, M. A.; Pearce, E. J. (1997): IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (2), S. 777–785.

- Castro-Borges, W.; Simpson, D. M.; Dowle, A.; Curwen, R. S.; Thomas-Oates, J.; Beynon, R. J.; Wilson, R. A. (2011): Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. *Journal of Proteomics* 74 (9), S. 1519–1533.
- Cheever, A. W. (1969): Quantitative comparison of the intensity of *Schistosoma mansoni* infections in man and experimental animals. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 63 (6), S. 781–795.
- Cheever, A. W. (1997): Differential regulation of granuloma size and hepatic fibrosis in schistosome infections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92 (5), S. 689–692.
- Cheever, A. W.; Lewis, F. A.; Wynn, T. A. (1997): *Schistosoma mansoni*: unisexual infections sensitized mice for granuloma formation around intravenously injected eggs. *Parasitology Research* 83 (1), S. 57–59.
- Chitsulo, L.; Engels, D.; Montresor, A.; Savioli, L. (2000): The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77 (1), S. 41–51.
- Colley, D. G. (2014): Morbidity control of schistosomiasis by mass drug administration: how can we do it best and what will it take to move on to elimination? *Tropical Medicine and Health* 42 (2 Suppl), S. 25–32.
- Colley, D. G.; Bustinduy, A. L.; Secor, W. E.; King, C. H. (2014): Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)* 383 (9936), S. 2253–2264.
- Cutts, L.; Wilson, R. A. (1997): The protein antigens secreted in vivo by adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 114 (Pt 3), S. 245–255.
- Da'dara, A. A.; Siddons, G.; Icaza, M.; Wang, Q.; Skelly, P. J. (2017): How schistosomes alter the human serum proteome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 215, S. 40–46.
- de Oliveira Fraga, L. A.; Torrero, M. N.; Tocheva, A. S.; Mitre, E.; Davies, S. J. (2010): Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. *The Journal of Infectious Diseases* 201 (3), S. 464–472.
- Dean, D. A.; Minard, P.; Stirewalt, M. A.; Vannier, W. E.; Murrell, K. D. (1978): Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of bisexual and unisexual initial infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27 (5), S. 951–956.
- Dunne, D. W.; Pearce, E. J. (1999): Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes and Infection* 1 (7), S. 553–560.
- El Ridi, R. A. F.; Tallima, H. A. (2013): Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. *Journal of Advanced Research* 4 (5), S. 467–478.
- el-Saadany, M. A.; Rawel, H. M.; Raila, J.; el-Dashloty, M. S.; Schweigert, F. J. (2008): Antioxidants modulate the IL-6 induced inhibition of negative acute-phase protein secretion in HepG2 cells. *Cell Biochemistry and Function* 26 (1), S. 95–101.
- Ezeamama, A. E.; Bustinduy, A. L.; Nkwata, A. K.; Martinez, L.; Pabalan, N.; Boivin, M. J.; King, C. H. (2018): Cognitive deficits and educational loss in children with schistosome infection-A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (1), e0005524.
- Fairfax, K.; Nascimento, M.; Huang, S. C.; Everts, B.; Pearce, E. J. (2012): Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in Immunopathology* 34 (6), S. 863–871.

- Fallon, P. G.; Richardson, E. J.; McKenzie, G. J.; McKenzie, A. N. (2000): Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (5), S. 2585–2591.
- Figueiredo, B. C.; Ricci, N. D.; de Assis, N. R.; de Moraes, S. B.; Fonseca, C. T.; Oliveira, S. C. (2015): Kicking in the Guts: Schistosoma mansoni Digestive Tract Proteins are Potential Candidates for Vaccine Development. *Frontiers in Immunology* 6, S. 22.
- Freudenstein-Dan, A.; Gold, D.; Fishelson, Z. (2003): Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing. *The Journal of Parasitology* 89 (6), S. 1129–1135.
- Gasser, R. B.; Morahan, G.; Mitchell, G. F. (1991): Sexing single larval stages of Schistosoma mansoni by polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47 (2), S. 255–258.
- Grevelding, C. G.; Kampkötter, A.; Kunz, W. (1997): Schistosoma mansoni: sexing cercariae by PCR without DNA extraction. *Experimental Parasitology* 85 (1), S. 99–100.
- Gryseels, B.; Polman, K.; Clerinx, J.; Kestens, L. (2006): Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)* 368 (9541), S. 1106–1118.
- Gryseels, B. (2012): Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26 (2), S. 383–397.
- Herbert, D. R.; Hölscher, C.; Mohrs, M.; Arendse, B.; Schwegmann, A.; Radwanska, M. et al. (2004): Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20 (5), S. 623–635.
- Hogg, K. G.; Kumkate, S.; Anderson, S.; Mountford, A. P. (2003): Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to Schistosoma mansoni. *Infection and Immunity* 71 (6), S. 3563–3571.
- Inceni, R. N.; McLaren, D. J. (1984): Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of Schistosoma mansoni. *International Journal for Parasitology* 14 (3), S. 259–276.
- Jacobs, W.; Bogers, J.; Deelder, A.; Wéry, M.; van Marck, E. (1997): Adult Schistosoma mansoni worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation in vivo. Stereological analysis and immunophenotyping of extracellular matrix proteins, adhesion molecules, and chemokines. *The American Journal of Pathology* 150 (6), S. 2033–2045.
- King, C. H. (2009): Toward the elimination of schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine* 360 (2), S. 106–109.
- Kosłowski N., Sombetzki M., Loebermann M., Engelmann R., Grabow N., Österreicher C. H., Trauner M., Mueller-Hilke B., Reisinger E. C. (2017): Single-sex infection with female Schistosoma mansoni cercariae mitigates hepatic fibrosis after secondary infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (5):e0005595.
- Lebens, M.; Sun, J. B.; Czerkinsky, C.; Holmgren, J. (2004): Current status and future prospects for a vaccine against schistosomiasis. *Expert Review of Vaccines* 3 (3), S. 315–328.
- Li, T.; Jahan, A.; Chiang, J. Y. (2006): Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43 (6), S. 1202–1210.

- Lichtenberg, F.; Sher, A.; Gibbons, N.; Doughty, B. L. (1976): Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Pathology* 84 (3), S. 479–500.
- Liu, F.; Hu, W.; Cui, S. J.; Chi, M.; Fang, C. Y.; Wang, Z. Q. et al. (2007): Insight into the host-parasite interplay by proteomic study of host proteins copurified with the human parasite, *Schistosoma japonicum*. *Proteomics* 7 (3), S. 450–462.
- Loebermann, M.; Sombetzki, M.; Langner, C.; Fuchsbichler, A.; Gumhold, J.; Silbert, D. et al. (2009): Imbalance of pro- and antifibrogenic genes and bile duct injury in murine *Schistosoma mansoni* infection-induced liver fibrosis. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH* 14 (11), S. 1418–1425.
- Lundy, S. K.; Lukacs, N. W. (2013): Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in Immunology* 4, S. 39.
- Mahmoud, A. A.; Woodruff, A. W. (1978): The causation of splenomegaly in schistosomiasis in mice. *Clinical Science and Molecular Medicine* 54 (4), S. 397–401.
- Matthews, K. R. (2011): Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. *Science (New York, N.Y.)* 331 (6021), S. 1149–1153.
- Mentink-Kane, M. M.; Cheever, A. W.; Wilson, M. S.; Madala, S. K.; Beers, L. M.; Ramalingam, T. R.; Wynn, T. A. (2011): Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology* 141 (6), S. 2200–2209.
- Mo, A. X.; Agosti, J. M.; Walson, J. L.; Hall, B. F.; Gordon, L. (2014): Schistosomiasis elimination strategies and potential role of a vaccine in achieving global health goals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90 (1), S. 54–60.
- Moloney, N. A.; Hinchcliffe, P.; Webbe, G. (1986): The ability of single sex infections of *Schistosoma japonicum* to induce resistance to reinfection in mice. *Journal of Helminthology* 60 (3), S. 250–254.
- Moné, H.; Boissier, J. (2004): Sexual biology of schistosomes. *Advances in Parasitology* 57, S. 89–189.
- Mountford, A. P.; Coulson, P. S.; Wilson, R. A. (1988): Antigen localization and the induction of resistance in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 97 (Pt 1), S. 11–25.
- Mountford, A. P.; Trottein, F. (2004): Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. *Trends in Parasitology* 20 (5), S. 221–226.
- Nakai, K.; Tanaka, H.; Hanada, K.; Ogata, H.; Suzuki, F.; Kumada, H. et al. (2008): Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Drug Metabolism and Disposition* 36 (9), S. 1786–1793.
- Nascimento, D. C.; Melo, P. H.; Piñeros, A. R.; Ferreira, R. G.; Colón, D. F.; Donate, P. B. et al. (2017): IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nature Communications* 8, S. 14919.
- Nash, T. E. (1978): Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. I. Sensitivity and specificity. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27 (5), S. 939–943.
- Pearce, E. J.; MacDonald, A. S. (2002): The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology* 2 (7), S. 499–511.

- Popiel, I.; Cioli, D.; Erasmus, D. A. (1984): The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *International Journal for Parasitology* 14 (2), S. 183–190.
- Quack, T.; Doenhoff, M.; Kunz, W.; Grevelding, C. G. (1998): *Schistosoma mansoni*: the varying occurrence of repetitive elements in different strains shows sex-specific polymorphisms. *Experimental Parasitology* 89 (2), S. 222–227.
- Regueira, T.; Lepper, P. M.; Brandt, S.; Ochs, M.; Vuda, M.; Takala, J. et al. (2009): Hypoxia inducible factor-1 alpha induction by tumour necrosis factor-alpha, but not by toll-like receptor agonists, modulates cellular respiration in cultured human hepatocytes. *Liver International* 29 (10), S. 1582–1592.
- Ribeiro-Paes, J. T.; Rodrigues, V. (1997): Sex determination and female reproductive development in the genus *Schistosoma*: a review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 39 (6), S. 337–344.
- Riengrojpitak, S.; Anderson, S.; Wilson, R. A. (1998): Induction of immunity to *Schistosoma mansoni*: interaction of schistosomula with accessory leucocytes in murine skin and draining lymph nodes. *Parasitology* 117 (Pt 4), S. 301–309.
- Rowntree, S.; James, C. (1977): Single sex cercariae of *Schistosoma mansoni*, a comparison of male and female infectivity. *Journal of Helminthology* 51 (1), S. 69–70.
- Sandrin, L.; Fourquet, B.; Hasquenoph, J. M.; Yon, S.; Fournier, C.; Mal, F. et al. (2003): Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in Medicine & Biology* 29 (12), S. 1705–1713.
- Sauer, M.: “The use of human hepatocytes for determining liver function and liver regeneration,”. *PCT/EP 2007 (DE/2006 102006005526)*.
- Sauer, M.; Haubner, C.; Mencke, T.; Nöldge-Schomburg, G.; Mitzner, S.; Altrichter, J.; Stange, J. (2012): Impaired cell functions of hepatocytes incubated with plasma of septic patients. *Inflammation Research* 61 (6), S. 609–616.
- Schwartz, C.; Oeser, K.; Prazeres da Costa, C.; Layland, L. E.; Voehringer, D. (2014): T cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193 (7), S. 3590–3599.
- Siede, J.; Fröhlich, A.; Datsi, A.; Hegazy, A. N.; Varga, D. V.; Holecska, V. et al. (2016): IL-33 Receptor-Expressing Regulatory T Cells Are Highly Activated, Th2 Biased and Suppress CD4 T Cell Proliferation through IL-10 and TGFβ Release. *PloS One* 11 (8), e0161507.
- Silva, L. M.; Menezes, R. M.; de Oliveira, S. A.; Andrade, Z. A. (2003): Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (3), S. 335–341.
- Smith, P.; Walsh, C. M.; Mangan, N. E.; Fallon, R. E.; Sayers, J. R.; McKenzie, A. N.; Fallon, P. G. (2004): *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173 (2), S. 1240–1248.
- Sombetzki, M.; Fuchs, C. D.; Fickert, P.; Österreicher, C. H.; Mueller, M.; Claudel, T. et al. (2015): 24-nor-ursodeoxycholic acid ameliorates inflammatory response and liver fibrosis in a murine model of hepatic schistosomiasis. *Journal of Hepatology* 62 (4), S. 871–878.

- Sombetzki M., Koslowski N., Doss S., Loebermann M., Trauner M., Reisinger E. C., Sauer M. (2016): Biosensor for Hepatocellular Injury Corresponds to Experimental Scoring of Hepatosplenic Schistosomiasis in Mice. *BioMed Research International* 2016, S. 1567254.
- Sombetzki M., Koslowski N., Rabes A., Seneberg S., Winkelmann F., Fritzsche C., Loebermann M., Reisinger E. C. (2018): Host Defense Versus Immunosuppression: Unisexual Infection With Male or Female *Schistosoma mansoni* Differentially Impacts the Immune Response Against Invading Cercariae. *Frontiers in Immunology* 9, S. 861.
- Standen, O. D. (1953): The relationship of sex in *Schistosoma mansoni* to migration within the hepatic portal system of experimentally infected mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 47 (2), S. 139–145.
- Stephenson, R.; You, H.; McManus, D. P.; Toth, I. (2014): Schistosome Vaccine Adjuvants in Preclinical and Clinical Research. *Vaccines* 2 (3), S. 654–685.
- Stirewalt, M. A.; Fregeau, W. A. (1968): Effect of selected experimental conditions on penetration and maturation of cercariae of *Schistosoma mansoni* in mice. II. Parasite-related conditions. *Experimental Parasitology* 22 (1), S. 73–95.
- Taylor, M. D.; Harris, A.; Babayan, S. A.; Bain, O.; Culshaw, A.; Allen, J. E.; Maizels, R. M. (2007): CTLA-4 and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (7), S. 4626–4634.
- Tebeje, B. M.; Harvie, M.; You, H.; Loukas, A.; McManus, D. P. (2016): Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites & Vectors* 9 (1), S. 528.
- Truscott, M.; Evans, D. A.; Gunn, M.; Hoffmann, K. F. (2013): *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion. *Infection and Immunity* 81 (1), S. 133–142.
- van Dam, G. J.; Bogitsh, B. J.; van Zeyl, R. J.; Rotmans, J. P.; Deelder, A. M. (1996): *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. *The Journal of Parasitology* 82 (4), S. 557–564.
- Walsh, C. M.; Smith, P.; Fallon, P. G. (2007): Role for CTLA-4 but not CD25⁺ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *Parasite Immunology* 29 (6), S. 293–308.
- Warren, K. S. (1966): The pathogenesis of "clay-pipe stem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. *The American Journal of Pathology* 49 (3), S. 477–489.
- World Health Organization (2015): Schistosomiasis. A major public health problem. <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>.
- World Health Organization (2017): Schistosomiasis Fact sheet Updated October. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.
- Wynn, T. A.; Thompson, R. W.; Cheever, A. W.; Mentink-Kane, M. M. (2004): Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews* 201, S. 156–167.
- Yang, J.; Zhang, L.; Yu, C.; Yang, X. F.; Wang, H. (2014): Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2 (1), S. 1.

Verwendung Icons

https://de.freepik.com/freie-ikonen/maus-schwarzes-tier_727943.htm

https://de.freepik.com/freie-ikonen/spritze_706040.htm

Anhang

Originalarbeiten nach thematischer Reihenfolge sortiert:

Teil-I Publikation

Biosensor for Hepatocellular Injury Corresponds to Experimental Scoring of Hepatosplenic Schistosomiasis in Mice

Teil-II Publikation

Single-sex infection with female Schistosoma mansoni cercariae mitigates hepatic fibrosis after secondary infection

Teil-III Publikation

Host Defense Versus Immunosuppression: Unisexual Infection With Male and Female Schistosoma mansoni Differentially Impacts the Immune Response Against Invading Cercariae

Teil-I Publikation:

*Biosensor for Hepatocellular Injury Corresponds to Experimental
Scoring of Hepatosplenic Schistosomiasis in Mice*

Research Article

Biosensor for Hepatocellular Injury Corresponds to Experimental Scoring of Hepatosplenic Schistosomiasis in Mice

Martina Sombetzki,¹ Nicole Koslowski,¹ Sandra Doss,² Micha Loebermann,¹
 Michael Trauner,³ Emil C. Reisinger,¹ and Martin Sauer⁴

¹Division of Tropical Medicine and Infectious Diseases, Center of Internal Medicine II, University of Rostock, 18057 Rostock, Germany

²Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, 04103 Leipzig, Germany

³Hans Popper Laboratory of Molecular Hepatology, Division of Gastroenterology and Hepatology,
 Department of Internal Medicine III, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

⁴Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Medical Faculty of the University of Rostock, 18057 Rostock, Germany

Correspondence should be addressed to Emil C. Reisinger; emil.reisinger@uni-rostock.de

Received 5 January 2016; Accepted 17 May 2016

Academic Editor: Laura Rinaldi

Copyright © 2016 Martina Sombetzki et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Severe hepatosplenic injury of mansonian schistosomiasis is caused by Th2 mediated granulomatous response against parasite eggs entrapped within the periportal tissue. Subsequent fibrotic scarring and deformation/sclerosing of intrahepatic portal veins lead to portal hypertension, ascites, and oesophageal varices. The murine model of *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) infection is suitable to establish the severe hepatosplenic injury of disease within a reasonable time scale for the development of novel antifibrotic or anti-infective strategies against *S. mansoni* infection. The drawback of the murine model is that the material prepared for complex analysis of egg burden, granuloma size, hepatic inflammation, and fibrosis is limited due to small amounts of liver tissue and blood samples. The objective of our study was the implementation of a macroscopic scoring system for mice livers to determine infection-related organ alterations of *S. mansoni* infection. In addition, an *in vitro* biosensor system based on the detection of hepatocellular injury in HepG2/C3A cells following incubation with serum of moderately (50 *S. mansoni* cercariae) and heavily (100 *S. mansoni* cercariae) infected mice affirmed the value of our scoring system. Therefore, our score represents a valuable tool in experimental schistosomiasis to assess severity of hepatosplenic schistosomiasis and reduce animal numbers by saving precious tissue samples.

1. Introduction

In the host adult *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) worms are found within the mesenteric blood vessels around the sigmoid colon and the rectum, where the oviposition takes places [1]. Schistosomal eggs induce a strong antibody response against soluble egg antigens that corresponds to a type 4 hypersensitivity reaction mediated by T-helper 2 (Th2) cells and alternatively activated macrophages. Via bloodstream the lateral-spined eggs get into the liver and become entrapped within the periportal tissue [2]. Th2 response directs periportal inflammation towards fibrous scarring with subsequent deformation and sclerosing of the intrahepatic portal veins whereby the arterial and ductular structures remain largely unaffected [3]. Fibrotic septa sprout from

the periportal area into the parenchyma, while the acinar architecture is preserved. Due to high infection rates or repeated infections periportal (Symmers' pipestem) fibrosis [4] occurs as mild chronic granulomatous hepatitis or advanced hepatosplenic manifestations with massive fibrosis, splenomegaly, portal hypertension, ascites, and esophageal varices.

By virtue of intact liver function serum biochemistry is inconspicuous. During the acute stage of disease (Katayama syndrome) eosinophilia and a slight increase of alanine aminotransferase (ALT) can be seen. Later in the chronic stage of disease aminotransferase levels are often within the normal ranges and alkaline phosphatase might be slightly elevated.

Apart from discrepancies regarding susceptibility for infection between mice and man [5], immunological reactions to parasite eggs run similarly in terms of involved cells types and regulating cytokines, granuloma formation, disease progression, and clinical symptoms [6]. In man, disease progression towards advanced hepatosplenic schistosomiasis depends on the age, gender, infection rates, and duration of infection [7]. The mouse model is suitable to establish severe hepatosplenic manifestations within eight weeks by infection with low numbers of worms [3]. Therefore the murine model is used to study the complex immune reactions to egg and worm antigens within a reasonable time scale and to develop novel antifibrotic or anti-infective strategies against *Schistosoma* infections [8]. However, complex analysis of egg burden, granuloma size, hepatic inflammation, and fibrosis is limited due to small amounts of liver tissues and blood samples. Therefore usually large numbers of animals are needed, in order to address scientific issues adequately.

The objective of our study was the implementation of a macroscopic scoring system determining infection-related organ alterations as markers of disease severity in mice infected with *S. mansoni*. An *in vitro* biosensor system detecting hepatocellular injury in HepG2/C3A cells affirmed our scoring system.

2. Material and Methods

2.1. *Schistosoma mansoni* Mouse Model. *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*, Brazilian strain) was held in a life cycle with *Biomphalaria glabrata* fresh water snails (*B. glabrata*, Brazilian strain) as intermediate hosts and female NMRI mice as definite hosts. Mice were kept with a 12:12 hour light/dark cycle, standard mouse chow (SSNIF, Soest, Netherlands), and water *ad libitum*. *B. glabrata* were kept in aquarium water at 25°C and a lettuce diet. Cercariae were obtained by mass shedding after light exposure and the number of cercariae/mL was determined using a conventional light microscope (magnification 100-fold). To generate pathologies of different severities, 6- to 8-week-old NMRI mice were infected with either 50 *S. mansoni* cercariae ($n = 9$) for a moderate infection or 100 *S. mansoni* cercariae ($n = 9$) for a heavy infection. Mice were exposed to *S. mansoni* cercariae by sitting in a water bath, except the healthy control-group ($n = 5$). Twelve weeks after infection mice were sacrificed via cervical dislocation under Ketamine/Xylazine anesthesia. Collection of sterile plasma for biosensor testing was performed by immediate retrobulbar exsanguination using lithium/heparin blood collection tubes (Sarstedt, Hannover, Germany). Within the experimental groups plasma samples were pooled and frozen at -80°C. The experiments were performed according to the German animal protection law and approved by the local animal care and use committee (file number 7221.3-2.5-003/10).

2.2. Serum Biochemistry and Liver Histology. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AP), and bilirubin were measured in serum with the UniCel® Dx C 800 Synchron® Clinical System (Beckman Coulter GmbH).

TABLE 1: Description of the macroscopic score.

Parameter	Modality	Score level
Spleen weight	<0,1 g (healthy)	–
	>0,11 g	+
	>0,4 g	++
Liver weight	<1,2 g (healthy)	–
	>1,21 g	+
	>2 g	++
Color	Red/glossy	–
	Dark red/fade	+
	Greyish/pale	++
Nodules	None	–
	Occasional	+
	Area-wide	++
External surface	Regular	–
	Furrows/bosselation	+
	Macronodular	++
Consistency	Soft/elastic	–
	Firm	+
	Rigid	++

One-half of the right liver lobe was fixed in 10% neutral buffered formalin solution (Sigma Aldrich, Germany) and embedded in paraffin. Five μ m thin sections were stained with either hematoxylin/eosin (HE) or Sirius red (SR).

2.3. Macroscopic Evaluation of Liver Injury. Twelve weeks after infection, liver and spleen weights were determined and the extent of liver damage was assessed macroscopically by using a minus (–)/plus (+) scoring system: (–) unobtrusive for the evaluated parameter and (+) obtrusive for the evaluated parameter. The score ranges from 1– = healthy to 12+ = heavily affected by *S. mansoni* infection. The scoring system determines the extent of liver damage and considers infection-related organ alterations as color, stiffness, and prevalence of nodules compared to naive livers (Table 1).

2.4. Human Hepatocyte Based Biosensor. Two mL heparinized plasma was drawn from all three experimental groups for testing with the *in vitro* hepatotoxicity test [9, 10]. To determine the toxicity of animal plasma the human hepatocytes cell line HepG2/C3A obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-10741) was used. The cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's Medium (Dulbecco's MEM, GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Germany). HepG2/C3A cells were seeded in 24-well cell culture plates in a density of 250.000 cells/well; then the cells were cultured for three days with 0.5 mL heparinized plasma from each animal. Subsequently, cells were rinsed once with Dulbecco's MEM and incubated with 1 mL fresh Dulbecco's MEM for three days. Cells, respectively, supernatants, were tested for viability using the XTT test (dehydrogenase activity in the mitochondria) and measurement of cell count was indicated with the trypan blue-staining. The XTT test was carried out according to the protocol of Scudiero et al. [11].

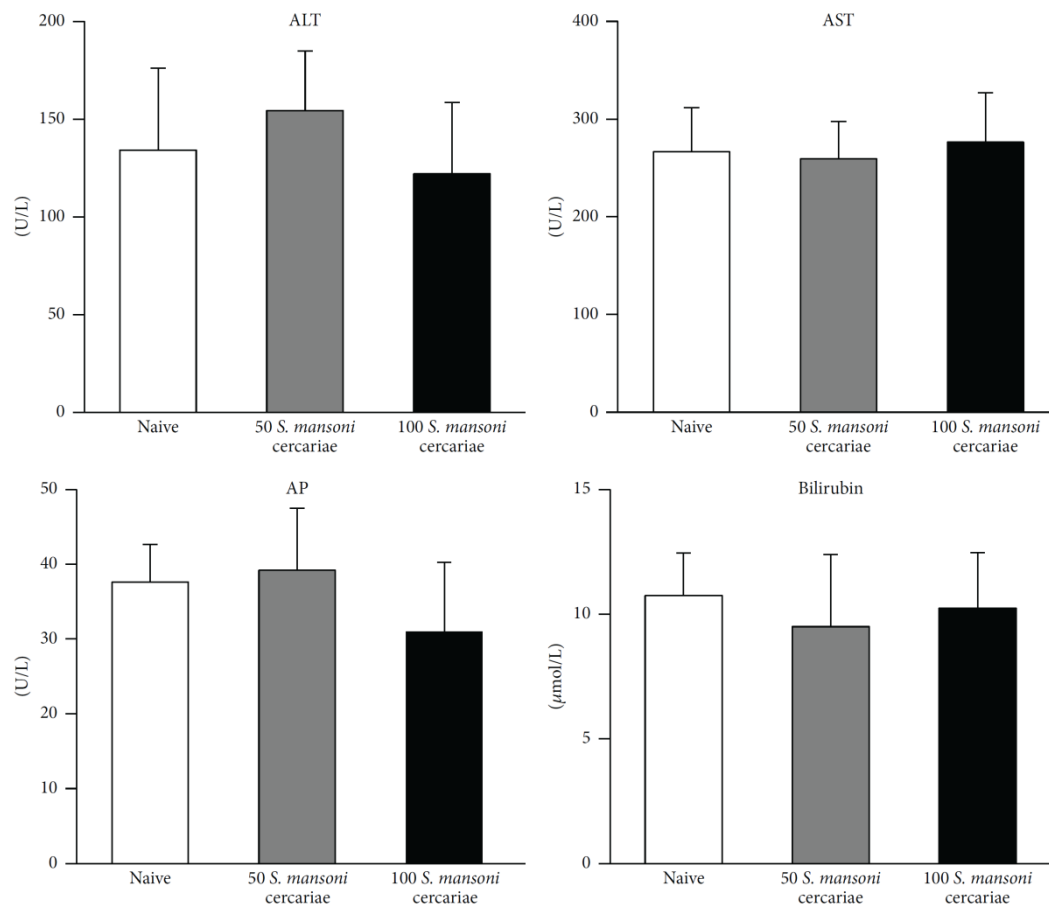


FIGURE 1: Serum biochemistry of mice infected with 50 or 100 *S. mansoni* cercariae. Serum biochemical markers of hepatocellular injury (ALT and AST) and cholestasis (AP and bilirubin) remain unchanged in mice infected with 50 or 100 *S. mansoni* cercariae compared to naive control mice.

Additionally, the release of lactate dehydrogenase (LDH) into the cell culture supernatants was measured. Each test batch with plasma from one group was tested in four experiments ($n = 4$), Dulbecco's MEM control was used and each measurement was performed twice.

2.5. Statistical Analysis. Significance between the groups was analyzed with the Kruskal-Wallis one way and the two-tailed Mann-Whitney *U*-test, using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). The results are expressed as median and range. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Serum Biochemistry. Serum levels of ALT, AST, AP, and bilirubin were not increased by the different *S. mansoni* infection intensities compared to the naive control (Figure 1).

3.2. Scoring System. *S. mansoni* infection resulted in significant increase of liver and spleen weights compared to healthy control mice (Figure 2(a)). The different infection intensities were reflected by marked differences in the macroscopic appearance of infected mice livers in mice infected with 100 *S. mansoni* cercariae (Figure 2(b)). Livers of these mice appeared greyish and pale; bosselations of the capsule with star-like depression and wide spread nodules were clearly visible. A semiquantitative evaluation of the infection-related organ alteration was performed according to the scoring system described in Table 1. The highest score levels with a mean of 10 ± 0.1 were found in mice infected with 100 *S. mansoni* cercariae compared to mice infected with 50 *S. mansoni* cercariae and score levels of 7 ± 1.9 (Figure 2(c)).

3.3. Microscopic Appearance. Histological survey staining (HE, magnification 2.5-fold) of mice livers revealed clearly visible hepatic granulomas within enlarged portal spaces.

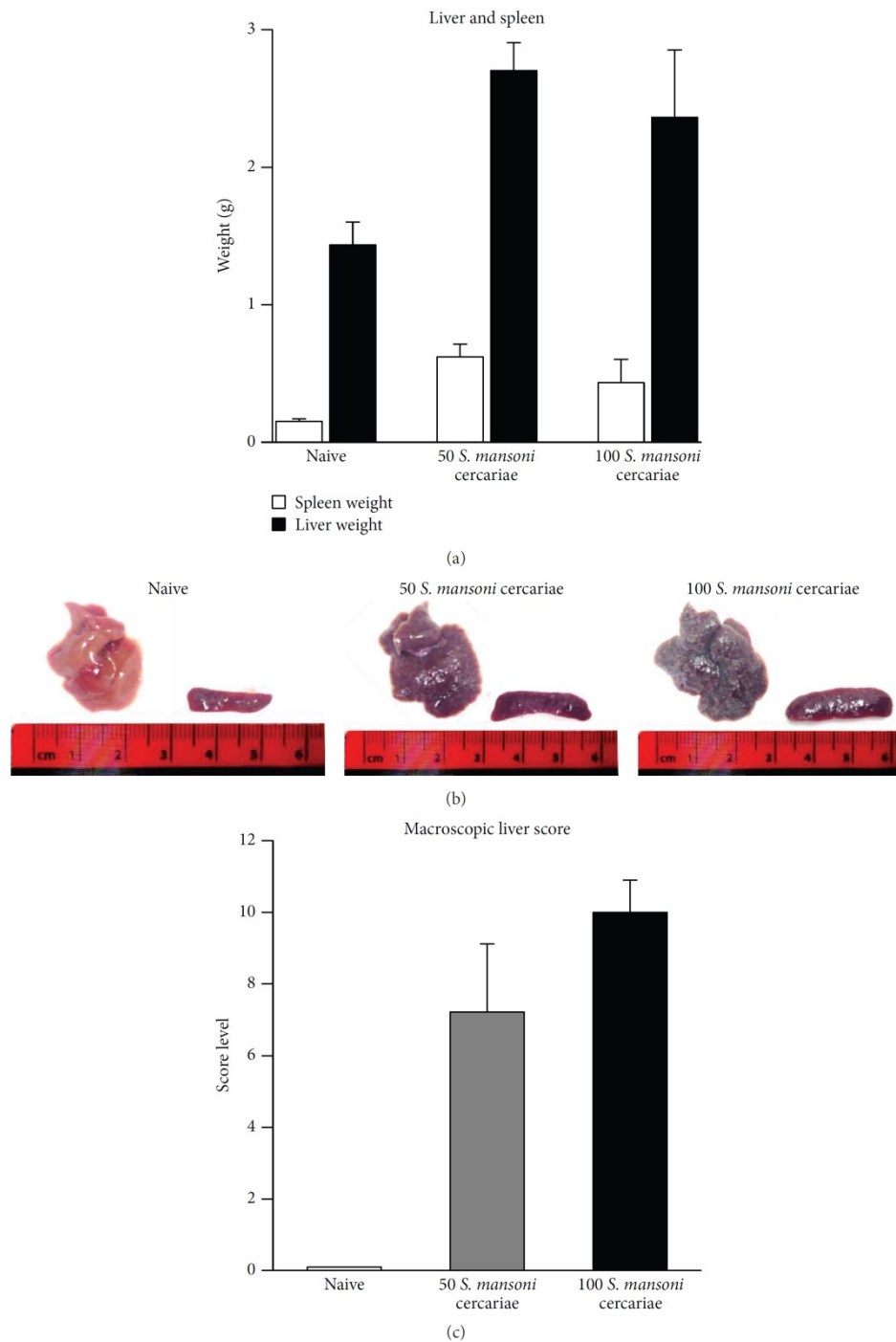


FIGURE 2: Pathological changes of the liver due to different *S. mansoni* infection intensities. (a) Weights of spleens and livers of infected mice groups are significantly increased compared to naive mice. Infection with 50 or 100 cercariae results in a comparable increase of spleen and liver weights. (b) The outer appearance of mice livers following infection with 50 or 100 cercariae is markedly different. Compared to the livers of naive and mice infected with 50 cercariae, the livers of mice infected with 100 cercariae appear firmer and paler with area-wide nodules, bosselations, and star-like depressions. (c) Scoring of parameters describing the outer appearance of all mice livers reveals highest score levels in mice infected with 100 cercariae compared to livers of naive mice and mice infected with 50 cercariae.

TABLE 2: Biosensor results (median and range).

	Naive (<i>n</i> = 4)	50 cercariae (<i>n</i> = 4)	100 cercariae (<i>n</i> = 4)	Medium-control (<i>n</i> = 4)
Number of cells (×1.000)	833 (825–840)	610 (575–645)	560 (545–575)	1111 (535–1.355)
Vitality (%)	95.2 (93.3–97.1)	82.8 (80.6–84.9)	73.8 (64.4–83.2)	94.9 (91.1–97.3)
XTT (extinction/well)	1.48 (1.25–2.37)	0.92 (0.84–1.00)*	0.84 (0.51–0.90)*	2.13 (1.72–3.27)*
Release of LDH (U/L)	135 (134–136)	145 (139–150)*	157 (152–161)*	113 (110–123)

* $p \leq 0.05$ versus naive; LDH: lactate dehydrogenase.

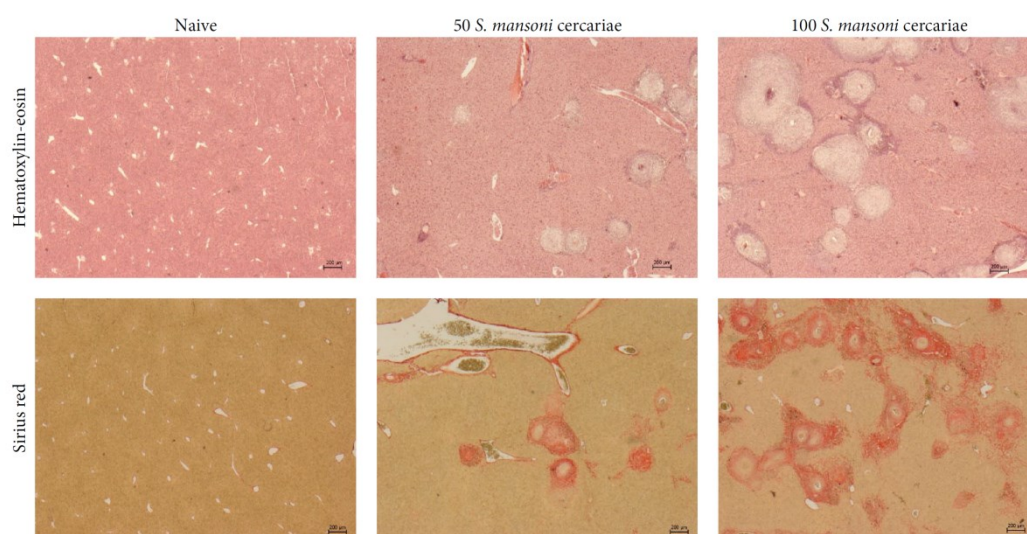


FIGURE 3: Liver histology of mice infected with 50 or 100 cercariae. Representative images of mice livers (HE, 2.5-fold magnification and SR, 2.5-fold magnification): uninfected mice (naive), mice infected with 50 cercariae (50 cercariae), and mice infected with 100 cercariae (100 cercariae). Livers of mice infected with 100 cercariae have considerably more periocular granulomas compared to the other mice. Higher infection rates result in tortuous vascularization of the portal area and pronounced portoportal bridging with markedly sclerosed hepatic veins.

Livers of mice infected with 100 *S. mansoni* cercariae displayed tortuous vascularization of the portal area with replaced blood vessels. Infiltration with inflammatory cells as macrophages/monocytes, granulocytes, and T-lymphocytes was not restricted to periocular regions but to blood vessels and was sporadically found within the parenchymal interface. The amount of hepatic granulomas was conspicuous higher following infection with 100 compared to 50 *S. mansoni* cercariae. Sirius red positive area was mostly distributed in livers of mice infected with 100 *S. mansoni* cercariae. Livers of these mice displayed pronounced portoportal bridging and markedly sclerosed hepatic veins. In animals infected with 50 *S. mansoni* cercariae connective tissue was restricted to periocular areas with dense connective tissue fibers spread into the parenchymal interface (Figure 3).

3.4. Biosensor of Hepatocellular Injury. The results of testing the toxicity of the animal plasma from the three experimental groups using human hepatocytes are displayed in Table 2. A markedly impairment of viability was only seen in the infected groups; however, the impairment of viability was

more pronounced in the 100 cercariae group compared with the 50 cercariae group. The plasma of the animals from the control-group led to a slightly decrease of the number of cells and extinction in the XTT test and higher values of LDH in cell culture supernatants compared with the medium-control.

4. Discussion

Murine models of *S. mansoni* infection were used to imitate human disease patterns and remain indispensable for antischistosomal drug development. The presented experimental scoring system specifically pays attention to infection-related organ alterations resembling severity of disease. It comprises the evaluation of liver characteristics, which were commonly used for the assessment of hepatic fibrosis and related morbidity in humans such as liver stiffness, presence of nodules, and surface condition [12–14]. The different pathologies and therefore the usability of the score were proven by an *in vitro* biosensor system based on the detection of hepatocellular injury in HepG2/C3A cells.

Infection with fifty to hundred *S. mansoni* cercariae represents the usual amount of cercariae used for experimental schistosomiasis [3, 8, 15]. The presented score describes specific organ alterations following infection with either 50 or 100 *S. mansoni* cercariae, resembling moderate and heavy infections under experimental conditions. Both infection intensities are incomparable to human infection, since the heaviest infection found in man at autopsy rarely exceeded five worm-pairs per kilogram of body weight [16]. Experimental schistosomiasis is performed with considerably higher numbers of cercariae to provoke severe clinical patterns within a reasonable time scale.

Diagnostic methods in human as transient elastography (FibroScan) or magnetic resonance elastography are used to analyze liver stiffness, occurrence of nodules, or surface conditions to grade hepatic fibrosis and to assess morbidity. In mice these clinical changes have not attracted scientific interest so far. Common approaches to quantify hepatic fibrosis in mice are based on determination of hepatic hydroxyproline content, histological collagen staining, or measurement of profibrotic gene expression [8, 17]. Examining egg secretion in feces or detection of soluble egg antigen in serum seldom reflects real infection burden or organ alterations [18]. Moreover, determination of whole egg or worm numbers in mice livers requires processing of the whole liver but does not reflect the extent of liver damage.

To distinguish between moderate (50 cercariae) and heavy (100 cercariae) *S. mansoni* infection we performed a cell based analysis of hepatotoxicity in the HepG2/C3A hepatocyte cell line [9, 10]. The incubation with plasma of the three experimental groups (naive, 50 cercariae, and 100 cercariae) led to a significant impairment of cell viability in the infected groups only. According to the histological score, the impairment of test cells was more pronounced in the mice infected with 100 *S. mansoni* cercariae than in the mice infected with 50 *S. mansoni* cercariae. This might result from different levels of chemokines and cytokines in the plasma of the infected animals. In chronic schistosomiasis the degree of hepatic fibrosis correlates with serum levels of interleukin 13 and interleukin 4 [19, 20]. It is debatable to which extent proinflammatory cytokines are involved in the impairment of cell functions and viability in HepG2/C3A cells, since in chronic schistosomiasis Th1 response is suppressed by Th2 cytokines [21]. However, proinflammatory cytokines are known to affect cell viability by causing dysfunction of mitochondria [22], downregulating albumin synthesis [23], and diminishing function of P450 cytochromes like cytochrome P450-1A2, cytochrome P450-2E1, and cytochrome P450-7A1 [24, 25].

So far, this test system was tested in a prospective clinical study addressing hepatotoxicity of plasma from septic and nonseptic patients [9]. We found that the plasma of patients with septic shock impaired cellular functions and viability of HepG2/C3A cells. These values of biosensor-parameters were increased only in survivors compared to nonsurvivors in this study. Another clinical study in patients with severe sepsis or septic shock tested the influence of an extracorporeal granulocyte treatment on the biosensor cells. During the extracorporeal treatments a significant increase of vitality and

function of the test cells was seen. These results suggest a positive impact of the extracorporeal granulocyte treatment on the liver cell vitality and function measured in this indirect cytotoxicity test. Against this background and regarding the fact that in schistosomiasis analysis of standard biochemical markers fails to assess severity of disease, it would be prudent to test the HepG2/C3A biosensor in human schistosomiasis.

In conclusion, the presented experimental scoring system displays a useful tool to assess infection-related alterations of the liver indicating severity of hepatosplenic schistosomiasis. Therefore, the score may help to determine effects of therapeutic interventions aiming at hepatic fibrosis or reduction of infection loads. In addition, improved exploitation of scientific information saves precious tissue samples and may reduce numbers of animals for experiments.

Abbreviations

ALT:	Alanine aminotransferase
AP:	Alkaline phosphatase
AST:	Aspartate aminotransferase
<i>B. glabrata</i> :	<i>Biomphalaria glabrata</i>
Th1:	T-helper cell response type 1
Th2:	T-helper cell response type 2
XTT:	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
LDH:	Lactate dehydrogenase.

Competing Interests

The authors declare no financial or commercial competing interests.

Authors' Contributions

Martina Sombetzki, Nicole Koslowski, Emil C. Reisinger, and Martin Sauer conceived and designed the experiments. Martina Sombetzki, Nicole Koslowski, and Martin Sauer performed the experiments. Martina Sombetzki, Nicole Koslowski, Micha Loebermann, and Martin Sauer analyzed the data. Martina Sombetzki, Nicole Koslowski, Emil C. Reisinger, Micha Loebermann, Martin Sauer, and Michael Trauner contributed reagents/materials/analysis tools. Martina Sombetzki, Nicole Koslowski, Emil C. Reisinger, and Martin Sauer wrote the paper.

Acknowledgments

The authors thank the *European Regional Development Fund (EFRE)* and *European Social Fund (ESF)*, Grant no. AU 09 046:ESF/IV-BM-B35-0005/12, for financial support and Heike Potschka (Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig, Germany) for her valuable technical support.

References

- [1] Z. A. Andrade, "Schistosomiasis and liver fibrosis," *Parasite Immunology*, vol. 31, no. 11, pp. 656–663, 2009.
- [2] B. Gryseels, K. Polman, J. Clerinx, and L. Kestens, "Human schistosomiasis," *The Lancet*, vol. 368, no. 9541, pp. 1106–1118, 2006.
- [3] M. Loebermann, M. Sombetzki, C. Langner et al., "Imbalance of pro- and antifibrogenic genes and bile duct injury in murine *Schistosoma mansoni* infection-induced liver fibrosis," *Tropical Medicine & International Health*, vol. 14, no. 11, pp. 1418–1425, 2009.
- [4] W. St. C. Symmers, "Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*," *The Journal of Pathology and Bacteriology*, vol. 9, no. 2, pp. 237–239, 1904.
- [5] R. A. Wilson, X. Li, and W. Castro-Borges, "Do schistosome vaccine trials in mice have an intrinsic flaw that generates spurious protection data?" *Parasites & Vectors*, vol. 9, no. 1, article 89, 2016.
- [6] L. R. Brunet, D. W. Dunne, and E. J. Pearce, "Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection," *Parasitology Today*, vol. 14, no. 10, pp. 422–427, 1998.
- [7] K. Vereecken, C. W. A. Naus, K. Polman et al., "Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*," *Tropical Medicine & International Health*, vol. 12, no. 3, pp. 431–444, 2007.
- [8] M. Sombetzki, C. D. Fuchs, P. Fickert et al., "24-nor-urso-deoxycholic acid ameliorates inflammatory response and liver fibrosis in a murine model of hepatic schistosomiasis," *Journal of Hepatology*, vol. 62, no. 4, pp. 871–878, 2015.
- [9] M. Sauer, "The use of human hepatocytes for determining liver function and liver regeneration," PCT/EP 2007/001047; DE/2006 102006005526.
- [10] M. Sauer, C. Haubner, T. Mencke et al., "Impaired cell functions of hepatocytes incubated with plasma of septic patients," *Inflammation Research*, vol. 61, no. 6, pp. 609–616, 2012.
- [11] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull et al., "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines," *Cancer Research*, vol. 48, no. 17, pp. 4827–4833, 1988.
- [12] K. Kloetzel, "Splenomegaly in schistosomiasis mansoni," *The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene*, vol. 11, pp. 472–476, 1962.
- [13] R. Gerspacher-Lara, R. A. Pinto-Silva, J. C. Serufo, A. A. M. Rayes, S. C. Drummond, and J. R. Lambertucci, "Splenetic Palpation for the Evaluation of Morbidity due to Schistosomiasis Mansoni," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 93, pp. 245–248, 1998.
- [14] J. R. Lambertucci, "Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 47, no. 2, pp. 130–136, 2014.
- [15] A. W. Cheever, "Quantitative comparison of the intensity of *Schistosoma mansoni* infections in man and experimental animals," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 63, no. 6, pp. 781–795, 1969.
- [16] K. S. Warren, "The pathogenesis of 'clay-pipe stem cirrhosis' in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes," *The American Journal of Pathology*, vol. 49, no. 3, pp. 477–489, 1966.
- [17] P. Fickert, M. Wagner, H.-U. Marschall et al., "24-norUrso-deoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice," *Gastroenterology*, vol. 130, no. 2, pp. 465–481, 2006.
- [18] R. A. Abdul-Ghani and A. A. Hassan, "Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies," *Parasitology Research*, vol. 107, no. 1, pp. 1–8, 2010.
- [19] C. Schwartz, K. Oeser, C. P. Da Costa, L. E. Layland, and D. Voehringer, "T cell-derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils," *Journal of Immunology*, vol. 193, no. 7, pp. 3590–3599, 2014.
- [20] M. M. Mentink-Kane, A. W. Cheever, M. S. Wilson et al., "Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Rα2," *Gastroenterology*, vol. 141, no. 6, pp. 2200–2209, 2011.
- [21] D. R. Herbert, C. Hölscher, M. Mohrs et al., "Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology," *Immunity*, vol. 20, no. 5, pp. 623–635, 2004.
- [22] T. Regueira, P. M. Lepper, S. Brandt et al., "Hypoxia inducible factor-1α induction by tumour necrosis factor-α, but not by toll-like receptor agonists, modulates cellular respiration in cultured human hepatocytes," *Liver International*, vol. 29, no. 10, pp. 1582–1592, 2009.
- [23] M. A. El-Saadany, H. M. Rawel, J. Raila, M. S. El-Dashloty, and F. J. Schweigert, "Antioxidants modulate the IL-6 induced inhibition of negative acute-phase protein secretion in HepG2 cells," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 26, no. 1, pp. 95–101, 2008.
- [24] K. Nakai, H. Tanaka, K. Hanada et al., "Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients," *Drug Metabolism & Disposition*, vol. 36, no. 9, pp. 1786–1793, 2008.
- [25] T. Li, A. Jahan, and J. Y. L. Chiang, "Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7α-hydroxylase gene via the JNK/c-Jun pathway in human liver cells," *Hepatology*, vol. 43, no. 6, pp. 1202–1210, 2006.

Teil-II Publikation:

*Single-sex infection with female Schistosoma mansoni cercariae
mitigates hepatic fibrosis after secondary infection*

Author summary

Schistosomiasis remains a major cause of morbidity and mortality, and in the tropics and subtropics in particular, infection rates are high. The efficacy of anthelmintic therapy is limited since it has no effect on immature parasite stages and does not prevent re-infection. The root cause of disease is a granulomatous hypersensitivity reaction to parasite eggs entrapped within the intestinal wall and small liver sinusoids. This reaction is mainly caused by CD4⁺ T cells of the subtype 2 and alternatively activated macrophages. As a repair response it suppresses inflammation but results in hepatic fibrosis (e.g. Symmer's pipe stem fibrosis), portal hypertension and its clinical sequelae, ascites and esophageal varices. We demonstrated herein that a primary infection with female *S. mansoni* cercariae leads to the suppression of TH2-mediated granuloma size, hepatic fibrosis and disease progression in bisexually challenged mice. This protection is associated with Retnla- and Ctl4-mediated TH2 suppression but not with a reduction in parasite load. Our findings provide evidence that protection against egg-induced granulomatous hyperreactivity is achievable by exploiting gender-specific differences between schistosomes.

Introduction

The blood flukes of the genus *Schistosoma* spp. are among the world's most prevalent human helminthic parasites. According to the WHO over 258 million people are currently receiving preventive therapy, mostly to avoid severe long-term liver damage [1]. During their life-span of up to 15 years, schistosomes produce a myriad of tissue-damaging eggs [2]. Entrapped within the intestinal wall and small liver sinusoids they provoke an inflammatory, granulomatous reaction that is mainly caused by CD4⁺ T cells of the subtype 2 and alternatively activated macrophages [3]. This repair response suppresses initial TH1 inflammation but results in hepatic fibrosis (e.g. Symmer's pipe stem fibrosis), portal hypertension and its clinical sequelae, ascites and esophageal varices [4].

S. mansoni infection triggers a transient T-helper-1 (TH1) cell reaction mediated by proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-12, and iNOS. Following the onset of egg production, the inflammatory TH1-response shifts towards a profibrotic TH2-response mediated by IL-4 and IL-13 [5–7]. However, this TH1/TH2 dogma is not as stringent as formerly supposed, since it has been shown that isolated *S. mansoni* eggs and soluble egg antigens suffice to induce a TH2-response in mice [7–9]. Moreover, the discovery of IL-4-responsive macrophages before the onset of egg production indicates the presence of a TH2-dominant milieu from early on [10].

Loss of worm integrity leads to a strong release of antigens and thus results in a certain resistance to re-infection. This protection can be hastened factitiously by the killing of adult worms with Praziquantel, but also occurs when worms die naturally [11, 12].

A number of studies have looked into the generation of immunity against adult schistosomes using sterile, unisexual infection models. It is known that soluble *S. mansoni* worm antigens (SWA) sensitize mice to granuloma formation, and when injected into the tail vein of naive mice, parasite eggs form perioval granulomas that are smaller in size and which differ in cellular composition to the granulomas found in mice pre-infected with either male or female cercariae [13]. In the studies in question, single-sex infection with male *Schistosoma* cercariae led to pronounced organ changes (increased liver and spleen weight), delayed-type hypersensitivity and higher numbers of peripheral blood cells in mice [14],

whereas single-sex infection with female *Schistosoma* cercariae increased antibody response in baboons [15]. In contrast, cell-mediated immunity was observed in splenocytes isolated from mice infected with both sexes of cercariae compared to single sex infected mice [16]. However, protection after unisexual infection was not achievable when reinfection was performed more than 6 weeks later [17].

These discrepancies led us to revisit the issue of unisexual infection, placing special emphasis on the expression of proinflammatory and profibrotic markers. To this end we designed a two-step *Schistosoma mansoni* infection model measuring TH1/TH2-response, granuloma size and hepatic fibrosis.

Methods

Ethics statement

All experiments were performed according to German animal protection regulations and approved by the local committee on animal care and use (7221.3–1.1-008/13).

Schistosoma mansoni infection

Different stages of *Schistosoma mansoni* (Belo Horizonte strain) were kept using *Biomphalaria glabrata* freshwater snails (*B. glabrata*, Brazilian strain) as intermediate hosts and 6–8 week-old female NMRI mice as definitive hosts, as previously described. In brief, cercariae were obtained by using light exposure to trigger mass shedding, and the number of cercariae/ml was determined using a conventional light microscope (100-fold magnification). Mice were kept on a 12:12 hour light/dark cycle and given standard mouse chow (SSNIFF, Soest, Netherlands) and water *ad libitum*. *B. glabrata* were kept in aquarium water at 25°C on a lettuce diet [18].

Two-step *Schistosoma mansoni* infection model

Separated *B. glabrata* were exposed to single *S. mansoni* miracidia to obtain either female or male cercariae from each snail 6 weeks later [19]. The sex of the cercariae was determined by DNA amplification of sex-related chromosome segments using female-specific W1 and W2 primers and male/female specific Sm23 primers as a positive control (Table 1).

Eleven weeks after the primary infection, mice (groups mf/mf, m/mf and f/mf) were percutaneously infected a second time with 50 *S. mansoni* cercariae of both sexes, and an additional control group (-/mf) infected for the first time. The naive control group was not infected. Blood was sampled for the second time and an assessment of signs of disease progression performed at week 19, when mice were sacrificed via cervical dislocation under ketamine/xylazine anesthesia (Fig 1A).

The experiments were then repeated with an infection dose of 150 *S. mansoni* cercariae to ensure there was a high number of adult worms and eggs in all mouse livers (Fig 1B). In the primary infection step (week 0), mice were percutaneously infected with 100 male and female (mf/mf) *S. mansoni* cercariae, 100 male (m/mf) or 100 female (f/mf) *S. mansoni* cercariae, or not infected (naive control). Blood sampling was performed for the first time at week 8.

Table 1. Primers used to determine male and female *S. mansoni* cercariae[19,20–22].

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Access. No.
W1	5'CAACACAGTGAAATCTTCC 3'	5'GAATTCACCACTCGACATTC 3'	J04665.1
W2	5'TTGCTGATGTGCAGTTTGCC 3'	5'TCTTCCGAGTATGATGCAGG3'	U10109.1
Sm23	5'TGGGTACTGGTATGCGTTGT 3'	5'CAGCATGCAGACGTTTCCT 3'	M34453.1

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.t001>

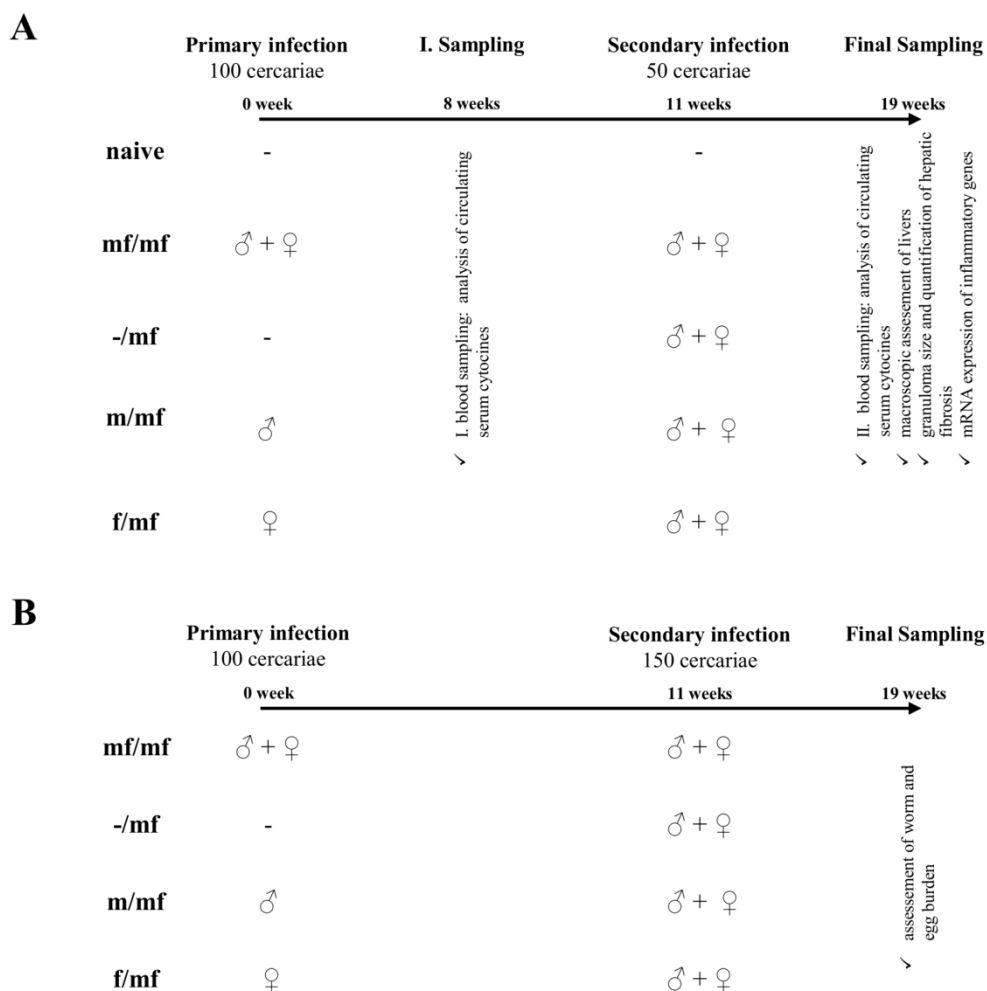


Fig 1. Experimental setup. To evaluate the effect of a primary unisexual *S. mansoni* infection on a bisexual challenge, two independent assessments were performed: **(A)** Assessment of serum cytokines and hepatic damage and **(B)** Determination of worm and egg burden.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g001>

Protein expression analysis using Luminex

Luminex analysis was performed using ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay (eBioscience, Germany) according to the manufacturer's instructions. Serum from all time points was assayed for the murine cytokines IL-4, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF-α and IFN-γ. The samples and standards were measured using Bio-Plex® 200 System.

Evaluation of infection and infection-related organ alterations

At week 8 a SWAP (*S. mansoni* adult worm soluble antigen)-in-house ELISA [23] was performed on all mice to detect immunoglobulin G (IgG) against worms.

To determine infection burden, total egg numbers were assessed by microscopically evaluation (at 100-fold magnification) in defined, weighted liver fractions (squash slides). Adult *S. mansoni* worm pairs were counted using the liver perfusion technique, as described elsewhere [24].

At week 19 the weights of spleens and livers were determined and expressed as ratio of the respective organ to body weight. The extent of liver damage was assessed macroscopically on the basis of infection-related changes in liver color, stiffness and the prevalence of nodules compared to healthy controls.

For histological evaluation one half of the right liver lobe was fixed in 10% neutral buffered formalin solution (Sigma Aldrich, Germany) and embedded in paraffin. Thin sections of 5 μ m were stained with either hematoxylin/eosin (HE) or Sirius red (SR). Granuloma size was determined using ImageJ software (v1.47v; National Institutes of Health, USA).

Quantification of hepatic fibrosis

The extent of hepatic fibrosis was analyzed on the basis of thin sections stained for collagen (Sirius red, SR). The SR-positive areas were assessed using ImageJ software (v1.47v; National Institutes of Health, USA).

RT-PCR for proinflammatory and profibrotic gene expression

Liver specimens were snap-frozen in nitrogen-cooled methylene butane and then stored in liquid nitrogen until RNA analysis. Total RNA was isolated (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Germany) and reversely transcribed into cDNA using High-capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (ThermoFisher, Germany) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR (RT-PCR) was performed in triplicates using the following TaqMan Gene Expression Assays: *Foxp3* Mm00475162; *Ctla4* Mm00486849; *Arg1* Mm00475988; *Retnla* Mm00445109 (ThermoFisher, Germany). The reaction was performed on the 7900HT Fast Real-Time PCR System under the following reaction conditions: thermal cycling conditions were 50°C for 2 minutes followed by 95°C for 10 minutes, 45 cycles at 95°C for 15 seconds, and at 60°C for 1 minute. Gene expression values were normalized to the endogenous reference gene GAPDH (Rodent GAPDH control reagent, ThermoFisher, Germany) and presented as normalized expression values relative to naive controls.

Serum biochemistry

Serum biochemistry for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AP) was performed using UniCel® DxC 800 Synchron® Clinical System (Beckman Coulter GmbH).

Statistics

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Groups were compared using ANOVA (with Tukey post-hoc) and, in the event of non-normality, using the Kruskal-Wallis test (with subsequent Mann-Whitney U-tests, pairwise). Normal distribution was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. $P \leq 0.05$ (Bonferroni-adjusted for multiple testing) was considered to be statistically significant.

Results

Primary infection with female *S. mansoni* cercariae mitigates liver pathology and hepatic fibrosis after secondary infection

At week 19 macroscopic evaluation of the livers of f/mf mice revealed smooth surfaces with no macroscopically visible nodules and a mean weight of 1.28 ± 0.14 g, while the livers of m/mf mice were enlarged (1.34 ± 0.07 g) with rough surfaces and clearly visible nodules. These alterations were even more prominent in group mf/mf, which presented greyish, nodular livers and a mean liver weight of 1.92 ± 0.15 g (Fig 2A). Group f/mf had lower liver and spleen ratios than the other infected groups (Fig 2B). Serum ALT and AST levels were significantly elevated in all infected groups compared to the naive controls, while levels of AP were not (Fig 2C). Parasite load in groups f/mf and m/mf reached comparable levels (hepatic eggs: f/mf 7775 ± 4537

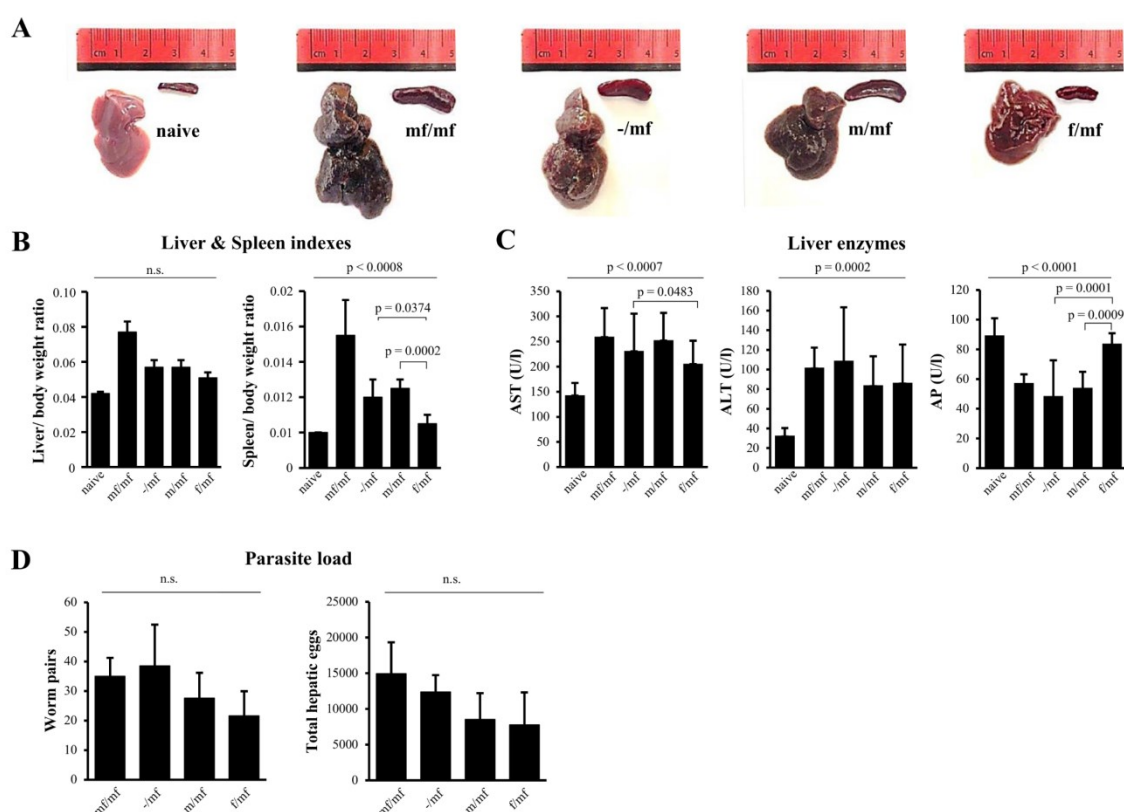


Fig 2. Primary infection with female *S. mansoni* cercariae ameliorates disease progression in bisexually challenged mice. Representative images of mouse livers and spleens are shown: uninfected mice (naive), bisexual infected control (mf/mf), infected bisexual control (-/mf), primary infection with male cercariae (m/mf), primary infection with female cercariae (f/mf). **(A)** Macroscopic assessment of livers and spleens reveals less pronounced organ changes in group f/mf than in mf/mf, -/mf and m/mf. **(B)** Reduction in liver and spleen indexes in group f/mf indicates that a primary infection with female *S. mansoni* cercariae has a beneficial effect on disease progression. Data are presented as mean \pm SD. **(C)** Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) are presented as mean \pm SD. **(D)** Numbers of worm pairs and hepatic eggs are given as mean \pm SD. $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g002>

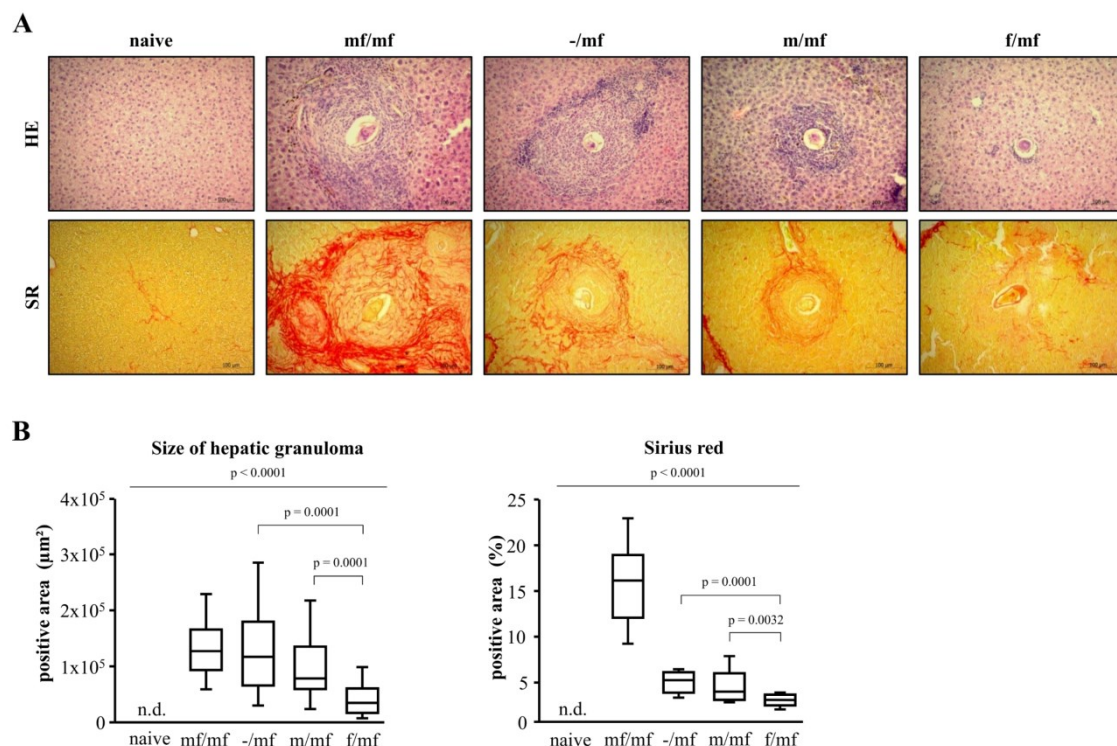


Fig 3. Primary infection with female *S. mansoni* cercariae reduces granuloma size and hepatic fibrosis in bisexually challenged mice. (A) Representative images of hematoxylin/eosin (HE) and Sirius Red (SR)-stained liver slices are shown (original magnification 100-fold): uninfected mice (naive), bisexual infected control (mf/mf), infected bisexual control (-/mf), primary infection with male cercariae (m/mf), primary infection with female cercariae (f/mf). Primary infection with female *S. mansoni* cercariae in group f/mf resulted in smaller peri-oval granulomas and reduced fibrotic peri-portal bridging compared to groups mf/mf, -/mf and m/mf. **(B)** This was quantitatively confirmed by morphometric analysis of granuloma diameter and Sirius Red stained areas. n.d., not detectable. $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g003>

and m/mf 8522 ± 3668 ; worm pairs: f/mf 22 ± 8 and m/mf 28 ± 9 , $p > 0.05$). The highest infection burden was detected in group mf/mf and -/mf (hepatic eggs: mf/mf 14921 ± 4401 and -/mf 12357 ± 2368 ; worm pairs: mf/mf 35 ± 6 and -/mf 39 ± 14 , $p > 0.05$) (Fig 2D).

Hepatic granulomas were detectable in all infected groups (Fig 3A). Primary infection with female *S. mansoni* cercariae (f/mf) led to significantly smaller granulomas than in the other infected groups (Fig 3B). The largest granulomas, accompanied by a pronounced formation of fibrotic septa, were found in group mf/mf. Mice livers from the groups m/mf and -/mf displayed comparable granuloma sizes and early signs of porto-portal bridging. Quantification of Sirius red-positive areas revealed the highest collagen deposition in group mf/mf and significantly less pronounced hepatic fibrosis in group f/mf (Fig 3B).

Single-sex infection alters TH2 response in a gender-specific manner

At week 8, infection was verified using SWAP-ELISA, which detected antibodies against *S. mansoni* worm antigen in all infected groups (Fig 4). TH1-cytokines (TNF- α , IFN- γ ,

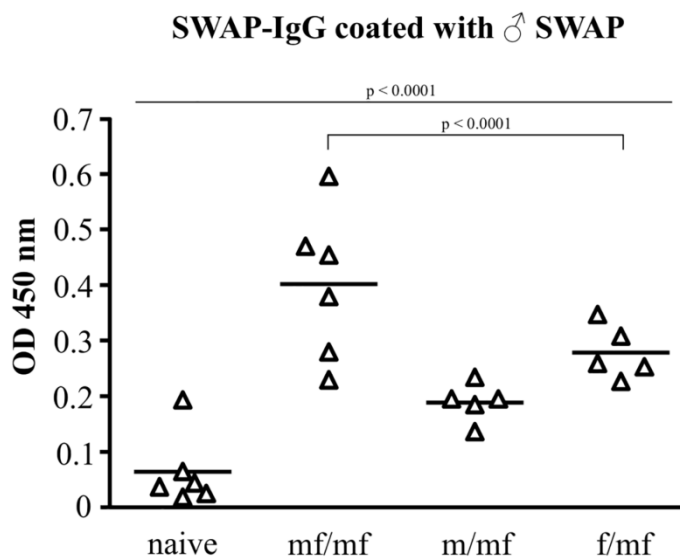


Fig 4. Proof of primary infection at week 8. Comparable antibody levels against male *S. mansoni* worm antigens (SWAP ELISA) confirm infection with 100 male (m/mf), 100 female (f/mf) or 100 male/female (mf/mf) *S. mansoni* cercariae. Naive mice make up the healthy control group. $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g004>

IL-12p70) and TH2-cytokines (IL-4, IL-10, IL-13) were measured 8 weeks after initial infection.

TNF- α and IFN- γ serum levels were significantly higher in groups f/mf, m/mf and mf/mf than in the naive control group, with the highest levels of TNF- α found in group mf/mf (Fig 5A). This indicates a proinflammatory TH1-reaction. IL-4 and IL-13 were solely detectable in group mf/mf (Fig 5B). Levels of IL-10 did not differ between the groups (f/mf, m/mf, mf/mf, naive).

At week 19 the numbers of surviving mice per group were: naive = 6 of 6, f/mf = 5 of 6, m/mf = 5 of 6, mf/mf = 6 of 6 and -/mf = 4 of 6. Groups f/mf, m/mf, mf/mf and -/mf displayed comparable levels of TNF- α and IFN- γ that were higher than those in the naive controls, indicating that a second infection does not influence TH1-response (Fig 6A). Expression of the TH2 cytokines IL-13 and IL-4 was lower in group f/mf than in groups m/mf, mf/mf and -/mf (Fig 6B).

Primary infection with female *S. mansoni* cercariae induces Ctl4 expression in bisexually challenged mice

Arg1 and Retnla mRNA expression was measured in order to detect potential disturbances in TH2 polarization. Arg1 was expressed in all infected groups, with the highest values found in group mf/mf. Retnla expression was significantly lower in groups f/mf and m/mf than in -/mf and mf/mf. Foxp3 expression was measured in order to detect the presence of Foxp3 positive regulatory T-cells (Tregs). Foxp3 expression was highest in group mf/mf, while no differences were found between the other infected groups. Ctl4 expression, which inhibits TH2 response, was higher in group f/mf than in m/mf and -/mf (Fig 7).

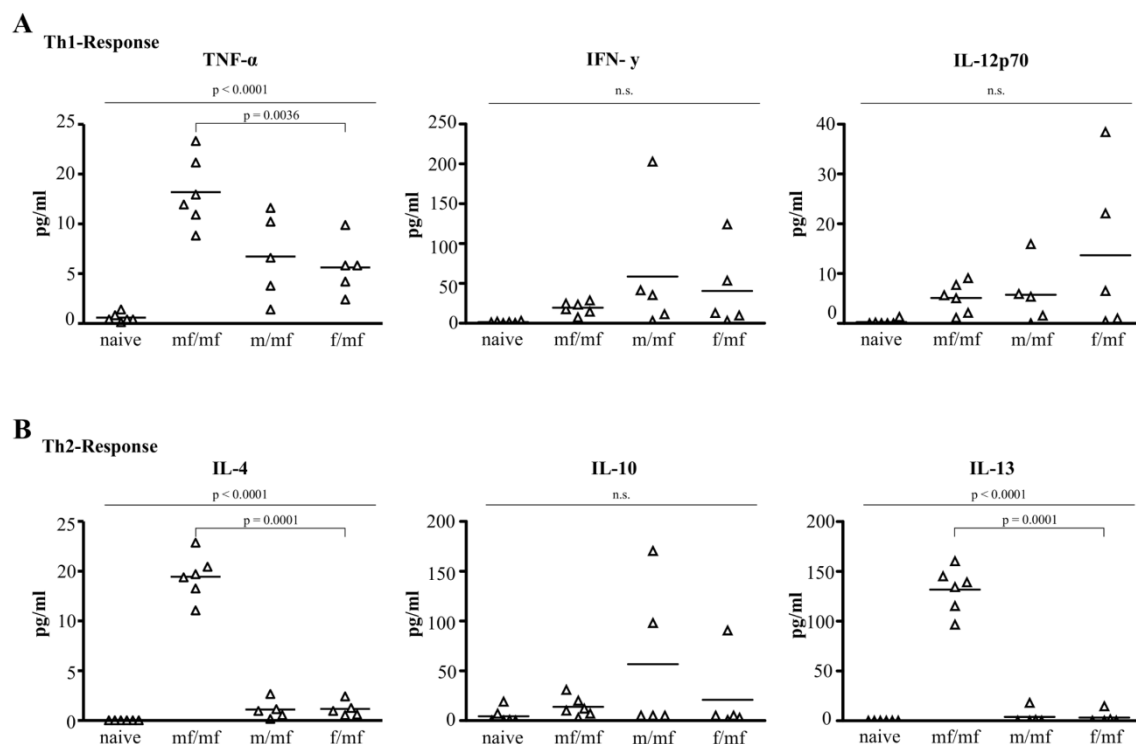


Fig 5. Eight weeks after primary infection, single male and single female schistosomes fail to induce a TH2 response. Standard box plot of circulating cytokine level of (A) TH1 and (B) TH2 in mouse sera analyzed using ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay: uninfected (naive), bisexually infected at both infection time points (mf/mf), bisexually infected at second infection time point (-/mf), primarily infected with male cercariae and bisexually challenged (m/mf), primarily infected with female cercariae and bisexually challenged (f/mf) mice. $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g005>

Discussion

We demonstrated that primary single-sex infection with female but not male *S. mansoni* cercariae decreases granuloma size and hepatic fibrosis, and is accompanied by a Ctl4-mediated suppression of TH2 hyperactivity.

There are two basic options for reducing egg-induced pathology during *Schistosoma* spp. infection: 1) achieve resistance to reinfection, or 2) dampen down granulomatous hyperactivity [4]. The notion that infection with different developmental stages of *Schistosoma* spp. could have an immunizing effect was based on the observation in both human and animal models that recurrent *Schistosoma* spp. infections or repeated Praziquantel treatment lead to the development of resistance to reinfection [15, 25–28]. In our study, a primary infection with male and female or exclusively male or exclusively female cercariae 11 weeks prior to a bisexual challenge did not induce resistance to reinfection, as demonstrated by comparable numbers of worm pairs and hepatic eggs. Previous studies, however, have shown that after a prior bisexual infection with *S. japonicum*, mice become significantly resistant to reinfection within 6 weeks, and that this resistance peaks at 8 weeks [17]. In yet another study, mice

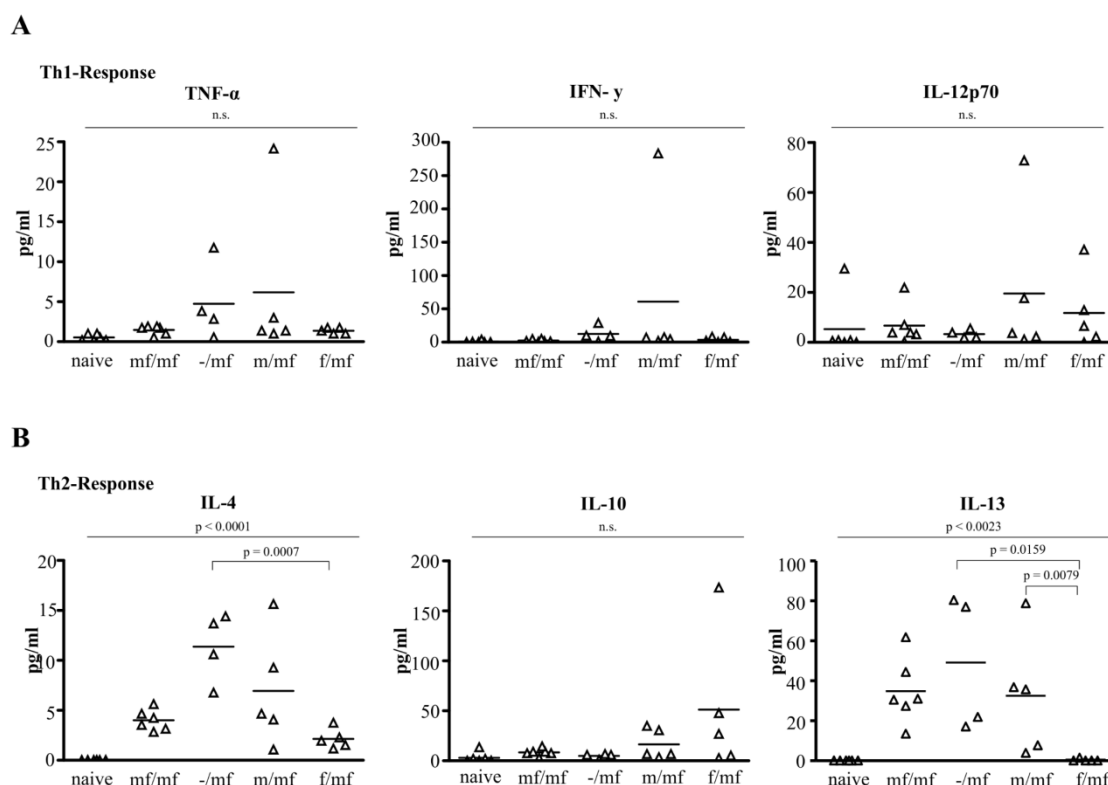


Fig 6. Primary infection with female *S. mansoni* cercariae suppresses TH2 response in bisexually challenged mice. Standard box plot of circulating cytokine level of (A) TH1 and (B) TH2 in mouse sera analyzed using ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay: uninfected (naive), bisexually infected at both infection time points (mf/mf), bisexually infected at second infection time point (-/mf), primarily infected with male cercariae and bisexually challenged (m/mf), primarily infected with female cercariae and bisexually challenged (f/mf) mice. $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g006>

harboring light male infections of the Philippine strain of *S. japonicum* were not resistant when challenged 7 and 10 weeks after infection [29].

In our study, contrary to expectations, slightly higher numbers of worm pairs were detected at week 19 in group -/mf than in the doubly infected group mf/mf. We assume that worms stemming from the first infection (19 weeks) in group mf/mf may be located deeper within the mesenteric veins and could therefore be more difficult to retrieve using liver perfusion techniques. A de facto higher worm load in group mf/mf is most probable since hepatic egg load in this group exceeds numbers compared to the other groups.

Although parasite burden was not influenced by a primary infection, TH2-associated liver damage was significantly less in mice pre-infected with female *S. mansoni* cercariae. Besides displaying smaller hepatic granulomas and less extensive hepatic fibrosis, group f/mf also had the lowest liver and spleen indexes, indicating a slower rate of disease progression.

In contrast to our results, a study from 1997 found no difference between the size of peri-oval granulomas within the lungs of mice subject to prior male single-sex infection and those

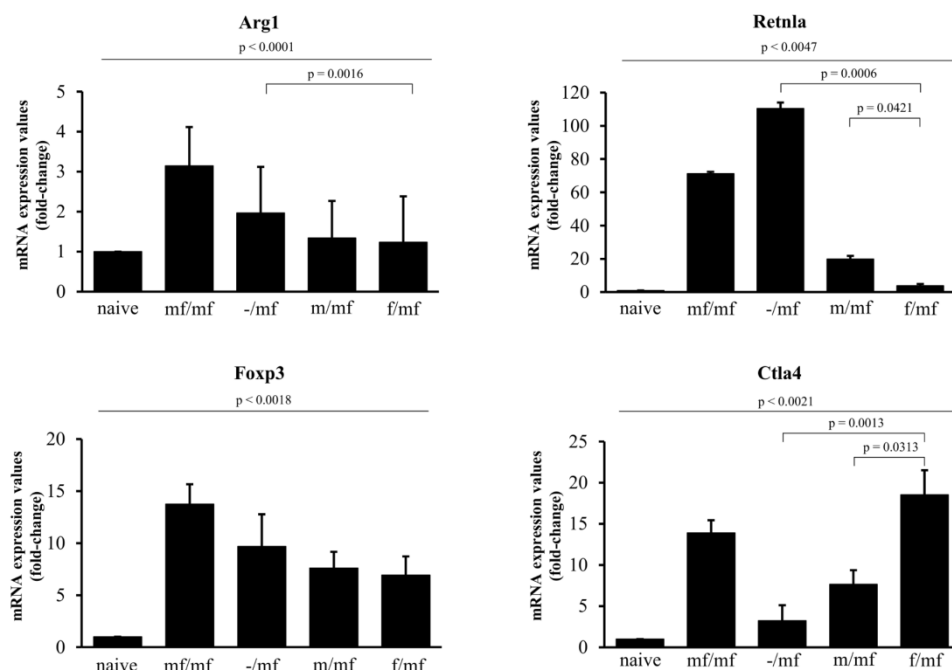


Fig 7. Primary infection with female *S. mansoni* cercariae induces Ctla4 expression in bisexually challenged mice. Gene expression values of Arg1, Retnla, Foxp3 and Ctla4 at week 19 were normalized to the endogenous reference gene GAPDH and presented as relative expression values to the naive control. Values are given as mean \pm SD. $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005595.g007>

in mice subject to prior female single-sex infection when *S. mansoni* eggs were injected intravenously nine weeks later [13]. Since both the infection steps in our experiment were percutaneous, the involvement of specific worm antibodies in the modulation of immunopathology cannot be ruled out, but comparable IgG titers in all infected groups speak against this hypothesis.

In accordance with the smaller granuloma size and less extensive hepatic fibrosis in group f/mf at week 19, lower serum cytokine levels of pro-fibrotic IL-4 and IL-13 were measured. A combined knock-out of IL-4 and IL-13 leads to an increase in TH1 regulated inflammation accompanied by necrotic tissue destruction and higher mortality [30, 31]. However, we did not observe higher levels of TH1 regulated inflammation in group f/mf in our setting. In addition, the expression of Arg1 in the livers of all infected mice confirmed an adequate TH2 response. This ties in with our previous findings that in murine Schistosomiasis, bile acid treatment mediates a reduction in TH2 response and hepatic fibrosis without augmenting TH1 response [32]. TH1 and TH2 responses have been shown to be reciprocally regulated to a certain degree [33, 34]. In our experiments, however, TH1 and TH2 responses seem to be regulated independently.

The deposition of *S. mansoni* hemozoin pigment in mouse livers is associated with the presence of Arg1-positive macrophages that specifically lack Retnla (also known as Relm α and Fizz1) [35]. Retnla is known to be involved in the downmodulation of TH2 response (via a

negative feedback regulation) [36]. In our experiments Retnla was significantly lower in group f/mf exclusively.

Unmated female schistosomes from unisexual infections are developmentally stunted and do not enter mesenteric veins as unmated male schistosomes or worm pairs do [37]. On the basis of our own and others' observations, it seems that the majority of virgin female worms are entrapped within the liver [38]. This might result in larger amounts of hemozoin pigment within the liver, accompanied by a Retnla-mediated suppression of TH2 response.

During *Schistosoma* infection Foxp3 positive T cells (Tregs) are key regulators of immune homeostasis. The cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (Ctla4, also known as protein receptor CD152) is constitutively expressed on Foxp3 positive Tregs and constitutes a further potent inhibitor of TH2 response by mediating T-cell anergy and tolerance [39]. In our setting Ctla4 was highest in group f/mf, while Foxp3 was uniformly expressed in all infected groups. As shown recently, blocking Ctla4 during the acute stage of *Schistosoma* infection results in an exaggeration of TH2 response, suggesting that high levels of Ctla4 might be involved in a reduction of TH2 response and of hepatic fibrosis. Though, this suppression of initial TH2 response is not to be confused with downmodulation of TH2 in persisting infections. Downmodulation of TH2 was observed in group mf/mf and might be an explanation for the reduction of IL-4 and IL-13 levels in group mf/mf with a longer time span of egg deposition (in total 13 weeks) versus -/mf (in total 2 weeks) [40]. In addition, Foxp3 positive Tregs can produce IL-10, which also inhibits TH2 response. Due to high variation in the values within the infected groups in our setting, we cannot rule out that IL-10 did indeed play a role [41].

In conclusion, a primary infection with female *S. mansoni* cercariae has a protective effect on granuloma size, hepatic fibrosis and disease progression in bisexually challenged mice. This protection is potentially associated with Ctla4-mediated TH2 suppression but not with a reduction in parasite load. Our findings provide evidence that protection against egg-induced granulomatous hyperreactivity is achievable by exploiting gender-specific differences between schistosomes.

Acknowledgments

The skillful technical support of Nicole Deinet (Laboratory of Medical Parasitology, University of Rostock), Marlies Dettmer (Institute of Immunology, University of Rostock), Daniel Wolter (Department of Oral, Maxillofacial and Plastic Surgery, University of Rostock) and Ilona Klamfuss (Institute for Experimental Surgery, University of Rostock) is gratefully acknowledged.

Author Contributions

Conceptualization: NK MS ML MT ECR.

Data curation: NK MS RE CHÖ.

Formal analysis: NK MS NG BMH MT.

Funding acquisition: NK MS ECR.

Investigation: NK MS RE CHÖ.

Methodology: NK MS RE ECR.

Project administration: NK MS BMH ECR.

Resources: NK MS RE CHÖ MT BMH ECR.

Software: NK MS RE.

Supervision: ECR.

Validation: ECR.

Visualization: NK MS ML ECR.

Writing – original draft: NK MS ECR.

Writing – review & editing: ML BMH.

References

1. World Health Organization (2015) Schistosomiasis. A major public health problem. Available: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>.
2. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006) Human schistosomiasis. *Lancet* (London, England) 368 (9541): 1106–1118.
3. Fairfax K, Nascimento M, Huang SC, Everts B, Pearce EJ (2012) Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in immunopathology* 34 (6): 863–871. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0354-4> PMID: 23139101
4. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH (2014) Human schistosomiasis. *The Lancet* 383 (9936): 2253–2264.
5. Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM (2004) Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews* 201: 156–167. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00176.x> PMID: 15361239
6. Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, et al. (2004) The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunological reviews* 201: 168–179. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00197.x> PMID: 15361240
7. Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology* 2 (7): 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri843> PMID: 12094224
8. Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *The Journal of experimental medicine* 173 (1): 159–166. PMID: 1824635
9. Fairfax K, Nascimento M, Huang SC, Everts B, Pearce EJ (2012) Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in immunopathology* 34 (6): 863–871. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0354-4> PMID: 23139101
10. de Oliveira Fraga Lucia Alves, Torrero MN Tocheva AS, Mitre E, Davies SJ (2010) Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. *The Journal of infectious diseases* 201 (3): 464–472. <https://doi.org/10.1086/649841> PMID: 20043751
11. Vereecken K, Naus CWA, Polman K, Scott JT, Diop M, et al. (2007) Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 12 (3): 431–444.
12. Leptak CL, McKerrow JH (1997) Schistosome egg granulomas and hepatic expression of TNF-alpha are dependent on immune priming during parasite maturation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 158 (1): 301–307.
13. Cheever AW, Lewis FA, Wynn TA (1997) *Schistosoma mansoni*: unisexual infections sensitized mice for granuloma formation around intravenously injected eggs. *Parasitology research* 83 (1): 57–59. PMID: 9000235
14. Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Moné H (2003) Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research* 91 (2): 144–150. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0943-1> PMID: 12910415
15. SMITHERS SR (1962) Stimulation of acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in monkeys: role of eggs and worms. *Experimental parasitology* 12: 263–273. PMID: 13914470
16. Diab M, Kamal K, Cavender D, Higashi G (1989) Modulation of cell-mediated immunity in mice with chronic unisexual or bisexual *Schistosoma mansoni* cercarial infection. *Annals of tropical medicine and parasitology* 83 (1): 25–30. PMID: 2512865
17. Moloney NA, Hinchcliffe P, Webbe G (1986) The ability of single sex infections of *Schistosoma japonicum* to induce resistance to reinfection in mice. *Journal of helminthology* 60 (3): 250–254. PMID: 3091678

18. Loebermann M, Sombetzki M, Langner C, Fuchsichler A, Gumhold J, et al. (2009) Imbalance of pro- and antifibrogenic genes and bile duct injury in murine *Schistosoma mansoni* infection-induced liver fibrosis. *Tropical medicine & international health: TM & IH* 14 (11): 1418–1425.
19. Boissier J, Durand P, Moné H (2001) PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial populations. *Molecular and biochemical parasitology* 112 (1): 139–141. PMID: [11166395](#)
20. Gasser RB, Morahan G, Mitchell GF (1991) Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology* 47 (2): 255–258. PMID: [1944422](#)
21. Grevelding CG, Kampkötter A, Kunz W (1997) *Schistosoma mansoni*: sexing cercariae by PCR without DNA extraction. *Experimental parasitology* 85 (1): 99–100. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.4129> PMID: [9024208](#)
22. Quack T, Doenhoff M, Kunz W, Grevelding CG (1998) *Schistosoma mansoni*: the varying occurrence of repetitive elements in different strains shows sex-specific polymorphisms. *Experimental parasitology* 89 (2): 222–227. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4293> PMID: [9635446](#)
23. Grenfell RFQ, Martins WH, Silva-Moraes V, Barata SV, Ribeiro EG, et al. (2012) Antigens of worms and eggs showed a differentiated detection of specific IgG according to the time of *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45 (4): 505–509. PMID: [22930047](#)
24. Duvall RH, DeWitt WB (1967) An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 16 (4): 483–486. PMID: [4952149](#)
25. SMITHERS SR (1962) Immunizing effect of irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni* in rhesus monkeys. *Nature* 194: 1146–1147. PMID: [13914469](#)
26. Dean DA, Minard P, Stirewalt MA, Vannier WE, Murrell KD (1978) Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of bisexual and unisexual initial infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 27 (5): 951–956. PMID: [717639](#)
27. Bickle QD (1982) Studies on the relationship between the survival of *Schistosoma mansoni* larvae in mice and the degree of resistance produced. *Parasitology* 84 (1): 111–122. PMID: [7063248](#)
28. Bickle Q, Bain J, McGregor A, Doenhoff M (1979) Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse: III. The failure of primary infections with cercariae of one sex to induce resistance to reinfection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (1): 37–41. PMID: [442181](#)
29. Garcia EG, Mitchell GF, Espinas FJ, Tapales FP, Quicho LP, et al. (1984) Further studies on resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* in mice. *Asian Pacific journal of allergy and immunology* 2 (1): 27–31. PMID: [6529479](#)
30. Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ (1997) IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (2): 777–785.
31. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN (2000) Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (5): 2585–2591.
32. Sombetzki M, Fuchs CD, Fickert P, Österreicher CH, Mueller M, et al. (2015) 24-nor-ursodeoxycholic acid ameliorates inflammatory response and liver fibrosis in a murine model of hepatic schistosomiasis. *Journal of hepatology* 62 (4): 871–878. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.020> PMID: [25463533](#)
33. Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology* 2 (7): 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri843> PMID: [12094224](#)
34. Chuah C, Jones MK, Burke ML, McManus DP, Gobert GN (2014) Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in parasitology* 30 (3): 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.009> PMID: [24433721](#)
35. Truscott M, Evans DA, Gunn M, Hoffmann KF (2013) *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion. *Infection and immunity* 81 (1): 133–142. <https://doi.org/10.1128/IAI.00701-12> PMID: [23090958](#)
36. Nair MG, Du Y, Perrigoue JG, Zaph C, Taylor JJ, et al. (2009) Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *The Journal of experimental medicine* 206 (4): 937–952. <https://doi.org/10.1084/jem.20082048> PMID: [19349464](#)
37. Popiel I, Cioli D, Erasmus DA (1984) The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *International journal for parasitology* 14 (2): 183–190. PMID: [6735582](#)

38. Miller FH JR, Tulloch GS, Kuntz RE (1972) Scanning electron microscopy of integumental surface of schistosoma mansoni. The Journal of parasitology 58 (4): 693–698. PMID: [4115733](#)
39. Taylor MD, Harris A, Babayan SA, Bain O, Culshaw A, et al. (2007) CTLA-4 and CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 179 (7): 4626–4634.
40. Walsh CM, Smith P, Fallon PG (2007) Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during Schistosoma mansoni infection of mice. Parasite immunology 29 (6): 293–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00947.x> PMID: [17518948](#)
41. Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, et al. (1998) IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 160 (9): 4473–4480.

Teil-III Publikation:

Host Defense Versus Immunosuppression: Unisexual Infection With Male and Female Schistosoma mansoni Differentially Impacts the Immune Response Against Invading Cercariae



Host Defense Versus Immunosuppression: Unisexual Infection With Male or Female *Schistosoma mansoni* Differentially Impacts the Immune Response Against Invading Cercariae

Martina Sombetzki, Nicole Koslowski, Anne Rabes, Sonja Seneberg, Franziska Winkelmann, Carlos Fritzsche, Micha Loebermann and Emil C. Reisinger*

OPEN ACCESS

Edited by:

Alexandre Mebazaia,
Assistance Publique Hôpitaux
de Paris (AP-HP),
France

Reviewed by:

Arnon Dias Jurberg,
Fundação Oswaldo
Cruz (Fiocruz), Brazil
Ahmad Ali Othman,
Tanta University, Egypt

*Correspondence:

Emil C. Reisinger
emil.reisinger@uni-rostock.de

Specialty section:

This article was submitted
to Inflammation, a
section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 29 November 2017

Accepted: 06 April 2018

Published: 24 April 2018

Citation:

Sombetzki M, Koslowski N,
Rabes A, Seneberg S,
Winkelmann F, Fritzsche C,
Loebermann M and Reisinger EC
(2018) Host Defense Versus
Immunosuppression: Unisexual
Infection With Male or Female
Schistosoma mansoni Differentially
Impacts the Immune Response
Against Invading Cercariae.
Front. Immunol. 9:861.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00861

Division of Tropical Medicine and Infectious Diseases, Center of Internal Medicine II, University Medical Center Rostock, Rostock, Germany

Infection with the intravascular dieocious trematode *Schistosoma spp.* remains a serious tropical disease and public health problem in the developing world, affecting over 258 million people worldwide. During chronic *Schistosoma mansoni* infection, complex immune responses to tissue-entrapped parasite eggs provoke granulomatous inflammation which leads to serious damage of the liver and intestine. The suppression of protective host immune mechanisms by helminths promotes parasite survival and benefits the host by reducing tissue damage. However, immune-suppressive cytokines may reduce vaccine-induced immune responses. By combining a single-sex infection system with a murine air pouch model, we were able to demonstrate that male and female schistosomes play opposing roles in modulating the host's immune response. Female schistosomes suppress early innate immune responses to invading cercariae in the skin and upregulate anergy-associated genes. In contrast, male schistosomes trigger strong innate immune reactions which lead to a reduction in worm and egg burden in the liver. Our data suggest that the female worm is a neglected player in the dampening of the host's immune defense system and is therefore a promising target for new immune modulatory therapies.

Keywords: *Schistosoma mansoni* infection, air pouch, inflammation, immune suppression, single-sex infection, granulomatous inflammation

INTRODUCTION

Infection with the intravascular trematode *Schistosoma spp.* remains a serious tropical disease and public health problem in the developing world. It is responsible for up to 300,000 deaths per year and 36 million disability-adjusted life years (1–3). *Schistosoma mansoni*, which causes intestinal schistosomiasis, accounts for around 80 million infections in Africa, the Near East and South America (4).

During infection, the host's immune system is faced with different developmental stages of the parasite, from skin-penetrating cercarial larvae, juveniles which pass through the heart and lungs,

and finally egg-producing adult worm pairs which inhabit the mesenteric vasculature. The adults produce up to 300 tissue-damaging eggs per day (5). Most of the eggs are flushed into the liver where they become entrapped within the hepatic sinusoids and provoke a sustained inflammatory-driven process. Some eggs penetrate the blood vessel walls, inducing granulomatous inflammation in the connective tissues. A small proportion finally migrates into the gut lumen to be released *via* feces. After some years, the accumulating eggs cause pronounced intestinal and hepatic fibrosis, which in turn leads to portal hypertension and its sequels—including variceal bleeding and ascites (6, 7).

The innate immune responses which are the first line of defense against invading *S. mansoni* cercariae are mediated by the skin. The skin constitutes the immune-regulatory checkpoint that guides immune responses and therefore determines parasite survival and the extent of parasite morbidity. First exposures to cercariae are associated with the development of Th1 responses in the skin. The rapid recruitment of neutrophils and eosinophils and the activation of complement factors have been shown to efficiently kill invading *Schistosoma* larvae (8, 9).

The parasites then evolve a range of mechanisms to actively dampen the host's immune response and promote their own survival. Repeated infections in mice have been shown to trigger changes in inflammatory cell composition in skin-draining lymph nodes, CD4⁺ T cell hypo-responsiveness, changes in the local cytokine environment, and alternative activation of macrophages and dendritic cells (10, 11). Mice exposed multiple times to cercariae display a shift toward Th2-type activity, which primes the immune responses to adult worms, parasite eggs, and granuloma formation (12, 13).

Several studies have demonstrated that the sex of schistosomes affects the host's immune response and disease progression (14–16), but whether it modulates the early immune response in the skin as well has remained elusive to date. We combined a murine single-sex infection system with an air pouch model to investigate immune reactions to injected cercariae. We were able to show that male and female schistosomes have opposing immune modulatory roles during early reinfection and differentially impact the host's defense mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Animal experiments were performed in strict accordance with the regulations of the German Society for Laboratory Animal Science and with the European health guidelines issued by the Federation of Laboratory Animal Science Associations. The protocol was approved by the local committee on animal care and use (7221.3-1.1-008/13, 7221.3-1-047/16, 7221.3-2-024/15-2). All efforts were made to minimize animal suffering.

S. mansoni Infection Model

Schistosoma mansoni (Belo Horizonte strain) was kept in a life cycle using *Biomphalaria glabrata* fresh water snails (Brazilian strain) as intermediate hosts and 6- to 8-week-old female NMRI mice as definitive hosts, as previously described (17).

To obtain either male or female cercariae for subsequent infection of mice, *B. glabrata* snails were exposed to single *S. mansoni* miracidia, and cercariae were harvested 6 weeks later (18). The sex of the cercariae was determined by DNA amplification of sex-related chromosome segments using female-specific primers as previously described (14, 18–21). The study designs were illustrated in a graphic overview (Figure S1 in Supplementary Material). To distinguish the study design “air pouch” from “bisexual reinfection” different designations were used. For the study “air pouch,” we used lower case for the reinfection step (.../mf). For the study “bisexual reinfection,” we used upper case (.../MF). The following study designs were used.

“Air pouch” study design: 6-week-old female C57BL/6 mice were percutaneously infected with 100 *S. mansoni* cercariae, either male only (m), female only (f), or both sexes (mf). A further group was left uninfected (–). On day 37 postinfection (p.i.), air pouches were created by subcutaneously injecting 4 ml sterile air into a shaved skin site on the back of each mouse under isoflurane anesthesia. Air pouches were reinflated with 2 ml sterile air after 2 and 4 days (22). On day 42 p.i., 1 ml PBS or 50 *S. mansoni* cercariae of both sexes (in 1 ml PBS) were injected into the air pouch. Groups were designated as –/PBS ($n = 5$), –/mf ($n = 10$), m/mf ($n = 10$), f/mf ($n = 10$), and mf/mf ($n = 10$). The symbol ahead of the slash indicates the nature of the first infection step. The symbol after the slash indicates the injection of mixed sex cercariae into the air pouch. Mice were sacrificed 6 hours later *via* cervical dislocation under isoflurane anesthesia. The pouches were rinsed with 3 ml PBS, kneaded, and exudates were collected. After centrifugation, exudate cells were counted in a Neubauer counting chamber and analyzed using flow cytometry. Cell-free supernatants were stored at -80°C for further analysis.

“Antibodies and gene expression” study design: 6-week-old female C57BL/6 mice were percutaneously infected with 100 *S. mansoni* cercariae, either male only (m, $n = 11$), female only (f, $n = 11$), or both sexes (mf, $n = 10$), or left untreated (–, $n = 10$). Mice were sacrificed 6 weeks p.i. *via* cervical dislocation under isoflurane anesthesia. Spleens and blood serum were collected for further analysis.

“Bisexual reinfection” study design: 6-week-old female C57BL/6 mice were percutaneously infected with 100 *S. mansoni* cercariae, either male only (m), female only (f), or both sexes (mf). A further group was left uninfected (–). Six weeks later, mice were reinfecting with 50 or 150 *S. mansoni* cercariae of both sexes to assess inflammatory immune response and disease progression and to determine worm and egg burden, respectively. Groups were designated as – ($n = 5$), –/MF ($n = 8$), m/MF ($n = 8$), f/MF ($n = 8$), and mf/MF ($n = 8$). The symbol ahead of the slash indicates the nature of the first infection step. The symbol after the slash indicates the second bisexual infection step. Mice were sacrificed *via* cervical dislocation under ketamine/xylazine anesthesia 14 weeks postinfection.

Flow Cytometry

Single-cell suspensions from air pouch exudates were stained for surface markers in ice-cold PBS (0.5% BSA and 0.1% sodium azide) for 30 min and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. The following fluorochrome-tagged

antibodies were used: anti-CD45-PerCP, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-Alexa488, anti-Gr-1-PE-Cy7, anti-F4/80-APC, anti-B220-PE-Cy7, anti-CD3-APC, anti-CD4-FITC, and anti-CD8-APC-Cy7 (all purchased from BioLegend, USA) and anti-CD44-PE, anti-62L-APC-Cy7, anti-B220-APC-Cy7, anti-PD-L2-APC, anti-CD73-PE, anti-CD80-PerCP-Cy5.5-APC (all purchased from BD Bioscience). CD45⁺ cells were differentiated by gating on the following cell populations: dendritic cells (CD11b⁺/CD11c⁺), macrophages (CD11b⁺/F4/80⁺), neutrophils (CD11b⁺/Gr-1⁺/F4/80⁺), eosinophils (CD11b⁺/Gr-1⁺/F4/80⁺, FSC^{low}), Gr1⁺ inflammatory monocytes (CD11b⁺/Gr-1⁺/F4/80⁺, FSC^{high}), T cells (CD3⁺/CD4⁺ or CD3⁺/CD8⁺), B cells (B220⁺), memory T cells (CD3⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}), and memory B cells (B220⁺/PD-L2⁺/CD73⁺/CD80⁺). Dead cells were stained using Zombie Red™ Fixable Viability Kit (BioLegend, USA) according to the manufacturer's instructions. Data were obtained using a FACS Verse flow cytometer (BD Bioscience) and analyzed using FlowJo software (v10.0.7, Tree Star Inc., CA, USA) (for a list of all antibodies and enzyme-linked immunosorbent assays used in this study, see Table S1 in Supplementary Material).

Quantification of Cytokines and Chemokines

Concentrations of cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10) and chemokines (RANTES, Eotaxin, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-10) in the air pouch exudate were determined using ProcartaPlex™ Luminex Multiplex Immunoassay (eBioscience, Germany) according to the manufacturer's instructions. TGF- β serum concentrations were analyzed using a commercially available ELISA kit (TGF beta-1 Human/Mouse Uncoated ELISA Kit, Life Technologies, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Quantification of Schistosoma-Specific Immunoglobulins

Six weeks after infection, immunoglobulin E (IgE) and immunoglobulin G (IgG1, IgG2b) subclasses specific for to soluble *S. mansoni* adult worm antigens were quantified in serum using an in-house ELISA as previously described (14).

Quantitative Real-time PCR (RT-PCR) Analysis

Six weeks after infection, total RNA was isolated from snap-frozen spleens (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Germany) and reversely transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (ThermoFisher, Germany) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using the following TaqMan Gene Expression Assays: Foxp3 Mm00475162; Il10 Mm01288386; Ctl4 Mm00486849; Rnf138 Mm01158179; Il33 Mm00505403 and Il1r1 Mm00516117 (ThermoFisher, Germany). Cycling was performed on the 7900HT Fast RT-PCR System under the following reaction conditions: 50°C for 2 min followed by 95°C for 10 min, 45 cycles at 95°C for 15 s, and at 60°C for 1 min. Gene expression values were normalized to the endogenous reference gene GAPDH (Rodent GAPDH control

reagent, ThermoFisher, Germany) and presented as normalized, expression values relative to naive controls.

Assessment of Parasite Burden

Total egg numbers were assessed by microscopic evaluation (100-fold magnification) of weighted liver fractions (crushing preparation). Parasites were recovered from the portal system using the liver perfusion technique previously described (17), and worm pairs subsequently counted.

Pathology

Fourteen weeks after infection, harvested livers and spleens were weighed and the ratio of liver and spleen weight, respectively, to body weight was determined. Serum biochemistry for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (AP) was performed using UniCel® DxC 800 Synchron® Clinical System (Beckman Coulter GmbH).

For histological evaluation, half of the right liver lobe was fixed in 10% neutral buffered formalin solution (Sigma Aldrich, Germany) and embedded in paraffin. Thin sections of 5 μ m were stained with either hematoxylin/eosin (H&E) or sirius red (SR). Granuloma size was determined using ImageJ software (v1.47v; National Institutes of Health, USA). The extent of hepatic fibrosis was analyzed in thin sections stained for collagen (SR). The SR-positive areas were assessed using ImageJ software (v1.47v; National Institutes of Health, USA).

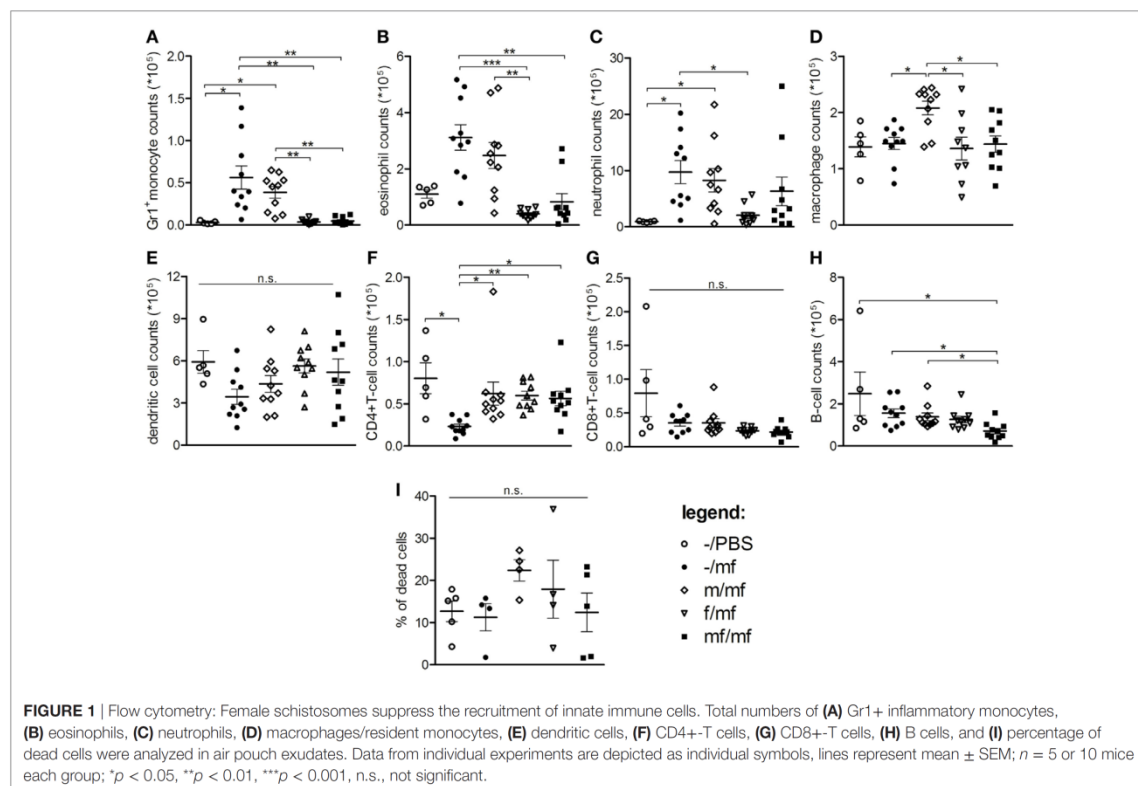
Statistics

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Values are expressed as mean + SEM. Normal distribution was tested using the D'Agostino and Pearson Omnibus Normality Test. Normally distributed samples were compared using ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test. Non-normally distributed samples were compared using the Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's *post hoc* test. For all statistical analyses, *p* values <0.05 were considered significant. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, n.s., not significant.

RESULTS

Female Schistosomes Suppress the Recruitment of Innate Immune Cells

To investigate whether the sex of adult *S. mansoni* living in the intestine impacts the early dermal immune defense reaction to invading cercariae, cercariae were injected into air pouches in mice carrying adult female worms, adult male worms, or worm pairs. Cell types and counts in the air pouches were determined by flow cytometry. Cell counts and percentages of innate effector cells such as Gr1⁺ monocytes, eosinophils, and neutrophils were highest in groups –/mf and m/mf. In comparison, in groups f/mf and mf/mf, cell counts of innate effector cells were low and comparable to the healthy control –/PBS (Figures 1A–C; Figures S2B,D in Supplementary Material). Macrophage numbers and percentages were higher in the m/mf group than the other groups (Figure 1D; Figure S2E in Supplementary Material). Comparable numbers of dendritic cells were found in the exudates of all



mice (Figure 1E). Numbers of CD4⁺ T cells were significantly higher in all preinfected mice (m/mf, f/mf, mf/mf) than in group -/mf mice (Figure 1F), while the number of B cells was lowest in group mf/mf (Figure 1H). However, the sex of schistosomes had no impact on total numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, B cells or memory T and B cells in the air pouch (Figures 1F–H; Figure S3 in Supplementary Material). Neither percentages of dead cells nor total cell numbers in air pouch exudates were significantly different between groups (Figure 1I; Figure S2A in Supplementary Material). These data demonstrate that female adult worms, and to a lesser extent worm pairs, efficiently suppress the early recruitment of innate immune cells in response to injected cercariae.

Female Schistosomes Reduce Chemokine and Cytokine Production

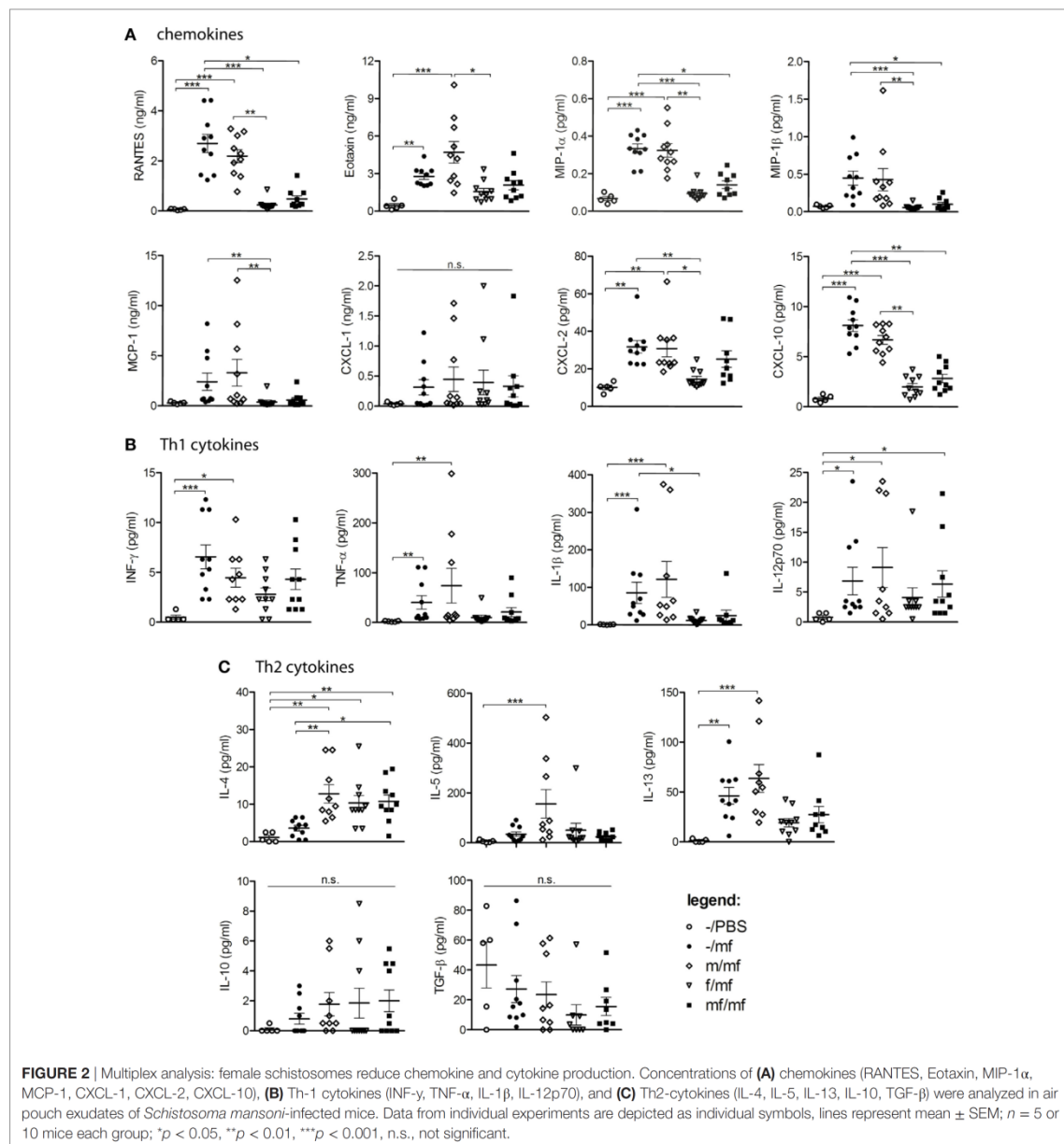
Chemokines and cytokines were determined in the air pouch exudates in order to provide insights into inflammatory mediators. Levels of RANTES, Eotaxin, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, and CXCL10 were significantly increased in groups -/mf and m/mf compared to the uninfected control -/PBS. In contrast, chemokine levels in groups f/mf and mf/mf were comparable to those of the uninfected control group -/PBS (Figure 2A).

Levels of the Th1 cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , and IL-12p70 were significantly increased in groups -/mf and m/mf compared

to the uninfected control -/PBS and were lowest in groups f/mf and mf/mf, which exhibited comparable levels to -/PBS in the case of TNF- α and IL-1 β (Figure 2B). The Th2 cytokine IL-4 was significantly elevated in all preinfected mice (groups m/mf, f/mf, mf/mf), whereas IL-5 was only elevated in group m/mf. IL-13 was significantly elevated in groups -/mf and m/mf in comparison to the other infected groups, while the regulatory cytokines IL-10 and TGF- β were not elevated in any of the groups (Figure 2C). These observations suggest that preinfection with female schistosomes and preinfection with worm pairs impedes the production of chemokines in response to a subsequent cercariae injection, resulting in a decline in the chemotactic attraction of immune cells.

Male Schistosomes Increase the Production of Protective IgG1 and IgG2b Antibodies

The next objective was to examine the role of *S. mansoni* sex on humoral adaptive immune responses. Levels of *S. mansoni*-specific IgG1, IgG2b, and IgE were measured in the blood of all mice before air pouches were prepared. IgG1 and IgG2b were found in all infected mice, with the highest levels detected in group m. However, levels of specific IgE were not elevated compared with uninfected control mice (Figure 3).



Female Schistosomes Upregulate Anergy-Related Gene Expression

Since mice carrying female schistosomes showed a diminished dermal immune response to invading cercariae, expression levels of regulatory immunosuppressive genes were analyzed in uninfected (-), male only (m) or female only (f) or bisexually (mf) infected mice. *Fork head protein 3 (Foxp3)*, a marker for

regulatory T cells, was significantly downregulated following infection with male only cercariae (group m) in comparison to the others (Figure 4A). In group f, the expression levels of *Il10* and *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (Ctla4)* are slightly increased compared to group m and uninfected control mice (Figures 4B,C). The highest expression levels of *Il10*, *Ctla4*, and *gene related to anergy in lymphocytes*

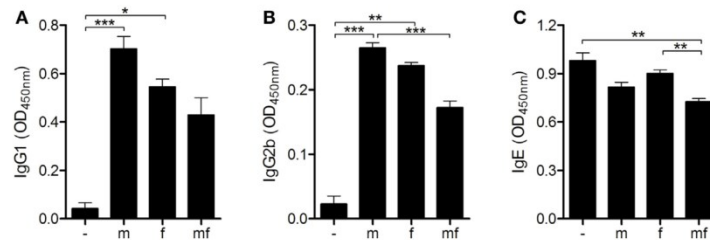


FIGURE 3 | Male schistosomes increase the production of protective IgG1 and IgG2b antibodies. Six weeks p.i., (A) IgG1, (B) IgG2b, and (C) immunoglobulin E (IgE) serum levels of *Schistosoma mansoni*-infected mice were quantified by ELISA. Data are represented as mean + SEM; $n = 5$ or 10 mice each group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

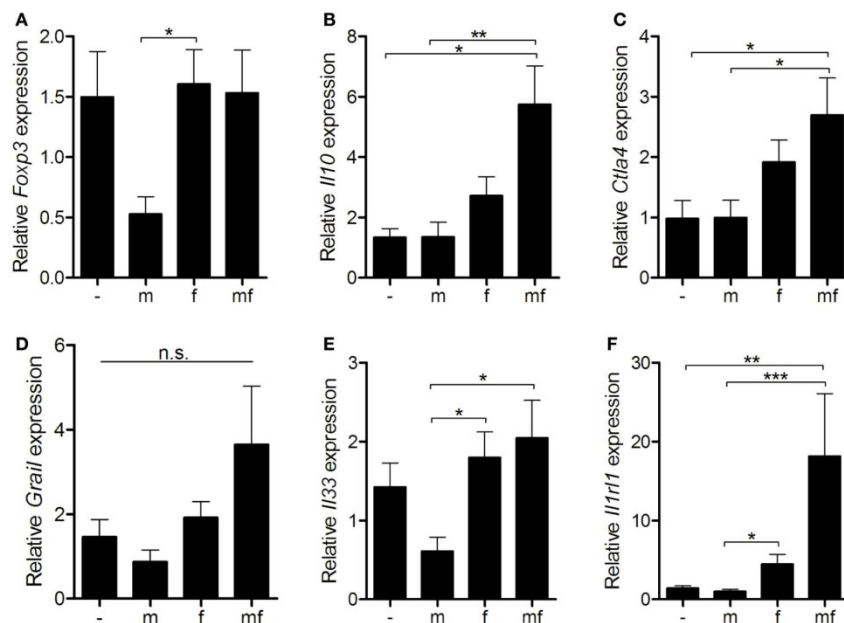


FIGURE 4 | Female schistosomes upregulate energy-related gene expression. Six weeks p.i. relative expression of (A) *Foxp3*, (B) *Il10*, (C) *Ctl4*, (D) *Grail*, (E) *Il33*, and (F) *Il1r1* in spleens was determined by real-time PCR. Data are presented as mean + SEM; $n = 10$ –11 mice each group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s., not significant.

(*Grail*) were found in bisexually infected mice (group mf), possibly as a result of parasite eggs already present in these mice (Figure 4D). Moreover, mRNA expression of immune modulatory *Il33* and its receptor *Il1r1*, known to be expressed on activated Treg cells, were significantly elevated in group f and mf mice compared to group m (Figures 4E,F). Overall, the data indicate that female worms upregulate expression levels of regulatory *Il10* and *Ctl4* to a greater extent than male worms, thus promoting the establishment of an immunosuppressive environment.

Primary Infection With Male Schistosomes Reduces Worm and Egg Burden but Has No Impact on Liver Fibrosis

A second experiment was performed to investigate whether immune responses to male and female schistosomes differentially impact parasite burden and disease progression. Mice were initially infected with male, female or mixed *S. mansoni* cercariae. Six weeks later bisexual reinfection was performed in a water bath containing a mixture of male and female *S. mansoni* cercariae.

Eight weeks later, parasite loads and hepatic fibrosis levels were analyzed (Figure S1 in Supplementary Material).

The numbers of worm pairs and eggs were found to be significantly reduced in group m/MF compared to the other groups. The highest numbers of worm pairs and hepatic eggs were seen in group mf/MF (Figures 5A,B). Macroscopic evaluation of all infected mice revealed enlarged livers and spleens with rough surfaces and visible nodules. These organ alterations were most prominent in mice of group mf/MF (Figure 5C). Body weight-adjusted liver and spleen sizes of mice preinfected with female cercariae (f/MF) were lower than those of the other infected groups (-/MF, m/MF, mf/MF) (Figures 5D,E). Serum levels of the liver enzymes AST and ALT were slightly elevated in groups -/MF, f/MF, and m/MF compared to the others (Figure S4 in Supplementary Material), whereas AP levels were decreased in all infected groups when comparing to uninfected mice.

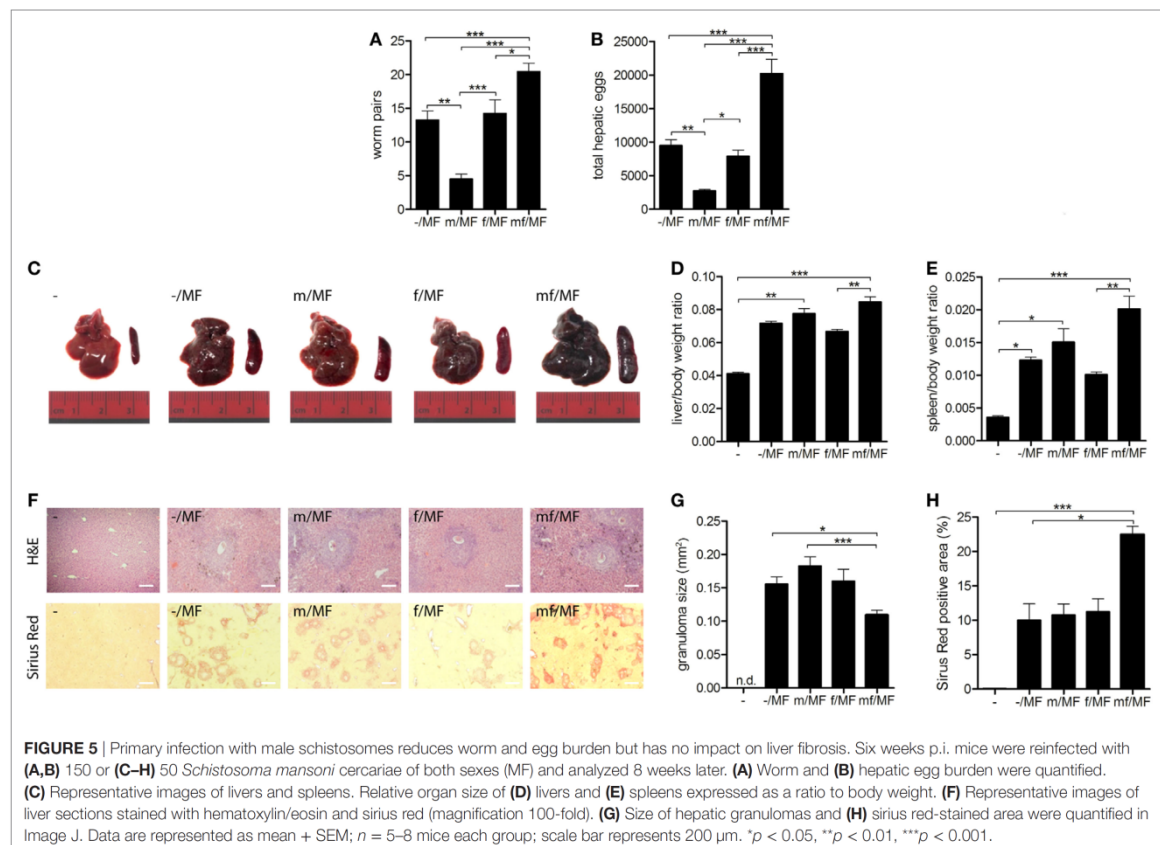
Granuloma formation and fibrosis, shown by H&E and SR staining, were detected in all infected groups (Figure 5F). Hepatic granulomas did not differ in size between groups -/MF, m/MF, and f/MF, but were significantly smaller in group mf/MF (Figure 5G). Levels of hepatic fibrosis were the same in groups -/MF, m/MF, and f/MF and significantly higher in group mf/MF (Figure 5H).

These results suggest that a strong innate immune response in the skin of mice initially infected with male worms leads to a significant reduction in worm pairs and egg burden after reinfection. However, the reduction of parasite load in group m/MF had no effect on granuloma size or hepatic fibrosis.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that male and female schistosomes play different roles in modulating the host's immune response. Female schistosomes suppress early innate immune responses to invading cercariae in the skin and upregulate anergy-associated genes, whereas male schistosomes trigger strong innate immune reactions. We further show that the strong immune responses within the skin provoked by male schistosomes result in the reduction of worm and egg burden in the liver.

Previous studies have shown an increase in liver and spleen weights and higher numbers of blood leukocytes in mice infected with male schistosomes, suggesting that male worms are more immunogenic. However, the underlying mechanisms and the effect of the sex of schistosomes on subsequent infections were not investigated (15). In another study, no differences between the sizes of lung granulomas were found in mice that were



preinfected with male, female, or both sexes of *S. mansoni* cercariae and subsequently challenged with intravenously injected *Schistosoma* eggs (12). We recently provided evidence of the immune-suppressive potential of female worms by noting smaller perioval granuloma sizes, lower levels of inflammation, and less hepatic fibrosis in mice initially infected with female schistosomes prior to a secondary bisexual infection (14).

An appropriate innate immune response in the skin plays an important role in determining immune responses to developing *Schistosoma* larvae (13) and is required to combat such larvae (8, 23). Using an inflammatory air pouch model, we have shown that in contrast to male worms, females and worm pairs suppress the inflammatory immune response within the skin. This is reflected by lower levels of chemokines and cytokines in air pouch exudates, which in turn results in declined chemotactic attraction of immune cells. Cell numbers can be affected not only by local cell proliferation upon stimulation, but also by cell death. The air pouch model used in our study provides a localized environment in which to study and quantify cell recruitment and the production of chemokines and cytokines following injection of an inflammatory stimulus, but it is not appropriate for studying cell proliferation in the surrounding tissues. An increase of innate immune cells is mediated by active recruitment of these cells to the site of infection, a process initiated by the production of chemokines. As described elsewhere, *S. mansoni* infection elicits an initial influx of neutrophils into the skin, followed by eosinophils, macrophages, and dendritic cells (8, 24). The latter can be derived from infiltrating monocytes (25). As the percentage of dead cells did not vary between our experimental groups, we suggest that the reduction in the recruitment of innate immune cells in groups f/mf and mf/mf is mediated by reduced chemokine/cytokine levels in the air pouch rather than by local cell death. Since numbers of T cells, B cells, memory T cells, and memory B cells were not enhanced by preinfection with either male or female schistosomes or worm pairs in our air pouch model, we cannot comment on the role of these cells in combating invading cercariae. Type IV hypersensitivity typically occurs at least 48 h after exposure to an antigen (26), thus it is quite possible that this reaction/recruitment time was not long enough to permit an adequate T or B cell reaction. Further steps are clearly required to address this issue.

Our data indicate that the immune suppression observed is mediated by the upregulation of anergy-related genes *Ctla4* and *Il10* in group mf. Both genes are known to play a role in granulomatous hyporesponsiveness (27). Since it is known that parasite eggs induce the expression of anergy-related genes, high expression levels of *Ctla4* and *Il10* in bisexually infected mice (group mf) are related to the presence of parasite eggs rather than to a synergistic effect of worm pairs. As recently shown, *Ctla4* expression levels were significantly elevated after preinfection with female schistosomes in a bisexually infection system using an extended preinfection period (14). Although not significant, there was an increase of *Il10* and *Ctla4* expression levels in spleens of group f mice compared to group m and uninfected mice in this study as well. These findings might indicate that anergy-related mechanisms are involved in a time-dependent manner. Moreover, we found an upregulation of *Il33* and its receptor, described as

potent mediators of immune suppression in infectious or sterile inflammation (28, 29). The induction of anergy by *S. mansoni* worms has already been demonstrated (30). We present evidence here that the female worm is responsible for this phenomenon.

It has been reported that recurrent helminth infections cause hyporesponsiveness in dermal lymphocytes (10, 31) and the polarization of alternatively activated macrophages and dendritic cells, triggering a Th2 immune response (26, 27, 32, 33). The efficacy of Th2 responses in killing skin-penetrating cercariae has been shown in avian schistosomiasis. Moreover, the majority of *Trichobilharzia* spp. cercariae die within a few days of exposure to murine skin. The dermal reactions of mice and humans to cercariae are described as allergic-type hypersensitivity and include immediate and late phase reactions, Th2-polarization, an increase in IgG1 and IgE levels, and histamine release (13, 34, 35). Higher production of Th2 cytokines in mice carrying male schistosomes in our infection model suggests that Th2 responses also contribute to the host's defense.

Neutrophils and eosinophils efficiently kill parasites by producing elastase and hydrogen peroxide (9). We thus hypothesized that the strong recruitment of innate inflammatory cells observed in mice carrying male worms should result in a reduction of worm pairs and egg burden. In a two-step infection model, mice carrying male, female, or male and female schistosomes were bisexually reinfected after 6 weeks and analyzed 8 weeks later (14 weeks p.i.). It was indeed found that a strong recruitment of inflammatory cells correlates with a marked reduction in parasite burden in mice primarily infected with male cercariae. Inversely, preinfection with female cercariae did not lead to parasite reduction. As expected, the highest numbers of worm pairs and eggs were seen in group mf/MF, because of the double infection with mixed cercariae. Parasite burden in mice infected only once (–/MF) was higher than in mice preinfected with male schistosomes, despite once-infected mice displaying a strong dermal immune response. This makes sense since they had no opportunity to develop protective IgG1 and IgG2b antibody responses or to recruit macrophages into the skin prior to infection. Parasites not killed in the skin are often killed in the lungs. Experimental studies indicate that immunologically concealed adult worms might promote so-called antilarval concomitant immunity *via* the release of cross-reactive antigens (36).

The reduction of parasite loads in mice preinfected with male cercariae has a limited effect on hepatic fibrosis and granuloma size. The ratios of liver/body weight and spleen/body weight were also elevated to a comparable extent in –/MF, f/MF, and m/MF mice. Although tissue-entrapped eggs act as inflammatory stimuli, the principal driver of hepatic fibrosis progression are pro-fibrotic interleukins-4 and -13. At a certain level of infection (egg loads within the liver), Th2-mediated fibrosis becomes exaggerated and progresses independently from hepatic egg load or size of hepatic granulomas (37). IL-4 and IL-13 determine the inflammatory phenotype of egg-induced granulomas and IL-13 causes fibrosis (38). We conclude, therefore, that a reduction in parasite burden may not be sufficient for the treatment of hepatic damage, particularly hepatic fibrosis.

The results of the present study reveal how schistosomes differentially manipulate the host's immune system when it comes

to combating invading cercariae. Immunosuppression by helminths is a mechanism known to facilitate parasite survival and promote chronic disease progression. Though the host benefits from a reduction in tissue damage, immunosuppressive cytokines can also reduce vaccine responses (39) since the effect of a vaccine is not at least dependent on the host's immune competence. We propose here that the female worm is a neglected player in the dampening down of the host's immune defense mechanisms and is therefore a promising target for new immune modulatory strategies.

ETHICS STATEMENT

Animal experiments were performed in strict accordance with the regulations of the German Society for Laboratory Animal Science and with the European health guidelines issued by the Federation of Laboratory Animal Science Associations. The protocol was approved by the local committee on animal care and use (7221.3-1.1-008/13, 7221.3-1-047/16, 7221.3-2-024/15-2). All efforts were made to minimize animal suffering.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, NK, and ER conceived and designed the experiments. MS, NK, FW, and SS performed the experiments. MS, NK, AR, CF, and ML analyzed the data. MS, NK, AR, ML, and ER contributed reagents/materials/analysis tools. MS, NK, AR, and ER wrote the paper.

REFERENCES

- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* (2000) 77:41–51. doi:10.1016/S0001-706X(00)00122-4
- Weerakoon KG, Gobert GN, Cai P, McManus DP. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* (2015) 28:939–67. doi:10.1128/CMR.00137-14
- Tebeje BM, Harvie M, You H, Loukas A, McManus DP. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasit Vectors* (2016) 9:528. doi:10.1186/s13071-016-1799-4
- Dunne DW, Pearce EJ. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect* (1999) 1:553–60. doi:10.1016/S1286-4579(99)80095-1
- Moore DV, Sandground JH. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Am J Trop Med Hyg* (1956) 5(5): 831–40. doi:10.4269/ajtmh.1956.5.831
- Stavitsky AB. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect Immun* (2004) 72:1–12. doi:10.1128/IAI.72.1.1-12.2004
- Lundy SK, Lukacs NW. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Front Immunol* (2013) 4:39. doi:10.3389/fimmu.2013.00039
- Hogg KG, Kumkate S, Anderson S, Mountford AP. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* (2003) 71:3563–71. doi:10.1128/IAI.71.6.3563-3571.2003
- Freudenstein-Dan A, Gold D, Fishelson Z. Killing of schistosomes by elastase and hydrogen peroxide: implications for leukocyte-mediated schistosome killing. *J Parasitol* (2003) 89:1129–35. doi:10.1645/GE-96R
- Cook PC, Aynsley SA, Turner JD, Jenkins GR, Van Rooijen N, Leeto M, et al. Multiple helminth infection of the skin causes lymphocyte hypo-

ACKNOWLEDGMENTS

The skillful technical support of Nicole Deinet, Miriam Bischofsberger, and Franziska Flügel (Division of Tropical Medicine and Infectious Diseases, University Medical Center Rostock, Germany), Daniel Wolter (Department of Oral, Maxillofacial and Plastic Surgery, University of Rostock), and Ilona Klammfuss (Institute of Experimental Surgery, University of Rostock) is gratefully acknowledged. We would also like to thank Prof. Brigitte Müller-Hilke and Robby Engelmann of the Core Facility for Cell Sorting and Cell Analysis, University Medical Center Rostock for their expert help and guidance.

FUNDING

The author MS received a research grant from the DAMP foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This work was supported by the European Social Fund (ESF) within the excellence research program of the state Mecklenburg-Vorpommern Card-ii-Omics (to MS and FW).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00861/full#supplementary-material>.

responsiveness mediated by Th2 conditioning of dermal myeloid cells. *PLoS Pathog* (2011) 7(3):e1001323. doi:10.1371/journal.ppat.1001323

- Prendergast CT, Sanin DE, Mountford AP. CD4 T-cell hyporesponsiveness induced by schistosome larvae is not dependent upon eosinophils but may involve connective tissue mast cells. *Parasite Immunol* (2016) 38:81–92. doi:10.1111/pim.12300
- Cheever AW, Lewis FA, Wynn TA. *Schistosoma mansoni*: unisexual infections sensitized mice for granuloma formation around intravenously injected eggs. *Parasitol Res* (1996) 83:57–9. doi:10.1007/s004360050208
- Mountford AP, Trottein F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. *Trends Parasitol* (2004) 20(5):221–6. doi:10.1016/j.pt.2004.03.003
- Koslowski N, Sombetzki M, Loebermann M, Engelmann R, Grabow N, Sterreicher CH, et al. Single-sex infection with female *Schistosoma mansoni* cercariae mitigates hepatic fibrosis after secondary infection. *PLoS Negl Trop Dis* (2017) 11(5):e0005595. doi:10.1371/journal.pntd.0005595
- Boissier J, Chlichlia K, Digon Y, Ruppel A, Mon H. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* (2003) 91:144–50. doi:10.1007/s00436-003-0943-1
- Picard MAL, Boissier J, Roquis D, Grunau C, Allienne J-F, Duval D, et al. Sex-biased transcriptome of *Schistosoma mansoni*: host-parasite interaction, genetic determinants and epigenetic regulators are associated with sexual differentiation. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e0004930. doi:10.1371/journal.pntd.0004930
- Sombetzki M, Fuchs CD, Fickert P, Österreicher CH, Mueller M, Claudel T, et al. 24-nor-ursodeoxycholic acid ameliorates inflammatory response and liver fibrosis in a murine model of hepatic schistosomiasis. *J Hepatol* (2015) 62(4):871–8. doi:10.1016/j.jhep.2014.11.020
- Boissier J, Moné H. Relationship between worm burden and male proportion in *Schistosoma mansoni* experimentally infected rodents and primates. A meta-analytical approach. *Int J Parasitol* (2001) 31:1597–9. doi:10.1016/S0020-7519(01)00277-6

19. Gasser RB, Morahan G, Mitchell GE. Sexing single larval stages of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* (1991) 47: 255–8. doi:10.1016/0166-6851(91)90187-B
20. Grevelding CG, Kampkötter A, Kunz W. *Schistosoma mansoni*: sexing cercariae by PCR without DNA extraction. *Exp Parasitol* (1997) 85:99–100. doi:10.1006/expr.1996.4129
21. Quack T, Doenhoff M, Kunz W, Grevelding CG. *Schistosoma mansoni*: the varying occurrence of repetitive elements in different strains shows sex-specific polymorphisms. *Exp Parasitol* (1998) 89:222–7. doi:10.1006/expr.1998.4293
22. Gaspar EB, Sakai YI, De Gaspari E. A mouse air pouch model for evaluating the immune response to *Taenia crassiceps* infection. *Exp Parasitol* (2014) 137:66–73. doi:10.1016/j.exppara.2013.12.005
23. Riengrojpitak S, Anderson S, Wilson RA. Induction of immunity to *Schistosoma mansoni*: interaction of schistosomula with accessory leucocytes in murine skin and draining lymph nodes. *Parasitology* (1998) 117:301–9. doi:10.1017/S0031182098003187
24. Incani RN, McLaren DJ. Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* (1984) 14:259–76. doi:10.1016/0020-7519(84)90077-8
25. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* (2014) 2:1. doi:10.1186/2050-7771-2-1
26. Lichtenberg F, Sher A, Gibbons N, Doughty BL. Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *Schistosoma mansoni*. *Am J Pathol* (1976) 84(3):479–500.
27. Walsh CM, Smith P, Fallon PG. Role for CTLA-4 but not CD25 + T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *Parasite Immunol* (2007) 29: 293–308. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00947.x
28. Nascimento DC, Melo PH, Piñeros AR, Ferreira RG, Colón DF, Donate PB, et al. IL-33 contributes to sepsis-induced long-term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nat Commun* (2017) 8:14919. doi:10.1038/ncomms14919
29. Siede J, Fröhlich A, Datsi A, Hegazy AN, Varga DV, Holeska V, et al. IL-33 receptor-expressing regulatory T cells are highly activated, Th2 biased and suppress CD4 T cell proliferation through IL-10 and TGFβ release. *PLoS One* (2016) 11(8):e0161507. doi:10.1371/journal.pone.0161507
30. Smith P, Walsh CM, Mangan NE, Fallon RE, Sayers JR, McKenzie AN, et al. *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol* (2004) 173:1240–8. doi:10.4049/jimmunol.173.2.1240
31. Prendergast CT, Sanin DE, Cook PC, Mountford AP. CD4+ T cell hyporesponsiveness after repeated exposure to *Schistosoma mansoni* larvae is dependent upon interleukin-10. *Infect Immun* (2015) 83:1418–30. doi:10.1128/IAI.02831-14
32. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* (2008) 13:453–61. doi:10.2741/2692
33. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* (2003) 3:733–44. doi:10.1038/nri1183
34. Kourilová P, Hogg KG, Kolárová L, Mountford AP. Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. *J Immunol* (2004) 172(6):3766–74. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3766
35. Haas W, Pietsch U. Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitol Res* (1991) 77:642–4. doi:10.1007/BF00931029
36. Brown SP, Grenfell BT. An unlikely partnership: parasites, concomitant immunity and host defence. *Proc Biol Sci* (2001) 268:2543–9. doi:10.1098/rspb.2001.1821
37. Cheever AW. Differential regulation of granuloma size and hepatic fibrosis in schistosome infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1997) 92(5):689–92. doi:10.1590/S0074-02761997000500024
38. Barron L, Wynn TA. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *Eur J Immunol* (2011) 41(9):2509–14. doi:10.1002/eji.201141869
39. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 138:666–75. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.007

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Sombetzki, Koslowski, Rabes, Seneberg, Winkelmann, Fritzsche, Loebermann and Reisinger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Danksagung und Förderung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger für die interessante Aufgabenstellung, fachliche Betreuung, Anregung und Unterstützung während der Zeit meiner Promotion herzlich danken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und die fachliche Rücksprache während der Dauer der Promotion.

Mein besonderer Dank gilt Martina Sombetzki für die jahrelange Unterstützung und gute Betreuung, sowohl in der praktischen Durchführung, als auch beim Erstellen der Publikationen und der Dissertationsschrift. Sie hat mich von Anfang an für das Thema und die Schistosomen begeistert und mir bei Misserfolgen und langen Revisionsprozessen immer motivierend zur Seite gestanden.

Für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Müller-Hilke am Institut für Immunologie und den Mitarbeitern Ilona Klamfuß und Karin Gerber vom Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock bedanken. Auch Daniel Wolter aus der Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Rostock danke ich für die technische Unterstützung.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Parasitologielabors sei an dieser Stelle für ihre Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertationsschrift und für die fachliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente, wie auch für die konstruktive Diskussionsbereitschaft gedankt. Ich empfand stets eine besondere Zusammengehörigkeit im Labor, die für mich eine besondere persönliche Unterstützung darstellte.

Aus meinem persönlichen Umfeld danke ich meinen Freunden, insbesondere Steffi Stolpmann und Katja Tornow, da sie während der Promotion immer für mich da waren, mich nach Rückschlägen emotional wiederaufgebaut und immer an mich geglaubt haben. Meinem Freund Stephan Giese, der mich schon seit dem Abitur begleitet, möchte ich dafür danken, dass er auch in schwierigen Zeiten der Promotion an meiner Seite war.

Zuletzt möchte ich den Menschen danken, die ich am meisten bewundere. Freunde, deren Liebe mich gewärmt hat; Mentoren, deren Klugheit mich geleitet hat; Ermutiger, deren Worte mich bestärkt haben, meinen Eltern.

Die Projekte und Publikationen dieser Doktorarbeit wurden im Folgenden unterstützt und gefördert:

- Durch die Gesellschaft der Internisten Mecklenburg-Vorpommern im Rahmen eines Forschungspreises als Anschubfinanzierung für das Promotionsvorhaben "Charakterisierung der murinen Immunantwort auf die eingeschlechtliche Schistosomeninfektion"
- Durch ein Doktoranden-Stipendium der Universitätsmedizin Rostock
- Durch Fördermittel der DAMP Stiftung
- Die Promotion wurde durch das Forschungsprojekt „Card-ii-Omics“ unterstützt. Die Förderung des Projektes erfolgt aus Mitteln des Europäischen Sozialfonds (ESF) im Rahmen des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbünden – Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern (ESF/14-BM-A55-0036/16).



EUROPÄISCHE UNION
Europäischer Sozialfonds



**Universitätsmedizin
Rostock**

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführte Quellen benutzt und sämtliche Textstellen die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sowie alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, den 18. Juli 2018

Dipl.-Biol. Nicole Koslowski

Beruflicher Werdegang und Publikationen

