

**Hepatozelluläre Aktivierung der Upstream- und
Downstream-Mechanismen von c-Jun
bei Infektion mit *Schistosoma mansoni***

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

vorgelegt von Jakob Julian Lichtenberger
aus Bremen

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Medizinische Klinik II und Poliklinik

Pneumologie und Internistische Intensivmedizin, Gastroenterologie und Nephrologie

Schwerpunkt Gastroenterologie

Gutachterin: Prof. Dr. Elke Roeb

Gutachterin: Prof. Dr. Linda Falgenhauer

Tag der Disputation: 10.10.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i>	2
1.2	Immunmodulation durch <i>S. mansoni</i>	5
1.3	Hepatozelluläres Karzinom und dessen Beziehung zu <i>S. mansoni</i>	6
1.4	Protoonkogen c-Jun	8
1.5	Zellzyklus, Proliferation und Seneszenz	12
1.6	Zielsetzung	15
2	Material, Methoden und Chemikalien	16
2.1	Zellkultur	17
2.1.1	Konditionen	17
2.1.2	Auftauen und Beschichten von human induced pluripotent stem-cell derived hepatocytes	17
2.1.3	Kultur der Zellen	17
2.1.4	Zellstimulation und Zellinhibition	17
2.1.5	Zellernte und Lysatproduktion	18
2.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	18
2.3	Western Blot – Semi-dry-blotting	19
2.4	Proteindetektion	20
2.5	Ladekontrolle	21
2.6	Proteome Profiler Array	21
2.7	Tierversuche	22
2.7.1	Tiermodell	22
2.7.2	Isolation von Soluble Egg Antigen und Aufreinigung von IPSE/Alpha-1	22
2.7.3	Paraffineinbettung histologischer Schnitte	23
2.7.4	Herstellung histologischer Schnitte	23
2.7.5	Immunhistochemie	23
2.7.6	Herstellung von Gewebelysaten	24
2.8	Statistische Auswertung	25
2.9	Abbildungen	26
2.10	Verwendetes Material	27
2.10.1	Chemikalien und Reagenzien	27
2.10.2	Puffer und Lösungen	28
2.10.3	Primäre Antikörper	29

2.10.4	Sekundäre Antikörper _____	30
2.10.5	Kits _____	30
2.10.6	Verbrauchsmaterialien _____	30
2.10.7	Instrumente und Geräte _____	31
2.10.8	Software _____	32
3	Ergebnisse _____	33
3.1	SEA und IPSE aktivieren das Protoonkogen c-Jun und den Transkriptionsfaktor STAT3 in induzierten humanen Hepatozyten _____	33
3.2	c-Jun wird durch SEA und IPSE über den MKK4/7-JNK-Signalweg aktiviert _____	34
3.3	SEA und IPSE induzieren Proliferations- und Apoptosemarker in hiPS-HEP-Zellen _____	36
3.4	Eine Infektion mit <i>S. mansoni</i> führt in Hamsterlebern zu einem Anstieg der Expression und Aktivierung von c-Jun sowie seinen Downstream-Faktoren _____	38
3.5	c-Jun co-lokalisiert nukleär mit den Replikationsfaktoren MCM2 und Cyclin D1 in Hepatozyten von <i>S. mansoni</i> -infizierten Hamstern _____	40
3.6	p27 wird in den Lebern infizierter Hamster verstärkt exprimiert und co-lokalisiert mit c-Jun _____	41
4	Diskussion _____	43
4.1	Aktivierung von Protoonkogenen durch SEA/IPSE _____	45
4.2	c-Jun Aktivierung über den MKK4/7-JNK Signalweg _____	47
4.3	Downstream-Effekte der c-Jun-Aktivierung _____	48
4.4	Seneszenz in Hepatozyten <i>S. mansoni</i> -infizierter Hamster _____	51
4.5	<i>S. mansoni</i> und hepatozelluläres Karzinom _____	51
4.6	Limitierungen dieser Arbeit _____	55
4.7	Ausblick auf zukünftige Forschung _____	56
5	Zusammenfassung _____	58
6	Summary _____	59
7	Abkürzungsverzeichnis _____	60
8	Abbildungsverzeichnis _____	63
9	Tabellenverzeichnis _____	64
10	Literaturverzeichnis _____	65
11	Anhang _____	74
11.1	Genehmigung Abbildung 1: Lebenszyklus von Schistosomen am Beispiel von <i>S. mansoni</i> _____	74
11.2	Lizenzvertrag Abbildung 2: MAPK-Aktivierungskaskade _____	75
12	Publikationsverzeichnis _____	81

13	Ehrenwörtliche Erklärung	82
14	Danksagung	83

1 Einleitung

Die Schistosomiasis ist eine parasitäre Infektionskrankheit, ausgelöst durch Trematoden des Genus *Schistosoma*.¹ Laut der World Health Organisation (WHO) benötigten 2019 mehr als 230 Millionen Menschen weltweit eine präventive Behandlung aufgrund von Schistosomiasis.² Weiterhin bestand für bis zu 700 Millionen Menschen ein Infektionsrisiko.^{3,4} Die Schistosomiasis kommt hauptsächlich in tropischen Entwicklungsländern in Afrika, Südamerika und Asien vor.² Alleine in Afrika sterben jährlich bis zu 300.000 Menschen an den Folgen der Schistosomiasis.⁵ Doch auch in Europa stellt die Schistosomiasis ein größer werdendes Problem dar. 2013 kam es auf Korsika zu einem Ausbruch urogenitaler Schistosomiasis, wodurch es in den Folgejahren in Spanien, Frankreich und Deutschland zu Häufungen von Schistosomiasis-Fällen kam.^{6,7} Eine Risikoeinschätzung des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) betont die Gefahr, dass sich die Erkrankung auf weitere mediterrane europäische Länder ausbreiten könnte, wodurch in der Zukunft Teile Europas zu Endemiegebieten für Schistosomen werden könnten.⁸

Es gibt fünf unterschiedliche humanpathogene Spezies der Schistosomen: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, und *S. intercalatum*. *S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. mekongi* verursachen eine hepatische und intestinale Form der Schistosomiasis, da ihre Eier teilweise im Magen-Darm-Trakt oder der Leber fixiert bleiben. *S. haematobium* hingegen ist der Auslöser der urogenitalen Form der Erkrankung.¹ Die Infektion durch Schistosomen kann sich sowohl akut als auch chronisch manifestieren. Die akute Form der Erkrankung wird als Katayama-Syndrom bezeichnet. Sie zeichnet sich durch eine systemische fieberhafte Reaktion aufgrund von Immunkomplexbildung des Körpers auf die heranreifenden Würmer aus.⁹ Symptomatisch geht das Katayama-Syndrom mit Urtikaria, allgemeinem Krankheitsgefühl, Fieber und pulmonalen Symptomen einher. Selten kommt es zu einer Beteiligung des zentralen Nervensystems mit Myelitis und Paraparese.⁹ Die chronische Form der Schistosomiasis wird durch die in den Geweben fixierten Eier der Schistosomen ausgelöst und nicht durch die Würmer selbst.¹ Im Falle von *S. mansoni* sind vor allem die Leber und der Darm betroffen.¹⁰ In den Geweben sezernieren die Eier Substanzen, die die Immunreaktion des Körpers modulieren und dadurch verhindern, dass es zu Gewebnekrose und Abtötung der Eier kommt. Stattdessen verharrt die Leber in einem Status der chronischen Inflammation und bildet Granulome um die Eier herum aus.¹ Im

Darm führt die dauerhafte Entzündung zur sogenannten chronischen schistosomalen Kolitis, welche mit unspezifischen Symptomen wie Unterbauchschmerzen, Flatulenz oder rektalen Blutungen einhergehen kann. Oft ist die Erkrankung jedoch auch nur schwach bis asymptomatisch ausgeprägt, so dass sie durch den Patienten nicht bemerkt wird.¹¹ Die Schädigung der Leber hingegen ist deutlich schwerwiegender. Durch den granulomatösen Umbau des Lebergewebes um die Eier herum, kommt es auf Dauer zu einer Fibrosierung der Leber. Folgen davon sind unter anderem die Entstehung einer nicht-zirrhotischen portalen Hypertension, Aszites, Splenomegalie und die Ausbildung von portalvenösen Kollateralkreisläufen mit Gefahr der Ösophagusvarizenbildung.^{11,12} Die einzige wirksame Therapie der chronischen Schistosomiasis besteht aus der dreitägigen Behandlung mit dem Anthelmintikum Praziquantel in einer Dosierung von 40-60 mg/kg Körpergewicht. Das Katayama-Syndrom als Akutphase der Erkrankung wird rein symptomatisch behandelt, da Praziquantel nur unzureichend gegen die heranreifenden Schistosomen wirkt.⁹

Seit den frühen 1910er Jahren werden Schistosomiasis-Infektionen mit Karzinogenese in Verbindung gebracht.¹³ *S. haematobium* wird von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als ein definitives Karzinogen für Blasenkrebs anerkannt.¹⁴ Für andere Formen der Schistosomiasis ist eine solche Verbindung weniger klar, trotzdem werden seit längerer Zeit sowohl *S. japonicum* als auch *S. mansoni* als mögliche Karzinogene für Darm- und Leberkrebs diskutiert.^{15,16} Bis jetzt gibt es keinen klaren Beweis für eine direkte Beziehung zwischen *S. mansoni* und Krebsentstehung. Allerdings verdichten sich die Hinweise auf eine indirekte Beziehung. Eine Langzeitstudie mit ägyptischen Patienten hat gezeigt, dass eine Co-Infektion mit *S. mansoni* und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) die Inzidenz und Aggressivität von Leberkrebs, im Vergleich zu Patienten die nur mit dem HCV infiziert waren, erhöhen kann.¹⁷

1.1 Lebenszyklus von *S. mansoni*

Bei der Krankheit Schistosomiasis handelt es sich um eine parasitäre Infektion des Menschen durch Trematoden (Saugwürmer) des Genus *Schistosoma*. *S. mansoni* ist ein Auslöser der intestinalen und hepatischen Form der Schistosomiasis.¹ Schistosomen haben, im Gegensatz zu den meisten anderen Trematoden, zwei Geschlechter. Die ausgewachsenen Schistosomen des Genus *S. mansoni* sind zwischen 7-20 mm lang und leben in dem venösen Gefäßplexus des Darms.¹⁸ Dort vermehren sich die Trematoden sexuell, und die weiblichen Schistosomen produzieren mehrere hundert Eier pro Tag.

Diese Eier penetrieren und durchwandern die Darmwand, um daraufhin mit dem Stuhl ausgeschieden zu werden. Ein Teil der Eier wird jedoch nicht ausgeschieden, sondern bleibt entweder in der Darmwand fixiert oder wird hämatogen über den Portalkreislauf weiter bis zu den Sinusoiden der Leber getragen. Dort infiltrieren die Eier die Leber und führen zur Granulombildung.¹ Unabhängig davon ob die sie ausgeschieden werden oder im Körper verweilen, sind die Eier nachdem sie durch die weiblichen Würmer gelegt wurden, für ein bis zwei Wochen lebensfähig.¹ Sobald die Eier in Kontakt mit Süßwasser kommen, schlüpfen die Miracidia, die erste Larvenform der Schistosomen. Im Wasser suchen die Miracidia, geleitet durch Licht und chemische Reize nach ihrem intermediären Wirt, den *Biomphalaria*-Schnecken.¹⁸ Die Miracidia infiltrieren die Schnecke und vermehren sich zunächst asexuell zu multizellulären Sporozysten. Daraus entwickeln sich schließlich die Zerkarien als humanpathogene, zweite Larvenform der Schistosomen. Diese Transformation dauert insgesamt vier bis sechs Wochen. An deren Ende kann jede infizierte Schnecke einige tausend Zerkarien pro Tag ausscheiden.¹⁸ Nachdem die Zerkarien ihren intermediären Wirt verlassen haben, können sie bis zu 72 h im Süßwasser verweilen, bis sie einen Menschen, als ihren definitiven Wirt finden oder schließlich absterben.¹⁸ Sobald die Zerkarien in Kontakt mit der Haut des Wirts kommen, beginnen sie diese zu penetrieren. Wenn die Zerkarien ein Blutgefäß erreichen, entwickeln sie sich zu sogenannten Schistosomulae.¹⁹ Getrieben durch das Blut migrieren die Schistosomulae dann über die Lunge zur Leber, wo sie wiederum für vier bis sechs Wochen in den Portalvenen zu erwachsenen Schistosomen heranreifen.^{1,19} Die erwachsenen Schistosomen paaren sich und migrieren in den Gefäßplexus des Darmes, wo mit dem Start der Eiproduktion der Zyklus von vorne beginnt (Abbildung 1).^{1,13,18,19} Ein Schistosomenpaar lebt im Schnitt drei bis fünf Jahre, einige können allerdings auch für bis zu 30 Jahre überleben. In dieser Zeit kann ein Schistosomenpaar theoretisch mehrere Millionen Eiern produzieren.¹⁸

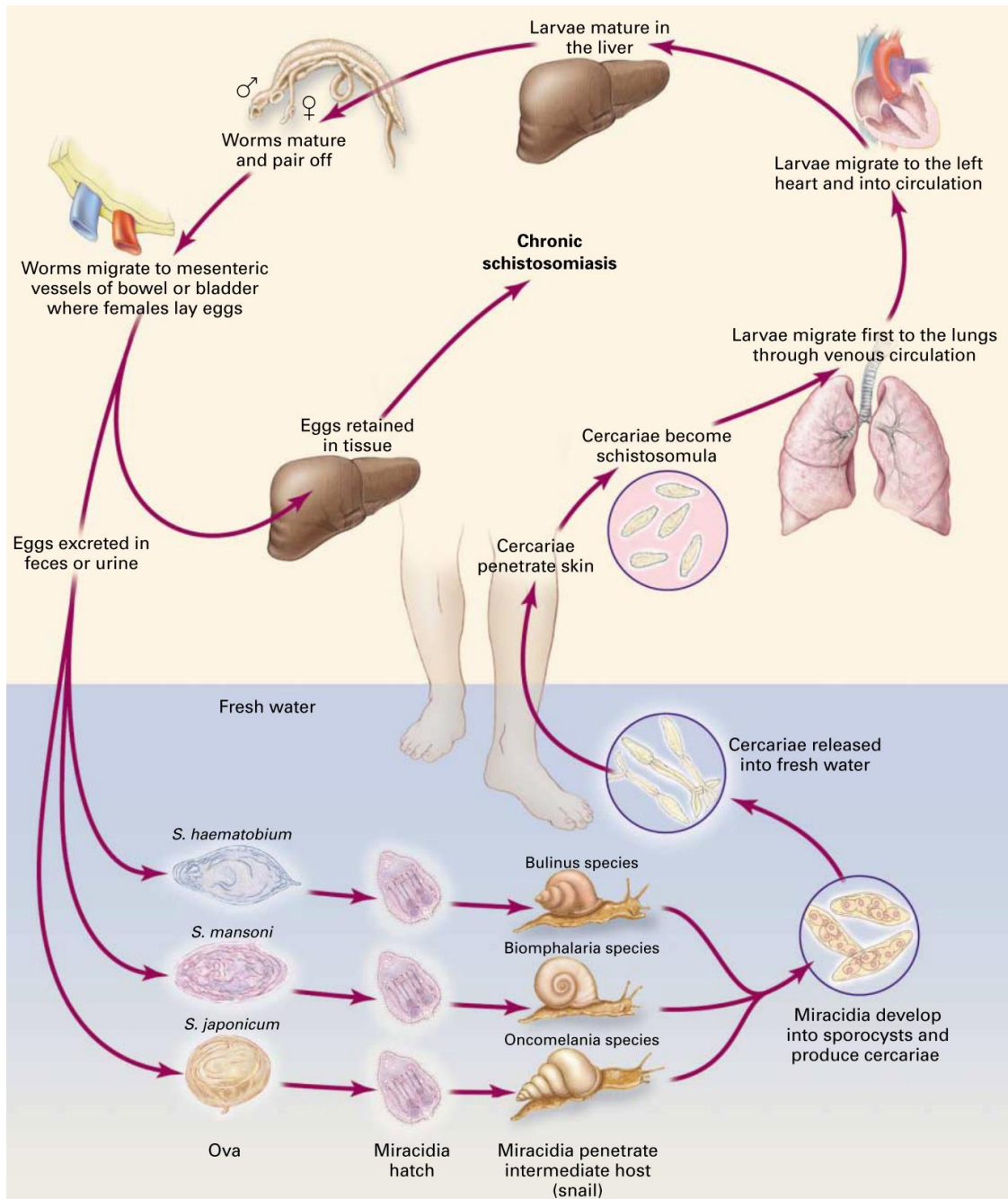


Abbildung 1: Lebenszyklus von Schistosomen am Beispiel von *S. mansoni*. Eier, die vom menschlichen Wirt mit dem Stuhl ausgeschieden werden, schlüpfen bei Kontakt mit Süßwasser. Die aus den Eiern geschlüpften Larven, auch Miracidien genannt, infizieren Süßwasserschnecken vom Genus *Biomphalaria* als ihren intermediären Wirt. In den Schnecken entwickeln sich die Miracidien zu Sporozysten, welche sich asexuell vermehren und Zerkarien produzieren. Zerkarien sind die für Menschen infektiöse, frei schwimmende Larvenform der Schistosomen. Nach circa 30 Tagen verlassen die Zerkarien die Schnecken und persistieren im Süßwasser, bis sie in Kontakt zur Haut ihres definitiven Wirts, des Menschen, kommen. Sie penetrieren die Haut und entwickeln sich zu Schistosomulae, die hämatogen über Lunge und Herz bis zum portalvenösen System der Leber strömen. Dort reifen die Schistosomulae zu den erwachsenen Schistosomen heran. Die ausgereiften Würmer migrieren zu den mesenterischen Venen des Darms, wo sie sich sexuell vermehren und die Weibchen anfangen Eier zu produzieren. Die Eier werden in den Blutstrom abgegeben, durchwandern die Darmwand und werden mit dem

Stuhl ausgeschieden. Reproduced with permission from Ross AGP, Bartley PB, Sleigh AC, et al. Schistosomiasis. New England Journal of Medicine. 2002, Copyright Massachusetts Medical Society.¹⁹

1.2 Immunmodulation durch *S. mansoni*

Ein wichtiger Überlebensmechanismus für Helminthen besteht darin, die Immunantwort des Wirts zu modulieren, um diesen chronisch besiedeln zu können.²⁰ Ein Beispiel für einen Parasiten, der die Immuntoleranz seines Wirts beeinflusst, ist die Abschwächung der Entzündung während der asymptomatischen Phase der Zystizerkose. Dabei handelt es sich um eine neurologische Erkrankung, ausgelöst durch Zysten des Bandwurms *Taenia solium*.²⁰ Ein weiteres Beispiel ist die Induktion von regulatorischen T-Zellen (Treg) durch den Darmspulwurm *Heligmosomoides polygyrus*, welche die Immunantwort des Wirts auf den Parasiten abschwächen kann.²⁰

Die Immunantwort während einer *S. mansoni*-Infektion verläuft in verschiedenen Phasen. Sobald Eier im Lebergewebe fixiert bleiben, kommt es im umgebenden Gewebe zur Infiltration von Fibroblasten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten.¹⁰ Diese Zellen bilden fibröse Granulome um die Eier herum aus. Nach der initialen Immunantwort migrieren dann auch T- und B-Zellen als Effektoren der spezifischen Immunantwort in das angrenzende Lebergewebe um die Granulome.¹⁰ Bei der spezifischen Immunantwort können, getrieben durch die T-Helferzellen (Th-Zellen), zwei unterschiedliche Arten unterschieden werden.²¹ Die Th1-fokussierte Immunantwort vermittelt eine zelluläre Immunität durch zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und Monozyten. Die Th2-fokussierte Immunantwort hingegen, fungiert primär über humorale Immunmechanismen wie Antikörperproduktion durch B-Zellen.²¹ Vermittelt werden diese unterschiedlichen Abwehrmechanismen über das Zytokinprofil, welches durch die Th-Zellen ausgeschüttet wird.²² Th1-Zellen produzieren vor allem proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon γ (INF γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), die eine akute Entzündungsreaktion induzieren. Th2-Zellen hingegen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die die Th1-vermittelte Entzündungsreaktion eindämmen und die Granulomausbildung moderieren.²²

Während der Larvenzeit der Schistosomen ist die Immunreaktion des Körpers primär Th1-fokussiert, nach der Eiablage hingegen tritt ein Wechsel zu einer Th2-fokussierten Immunantwort auf. Tierexperimentelle Studien in Mäusen haben gezeigt, dass diese Veränderung der Immunabwehr nur in bisex-infizierten Individuen stattfindet, was

dafürspricht, dass die Eier für diesen Wechsel verantwortlich sind.^{23,24} Der Mechanismus, über den die Schistosomen den Wechsel einer Th1- zu einer Th2-Immunantwort verursachen, involviert dendritische Zellen (DC).²⁵ Soluble egg antigen (SEA), ein lösliches Extrakt aus Schistosomeneiern, ist in der Lage, DCs zu induzieren eine Th2-Antwort zu fördern und tolerogen gegenüber den *S. mansoni*-Eiern zu werden.^{25,26} SEA enthält unter anderem den Stoff Omega-1, welches in DCs über den Mannose-Rezeptor eindringen kann und die Proteinsynthese durch Degradation der RNA behindert.²⁷ Dies verleitet dendritische Zellen dazu, eine Th2-fokussierte Immunreaktion zu induzieren, was einen Schutzmechanismus der Eier gegen die deutlich effektivere Th1-fokussierte Immunantwort darstellt.^{26,27}

1.3 Hepatozelluläres Karzinom und dessen Beziehung zu *S. mansoni*

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die fünfthäufigste Krebsart weltweit und schätzungsweise für die viertmeisten Krebstoten verantwortlich.^{28,29} Das Auftreten von HCC ist dabei weltweit ungleichmäßig verteilt.²⁹ Die meisten HCC Fälle treten in Sub-Sahara-Afrika oder Ostasien auf (Inzidenz: >20/100.000 Einwohner).^{29,30} In den westlichen Ländern sind die HCC-Inzidenzen vergleichsweise eher niedrig. (Inzidenz: <5/100.000 Einwohner).²⁹ Auch zwischen den Geschlechtern gibt es deutliche Unterschiede. Leberkrebsraten in den verschiedenen Ländern sind bei Männern doppelt bis dreifach höher als bei Frauen.³¹ Das durchschnittliche Alter für jemanden aus einer Niedrig-Risiko-Population wie den USA, eine HCC-Diagnose zu erhalten, liegt bei über 75 Jahren. In Hoch-Risiko-Gebieten wie Sub-Sahara-Afrika liegt das durchschnittliche Alter bei Diagnose hingegen zwischen 60-65 Jahren und somit deutlich niedriger.³² Der Grund für die verschiedenen Leberkrebsraten in den unterschiedlichen Ländern liegt in der Verteilung von Hauptrisikofaktoren.²⁹ Zu diesen gehören vor allem Hepatitis-B-Virus- (HBV) und Hepatitis-C-Virus-Infektionen, hoher Alkoholkonsum und die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD).³⁰ Insgesamt lassen sich jedoch bis zu 80 % aller primären Leberkrebsarten auf eine chronische HBV- oder HCV-Infektion zurückführen, wodurch diese selbst unter den Hauptrisikofaktoren, als die mit Abstand schwerwiegendsten Risikofaktoren herausstechen.²⁸ In den meisten Hochrisikogebieten für HCC sind HBV und HCV endemisch und die Gesundheitssysteme der Länder nicht in der Lage, eine wirksame Behandlung der chronischen Infektionen zu finanzieren.^{33,34} Der Unterschied zwischen den Geschlechtern lässt sich am wahrscheinlichsten durch einen ungesünderen Lebensstil von Männern erklären. Ursachen dafür könnten ein durch gefährlicheres sexuelles Verhalten erhöhtes

Risiko an HBV oder HCV zu erkranken und ein erhöhter Alkohol- und Zigarettenkonsum sein.³²

Die wichtigste Prädisposition zur Entwicklung eines HCC ist die Leberzirrhose, die gleichzeitig die Endstrecke für die meisten chronischen Lebererkrankungen, wie HBV- oder HCV-Infektionen, NAFLD oder Alkoholabusus darstellt.^{30,35} Die Leberzirrhose ist dadurch charakterisiert, dass es durch Entzündungs- und fibrotische Umbauprozesse zu einem Parenchymverlust und Untergang der normalen Leberstruktur kommt.³⁶ Dadurch verliert die Leber an funktionalem Gewebe, wodurch es zu einer Einschränkung der Synthese- und Entgiftungsfunktion der Leber kommt. Außerdem erhöht sich der portalvenöse Druck, wodurch es zur portalvenösen Hypertonie und anschließend zu Aszites-Bildung kommen kann.³⁶ Eine Leberzirrhose verursacht ein mehr als 30-fach erhöhtes Risiko einer HCC-Entwicklung.³⁵ Patienten mit einer Leberzirrhose, haben abhängig von den zusätzlich vorliegenden Risikofaktoren, ein kumulatives 5-Jahres-Risiko von 8 bis 21 % für ein HCC.³⁵ Dies ist problematisch, weil bei Leberzirrhose die Lebersynthesefunktion noch lange Zeit suffizient durch das restliche, gesunde Lebergewebe kompensiert werden kann. Dadurch können die Patienten solange klinisch unauffällig bleiben, bis die Leberfunktion schließlich einbricht und es zum Leberversagen kommt, oder Symptome aufgrund von fortgeschrittenem Leberkrebs auftreten.³⁴ Dies führt dazu, dass bis zu 20 % der erstmals mit HCC diagnostizierten Patienten sich gleichzeitig mit einer bis dato nicht diagnostizierten Leberzirrhose vorstellen.³⁴

Neben HBV und HCV gibt es noch andere Infektionen, die mit hepatozellulärer Karzinogenese in Verbindung gebracht werden. Zu diesen zählen beispielsweise das Bakterium *Helicobacter pylori* und der Leberwurm *Clonorchis sinensis*.^{37,38} Infektionen mit diesen Erregern alleine scheinen nicht zur HCC-Entwicklung zu führen, jedoch potenzieren sie die hepatozelluläre Karzinogenese bei Co-Infektion mit HBV oder HCV.^{37,38} Das gleiche gilt wahrscheinlich auch für *S. mansoni* und das HCC. Co-Infektionen mit *S. mansoni* und HBV/HCV sind sehr häufig in Ländern, in denen *S. mansoni* endemisch vorkommt. In Ägypten rangiert die Prävalenz von *S. mansoni*- und HBV-Co-Infektionen zwischen 19,6 % und 33 %, Co-Infektionen von *S. mansoni* und HCV zeigen eine Prävalenz von ungefähr 27 %.³⁹ Klinische Studien mit ägyptischen Patienten haben gezeigt, dass *S. mansoni* in HBV- oder HCV-co-infizierten Patienten im Vergleich zu HBV- oder HCV-Monoinfektionen sowohl die Geschwindigkeit erhöht mit der sich eine Leberzirrhose entwickelt, als auch die HCC-Inzidenz steigert. In diesen

Studien trat das HCC früher auf und verhielt sich aggressiver.^{17,40,41} Weiterhin hat eine Studie in Mäusen gezeigt, dass zur chemischen Induktion von HCC eine niedrigere Dosis an Karzinogen notwendig war, wenn die Mäuse mit *S. mansoni* infiziert waren, verglichen mit gesunden Kontrollmäusen.⁴² Außerdem verhielt sich der auftretende Krebs in den *S. mansoni*-infizierten Mäusen aggressiver als in den Kontrollmäusen.⁴²

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, über die *S. mansoni* die Karzinogenese fördern könnte. Wie bei der chronischen Erkrankung scheint die prokarzinogene Wirkung durch die Eier und nicht durch die Würmer ausgelöst zu werden.⁴³ Die im Lebergewebe fixierten Eier verursachen eine chronische Entzündung, erzeugen oxidativen Stress, verändern die Immunantwort und können direkt onkogene Signalwege in den Hepatozyten aktivieren.^{43,44}

Obwohl verschiedene potentiell karzinogene Mechanismen bekannt sind,^{15,42,44} über die *S. mansoni* das Krebsgeschehen fördern könnte, deuten alle Hinweise bis jetzt drauf hin, dass *S. mansoni* nicht alleine zur Entstehung eines HCC führt.^{17,40,45} In Kombination mit einer weiteren schädigenden Noxe kann eine *S. mansoni*-Infektion jedoch den bestehenden Schaden potenzieren. Dadurch kann es zu einer schnelleren Verschlechterung der Leberfunktion, früherem Auftreten von Zirrhose und schließlich zum HCC kommen.

1.4 Protoonkogen c-Jun

Die Jun-Proteinfamilie besteht aus den drei verschiedenen Proteinen JunB, c-Jun und JunD.⁴⁶ Die Jun-Proteine stellen einen Teil des Aktivatorprotein-1 (AP-1)-Komplexes dar. Der AP-1-Komplex ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zellproliferation in Antwort auf extrazelluläre Wachstumsreize anregt.⁴⁷ Er besteht aus Dimeren, welche sich aus Teilen der Jun-, Fos-, ATF- und Maf-Familie zusammensetzen und spielt eine Schlüsselrolle in der mitogenen Antwort einer Zelle auf Wachstumsreize.⁴⁸ Von allen Jun-Proteinen hat c-Jun die höchste DNA-Bindungsaffinität. Es induziert Zellproliferation, indem es die Expression von Proteinen wie Cyclin D1 fördert, die den Zellzyklus vorantreiben.⁴⁶ Gleichzeitig ist c-Jun auch in der Lage, die Expression von Tumorsuppressorgenen zu unterdrücken. Dementsprechend gilt c-Jun als ein Protoonkogen.^{46,49} JunB hingegen hat den gegenteiligen Effekt, indem es die Expression von Tumorsuppressorgenen verstärkt und Cyclin D1 hemmt.⁴⁶ Somit ist die Komposition des AP-1-Komplexes maßgeblich für seine Funktion verantwortlich.⁴⁶ Die Phosphorylierung der Jun-Proteine bestimmt ihre DNA-Bindungsaffinität und stellt somit

neben der Expressionsmenge einen weiteren Steuerungsmechanismus des AP-1-Komplex dar.⁵⁰

Die Regulation der c-Jun-Aktivierung ist komplex und involviert eine Vielzahl verschiedener Proteine. C-Jun kann an 5 verschiedenen Serin- oder Threonin-Stellen phosphoryliert werden. Drei dieser Phosphorylierungsstellen liegen am C-terminalen Ende und vermindern die DNA-Bindungsaffinität. Die anderen beiden Phosphorylierungsstellen liegen am N-terminalen Ende und erhöhen die DNA-Bindungsaffinität.⁴⁷ Die Phosphorylierungen von c-Jun werden maßgeblich durch die Gruppe der Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) reguliert.⁵¹ Zu ihnen zählen die extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), p38 und die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK). JNK wird auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet.⁴⁷ ERK-Aktivierung führt zu einer Dephosphorylierung von c-Jun am C-terminalen Ende, während JNK-Aktivierung zu einer Phosphorylierung am N-terminalen Ende führt. Beide Mechanismen resultieren in einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität von c-Jun.⁴⁷ Die Aktivierung von MAPK ist der Endpunkt einer komplexen Aktivierungssequenz von Kinasen (Abbildung 2). MAPK werden durch so genannte MAPK-Kinasen, auch als MAP2K bezeichnet, phosphoryliert und somit aktiviert.⁵² Im Falle von JNK sind die zugehörigen MAP2K die Kinasen MKK4 und MKK7.⁵² Die MAP2K werden wiederum durch MAP3K aktiviert. Viele verschiedene Stimuli können eine Induktion dieser Aktivierungssequenz auslösen, beispielsweise oxidativer Stress, extra- und intrazelluläre Pathogene oder inflammatorische Zytokine.⁵³ All diesen ist gemeinsam, dass sie die Zelle in einen Stresszustand versetzen, woher auch der Name der Stress-aktivierten Proteinkinasen für JNK stammt.⁵⁴ Obwohl sie als c-Jun-N-terminale Proteinkinase bezeichnet wird, weiß man, dass JNK knapp 100 verschiedene Substrate besitzt. Einige dieser Substrate befinden sich im Zellplasma und andere, wie c-Jun, befinden sich im Zellkern.⁵⁴ Um nukleäre Substrate zu aktivieren, transloziert phosphoryliertes JNK in den Nukleus, wo es mit Proteinen wie c-Jun interagiert.⁵⁴ Phosphoryliertes c-Jun ist relativ instabil und existiert deswegen nur für eine kurze Zeit im Zellkern. Um eine dauerhafte Erhöhung der AP-1-Aktivität zu verursachen, ist deswegen eine stetige Erhöhung des c-Jun-Spiegels nötig.⁴⁷ Der AP-1-Komplex selbst kann als Transkriptionsfaktor die Expression von c-Jun fördern. Dadurch kann eine kurzzeitige Aktivitätssteigerung von c-Jun durch Phosphorylierung via JNK, eine AP-1-Formation einleiten. Die AP-1-Formation erhöht dann wiederum die Expression von c-Jun. So entsteht ein

autokriner Feedback-Mechanismus, über den eine c-Jun-Phosphorylierung zu einer Steigerung der Gesamtspiegels von c-Jun führen kann.^{47,54}

Die Funktionen von c-Jun sind vielfältig; es fördert die Zellzyklusprogression über die Expression von Proteinen wie Cyclin D1 und unterdrückt das Tumorsuppressorgen p53, wodurch ein Zellzyklusarrest behindert wird.^{46,50,51} Unter bestimmten Umständen ist c-Jun jedoch auch in der Lage, einen gegenteiligen Effekt zu bewirken und Apoptose in Zellen einzuleiten.⁴⁶ Die unterschiedlichen Funktionen von c-Jun hängen stark von den Zuständen der Zelle ab. Deshalb ist es immer wichtig, nicht nur die Menge an c-Jun und phosphoryliertem c-Jun zu betrachten, sondern auch die Downstream-Ziele in die Interpretation der c-Jun-Aktivität einzubeziehen.⁴⁶

Als ein Induktor von Zellproliferation und Zellüberleben stellt c-Jun ein wesentliches Target der Karzinogenese dar. Überexpression von c-Jun lässt sich in vielen verschiedenen Krebsarten nachweisen, auch im Rahmen der Entstehung eines HCC.⁵⁵ Es kann die Krebszellproliferation fördern und als negativer Regulator von p53 den Krebszellen einen Überlebensvorteil gegen p53-induzierten Zelltod bieten.⁵⁰ Es wurde gezeigt, dass die Dysregulation von c-Jun sowohl die HBV-assoziierte Karzinogenese als auch die chemische Induktion von HCC in Mäusen fördern kann.⁵⁶ Dabei scheint c-Jun das Überleben von Hepatozyten nach Krebsbildung und die dysplastische Progression des Tumors zu fördern.⁵⁶ Eine c-Jun-Überexpression geht Hand in Hand mit einer erhöhten JNK-Aktivität, und JNK ist in der Lage, noch viele weitere karzinogene Signalwege zu aktivieren.⁵⁴ Es kann die Expression und/oder Aktivierung von anderen Proteinen, die in der HCC-Entwicklung involviert sind, erhöhen. Beispiele hierfür sind signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) oder nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B).⁵⁷ Außerdem kann JNK die Immunevasion der Tumoren fördern, indem es die Aktivierung der Immunmodulatoren transforming growth factor β (TGF- β) und INF γ reguliert.⁵⁷ Des Weiteren erhöht JNK die Autophagie-Kapazität der Zellen und wirkt so Tumorzell-induzierter Apoptose entgegen.⁵⁷

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass JNK und c-Jun die finale Strecke einer langen Aktivierungskaskade als Antwort auf verschiedene Stresssignale darstellen, die entscheidend für die Zellproliferation und das Überleben der Zelle sind. Eine Dysregulation der JNK- und c-Jun-Aktivität lässt sich in vielen Tumoren nachweisen. In solchen Tumoren fördern JNK/c-Jun die Tumorphiliferation, Immunevasion und

Apoptoseresistenz der malignen Zellen. Sie stellen somit ein Schlüsselement im Konzept der malignen Entartung von vielen Krebszellen dar.

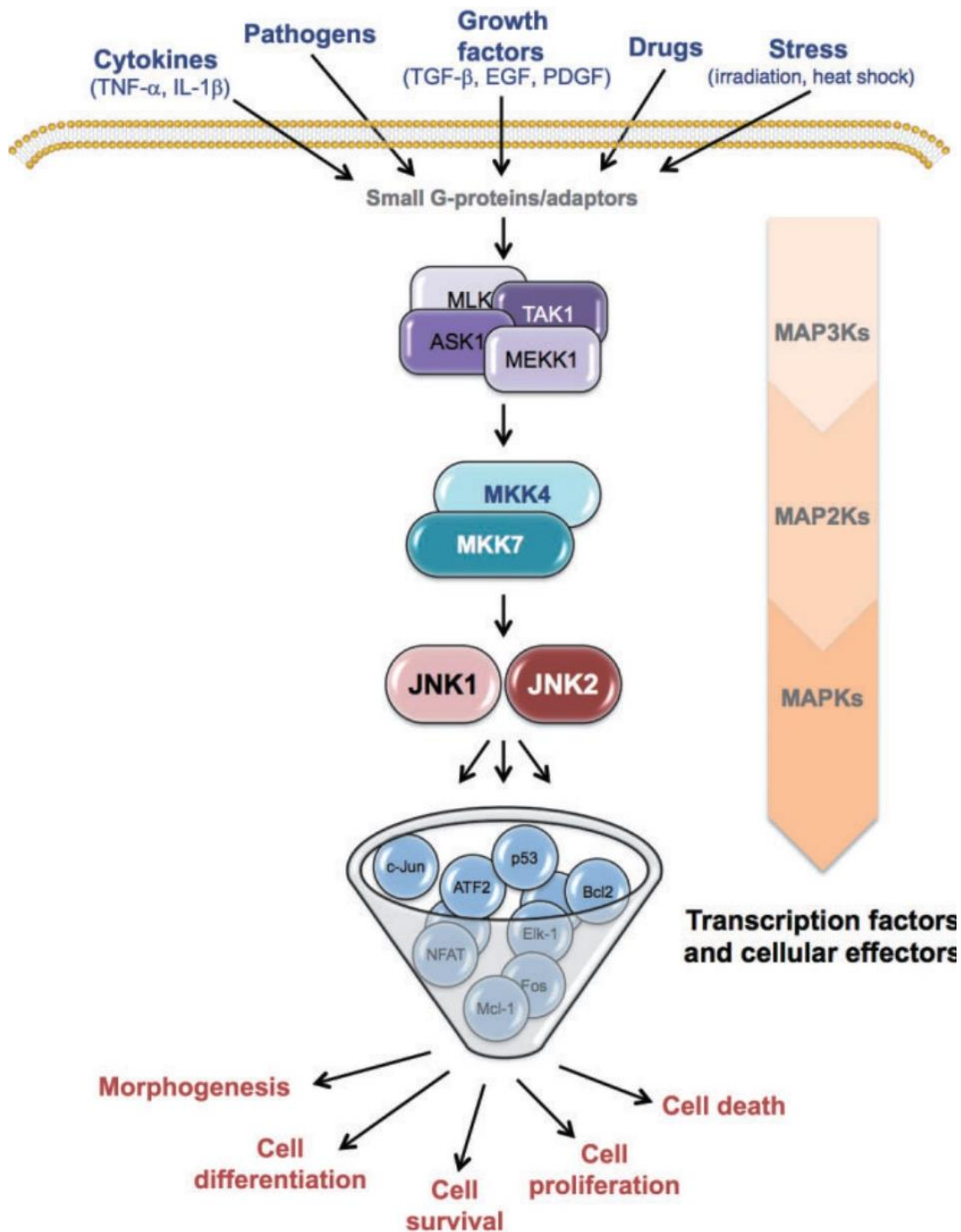


Abbildung 2: MAPK-Aktivierungskaskade. Äußere Signale führen in der Zelle zur Aktivierung von MAP3K, die daraufhin die MAP2K MKK4/7 aktivieren. MKK4/7 phosphorylieren dann wiederum JNK, was im phosphorylierten Zustand in den Zellkern transloziert, um dort nukleäre Substrate wie c-Jun zu aktivieren. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung des Verlags John Wiley and Sons aus der Publikation JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets zur Verfügung gestellt.⁵³

1.5 Zellzyklus, Proliferation und Seneszenz

Zellproliferation bezeichnet das schnelle Wachstum von Zellen durch Zellteilung und Zellvergrößerung.⁵⁸ Bei der Zellvergrößerung nimmt lediglich das Volumen der Zellen zu, während die Anzahl der Zellen konstant bleibt.⁵⁸ Zellteilung bezeichnet die Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen, welche beide einen vollen Satz an DNA enthalten. Sie findet am Ende des Zellzyklus statt, nachdem die Zelle sich zunächst durch Vergrößerung und Replikation der DNA auf die bevorstehende Teilung vorbereitet hat.⁵⁹ Der Zellzyklus besteht aus vier verschiedenen Phasen, die G₁-, S-, G₂- und M-Phase. In der G₁-Phase bereitet sich die Zelle durch Zellwachstum mit Vermehrung von Zytoplasma und Zellorganellen auf die bevorstehenden Schritte vor.⁶⁰ Die S-Phase, auch Synthese-Phase genannt, zeichnet sich durch die hier stattfindende Replikation der DNA aus. Der DNA-Doppelstrang wird durch DNA-Helikasen entwunden und neue DNA-Stränge durch DNA-Polymerasen synthetisiert.⁵⁹ In der G₂-Phase bereitet sich die Zelle durch erneutes Wachstum und die Synthese spezifischer Proteine auf die bevorstehende Mitose vor. Außerdem wird überprüft, ob die DNA-Replikation fehlerfrei erfolgte.^{59,60} In der M-Phase, oder Mitose, findet zunächst die Kernteilung (Karyokinese) statt.⁵⁹ Die Karyokinese selbst kann in 5 verschiedene Phasen unterteilt werden, die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase.⁶⁰ An deren Ende sind die Chromosomen gleichmäßig auf zwei Zellkerne aufgeteilt. Es folgt die Zellteilung (Zytokinese), bei der aus einer Zelle mit zwei Zellkernen, zwei Tochterzellen mit je einem Zellkern und einem vollen Satz an Chromosomen entstehen.⁵⁹

Der Wechsel von einer Zellzyklusphase in die nächste wird von sogenannten Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK) und ihren Cyclin-Partnern kontrolliert.⁶¹ Die meisten differenzierten Zellen verweilen in der sogenannten G₀-Phase, in der sie den Zellzyklus verlassen, aber noch metabolisch aktiv bleiben.⁵⁹ Von dort aus können die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten, sollte eine erneute Zellvermehrung nötig werden.⁵⁹ Die Entscheidung, ob eine Zelle sich teilt oder nicht, wird in der G₁-Phase getroffen. Der Eintritt in die S-Phase markiert quasi einen Punkt ohne Wiederkehr. Das bedeutet, die Zelle wird sich definitiv teilen; es sei denn, ein erheblicher DNA-Schaden verhindert dies.⁶² Der Wechsel von der G₁- in die S-Phase wird durch Cyclin D, Cyclin E und ihre zugehörigen CDKs kontrolliert.⁶² An diesem Punkt kann die Replikation gestoppt werden, um die Replikation geschädigter DNA zu vermeiden. DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) werden von den Proteinen ATM und γ -H2AX markiert.⁶⁰ Diese leiten die Aktivierung der DNA-damage-response (DDR) der Zelle ein und führen so zur

Aktivierung von p53, Chk1 und Chk2.⁶⁰ Aktiviertes p53 induziert die Expression von p21, was die Cyclin D/E-CDK-Komplexe inaktiviert und dadurch die Zellzyklus-Progression aufhält.^{60,63,64}

Die Cyclin D-Expression wird durch viele verschiedene Transkriptionsfaktoren kontrolliert, darunter auch AP-1 und STAT3. Es ist ein Downstream-Ziel des MAPK-Signalweges und stellt eine der Möglichkeiten dar, wie dieser Signalweg die Zellproliferation fördern kann.⁶² Gesteigerte Cyclin D-Spiegel können in bis zu 13 % aller Tumoren nachgewiesen werden.⁶² Cyclin E-Expression hingegen wird durch den Transkriptionsfaktor E2F und das Tumorsuppressorgen Retinoblastoma-Protein (pRB) kontrolliert.^{60,62}

Während der S-Phase wird die DNA durch DNA-Polymerasen repliziert. Der Führungsstrang wird durch die DNA-Polymerase ϵ synthetisiert, während der Folgestrang durch die DNA-Polymerase δ repliziert wird.⁶⁵ Bevor die DNA-Polymerasen jedoch mit der Synthese der DNA beginnen können, muss die DNA durch eine Helikase, bestehend aus dem mini-chromosome maintenance complex (MCM) 2-7, entwunden werden.⁶⁶ Eine erhöhte Expression von MCM-Proteinen kann in verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden. MCM2 wird heutzutage neben Ki-67 als einer der wichtigsten histologischen Marker für Proliferation genutzt.⁶⁷ In einigen Fällen hat sich gezeigt, dass MCM2 der exakteste Marker für Proliferation und Prognose ist, besser sogar als der vorher genutzte Marker Ki-67.⁶⁸ Als Teil der replikativen Helikase wird MCM2 nur in aktiv proliferierenden Zellen und Zellen, die sich auf die Proliferation vorbereiten, exprimiert.^{67,68}

Ein hoher Replikationsdruck durch Wachstumsfaktoren, Karzinogene oder andere Stressoren kann das Auftreten von Replikationsfehlern begünstigen. Dies kann zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen, was die zelluläre DDR einleitet.⁶⁹ ATM und γ -H2AX markieren den Ort der Schädigung und aktivieren p53 und die Chk-Moleküle.⁶⁰ Bei geringer Schädigung kann die Zelle versuchen den Schaden zu reparieren und weiter zu proliferieren. Übersteigt der Schaden das Reparaturpotenzial der Zelle muss sie verhindern, dass fehlerhafte DNA repliziert wird. Dafür kann sie entweder Apoptose über den intrinsischen Weg einleiten oder in Seneszenz eintreten.⁶⁹

Zelluläre Seneszenz ist durch den irreversiblen Stillstand des Zellzyklus bei gleichzeitiger metabolischer Aktivität charakterisiert.⁷⁰ Es werden zwei verschiedene Arten von Seneszenz unterschieden. Die replikative Seneszenz ist das natürliche Schicksal aller

somatischen Zellen. Keine somatische Zelle ist in der Lage, für immer zu proliferieren, ohne die Integrität der DNA zu gefährden. Mit jedem Replikationszyklus verkürzen sich die Telomere und die Zelle würde funktionelle DNA verlieren, sobald die Telomere zu stark abgebaut sind.⁷¹ Dieser Mechanismus trägt zur genomischen Stabilität der Zellen eines Organismus bei. Stammzellen und die meisten Krebsarten umgehen dieses Problem indem eine dysregulierte Telomerasen-Funktion die Möglichkeit der endlosen Replikation sichert.⁷²

Die zweite Art von Seneszenz wird als Stress-induzierte Seneszenz bezeichnet und ist eine Antwort der Zelle auf bestimmte Gefahren, die die Integrität der DNA bedrohen. Beispiele hierfür sind oxidativer Stress, ein erheblicher DNA-Schaden oder Onkogenaktivität.⁷⁰ Letztere wird auch als Onkogen-induzierte Seneszenz bezeichnet. Das bedeutet, dass die Zelle aufgrund von Onkogenaktivität zur Hyperproliferation und Transformation getrieben wird. Darauf reagiert die Zelle mit einem permanenten Arrest des Zellzyklus und dem Eintritt in die Seneszenz, um eine maligne Degeneration zu verhindern.^{71,72}

Seneszenz wird vorwiegend über zwei verschiedene Signalwege induziert.⁷² p53 aktiviert p21 und p16, was die Phosphorylierung von pRB verhindert. p21 und p16 sind CDK-Inhibitoren und verhindern so die Progression durch den Zellzyklus.⁷³ pRB bindet in seinem unphosphorylierten Status den Transkriptionsfaktor E2F, was die Expression vieler E2F-Zielgene stoppt, welche für den Eintritt und die Progression durch die S-Phase benötigt werden.⁶² Eine weitere Möglichkeit Seneszenz einzuleiten, wird über den PTEN-p27-Signalweg reguliert. p27 ist ein Inhibitor des CDK2-Cyclin E Komplexes, der den Fortschritt des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase verhindert.^{62,72,73}

Die Induktion von Seneszenz ist ein wichtiger zellulärer Mechanismus, der den Organismus gegen maligne Entartung schützt. Seneszenz ist sowohl von einer funktionellen DDR, als auch den Tumorsuppressorgenen p53, p21 und p27 abhängig. Zellen, die unter einem hohen proliferativen Stress stehen, können immer noch entarten, wenn das DNA-Schadensausmaß die Kapazität der DDR übersteigt und die Signalwege zur Einleitung von Seneszenz durch somatische Mutationen behindert werden.

1.6 Zielsetzung

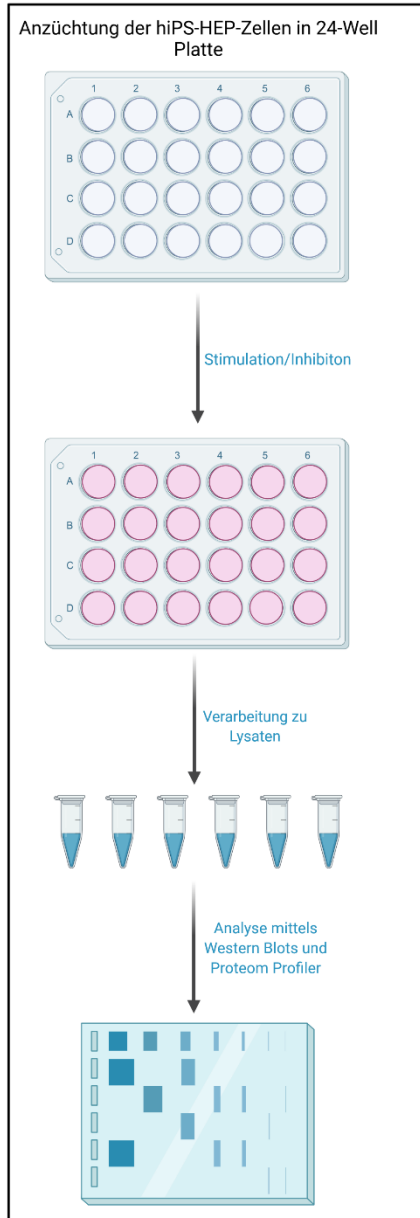
In der Arbeitsgruppe von Prof. Roeb haben wir gezeigt, dass eine *S. mansoni*-Infektion in den Lebern infizierter Hamster zu einer erhöhten Expression des Protoonkogens c-Jun führt.⁷⁴ Des Weiteren konnten wir in den Hepatozyten nahe den Granulomen DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen durch den Marker γ -H2AX nachweisen. Zellkulturversuche mit Human Hepatoma-7-Zellen (HuH-7-Zellen), die mit SEA oder IPSE stimuliert wurden, bestätigten die Ergebnisse der Tierversuche.⁷⁴

In dieser Arbeit sollten zunächst die Ergebnisse der HuH-7-Zellkulturversuche mit human induced pluripotent stem-cell derived hepatocytes (hiPS-HEP) verifiziert und bestätigt werden, um sicherzustellen, dass die Zelllinie HuH-7 keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Bei den HuH-7-Zellen handelt es sich um immortalisierte Zellen, die ursprünglich einem menschlichen HCC entstammen, somit ist es schwierig einen Einfluss dieser Zellen auf die Aktivierung von Protoonkogenen sicher auszuschließen.⁷⁵ hiPS-HEP-Zellen sind Hepatozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS), die eine typische hepatische Morphologie aufweisen und viele der hepatozellulären Marker exprimieren.⁷⁶ hiPS-HEP-Zellen werden als ein hoch-sensitives und spezifisches *in vitro* Modell für die Untersuchung des Einflusses von Medikamenten oder anderen Toxinen auf Lebergewebe beschrieben.⁷⁷

Die weiteren Ziele der vorliegenden Dissertation waren die Aufklärung des Aktivierungswegs und der Downstream-Effekte einer solchen c-Jun-Aktivierung. Wie weiter oben bereits erläutert, kann c-Jun über multiple Wege aktiviert werden. Ein Fokus dieser Arbeit war die Determination der Upstream-Kinasen, die für die Phosphorylierung von c-Jun verantwortlich waren. Dafür wurden Zellkulturversuche mit hiPS-HEP-Zellen durchgeführt und die Expression der Kinasen mittels Western Blots analysiert. Weiterhin wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt, um sicherzustellen, dass die betreffenden Kinasen tatsächlich die Phosphorylierung von c-Jun bedingen. Da die Downstream-Effekte von c-Jun vielfältig sein können, wurde die Expression und Aktivierung diverser Proteine, in Zellkulturversuchen mit hiPS-HEP-Zellen und Western Blots analysiert. Außerdem wurden Leberproben von *S. mansoni*-infizierten Hamstern mittels Western Blots, auf die Expression verschiedener Proteine hin, untersucht. Zusätzlich wurden immunhistochemische Co-Färbungen von c-Jun und Downstream-Markern wie MCM2 durchgeführt, um die Zellen, welche die Faktoren exprimieren, zu visualisieren (Abbildung 3).

2 Material, Methoden und Chemikalien

A: Zellkultur



B: Tiermodell

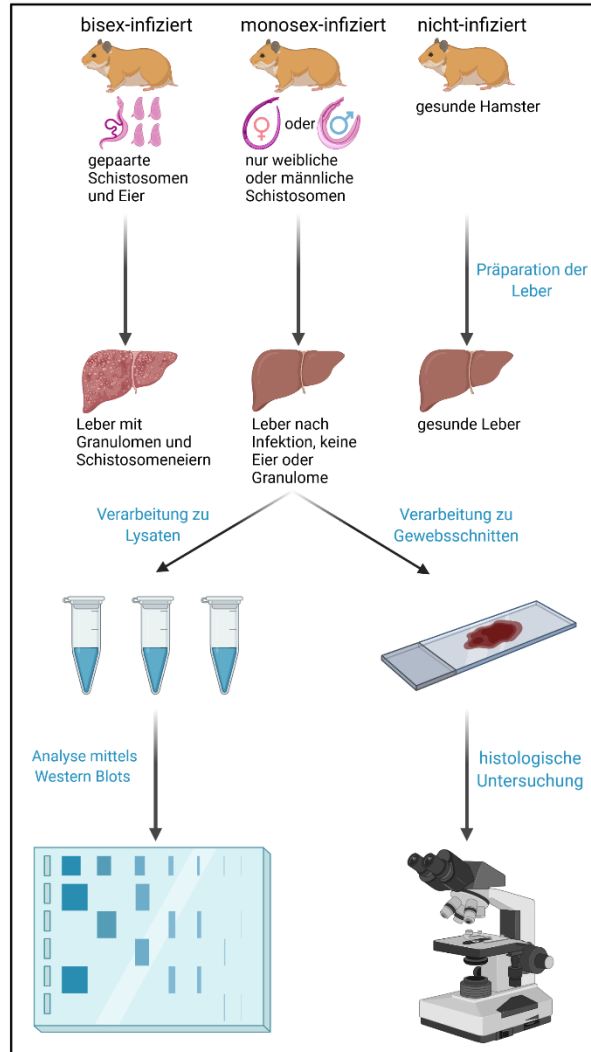


Abbildung 3: Versuchsaufbau der Experimente A) Vereinfachte Darstellung der Zellkulturversuche, in denen hiPS-HEP-Zellen mit Substanzen wie SEA oder IPSE stimuliert wurden und schließlich in Western Blot Analysen und Proteom Profiler Array ausgewertet wurden. B) Skizzierung des verwendeten Tiermodells. Leberproben von drei Hamstergruppen mit unterschiedlichem Infektionsstatus (bisex-infiziert, monosex-infiziert, nicht-infiziert) wurden in Western Blot Analysen und immunhistochemischen Färbungen untersucht. *Created with BioRender.com*

2.1 Zellkultur

2.1.1 Konditionen

Zur Untersuchung der Einflüsse von Stoffen aus den Schistosomeneiern wurden Zellkulturversuche mit human induced pluripotent stem-cell derived hepatocytes (hiPS-HEP) (Takara, Göteborg, Schweden Y10134) durchgeführt. Dabei handelt es sich um reife humane Hepatozyten, die aus pluripotenten Stammzellen differenziert wurden. Die hiPS-HEP Zellen wurden gemäß der Vorgaben des Herstellers unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach dem initialen Auftauen und Beschichten wurden die Zellen in William's E Medium kultiviert.

2.1.2 Auftauen und Beschichten von human induced pluripotent stem-cell derived hepatocytes

Für die Zellkulturversuche wurden 24 Well-Platten und das Cellartis Enhanced hiPS-HEP v2 Kit verwendet. Zunächst wurden die 24 Wells der Platte mit je 300 µL Cellartis Hepatocyte Coating Medium bedeckt. Die Platte wurde bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Das Hepatocyte Thawing und Plating Medium wurde auf 37 °C erwärmt. Zum Auftauen der Zellen wurde ein Vial mit Zellen direkt aus flüssigem Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad transferiert. Die äußere Fläche des Vials wurde desinfiziert und die Zellen in 20 mL des erwärmten Thawing Mediums transferiert. Durch vorsichtiges Invertieren des geschlossenen Röhrchens wurde die Zellsuspension mit dem Thawing Medium vermischt. Die Zellsuspension im Thawing Medium wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 20-minütigen Erholungsphase wurden die Zellen bei 5000 g für 10 min pelletiert, das Thawing Medium abgenommen und das Zellpellet in 15 mL Plating Medium suspendiert. Anschließend wurden jeweils 1 mL Zellsuspension pro Well ausplattiert.

2.1.3 Kultur der Zellen

Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2-3 Tage. Dabei wurden die Zellen zunächst zweimal mit je 1 mL auf 37 °Celsius erwärmten Hepatocyte Washing Medium gewaschen und anschließend 1 mL erwärmtes Long-Term-Maintenance Medium zugegeben.

2.1.4 Zellstimulation und Zellinhibition

Um die Einflüsse von aus Schistosomeneiern isoliertem SEA/IPSE auf die Zellen zu testen, wurden die Zellen mit diesen Substanzen stimuliert und nach der Stimulation zu Lysaten verarbeitet. Gleichzeitig wurden auch unbehandelte Kontrollzellen und Sham-

Kontrollzellen durch sämtliche Schritte geführt. Bei den Sham-Kontrollen handelt es sich um Zellen, die statt mit SEA/IPSE mit dem identischen Puffer, in dem SEA oder IPSE gelöst vorlag, behandelt wurden. Dies geschah um auszuschließen, dass der Schritt der Behandlung selbst einen Einfluss auf die Zellen hat. Als Sham-Kontrolle wurden hier Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) behandelt. Teilweise erfolgte vor Stimulation eine Inhibition spezifischer Signalwege in den Zellen. Dies geschah, um zu untersuchen, ob diese Signalwege an den in der Stimulation beobachteten Effekten beteiligt waren. Vor Stimulation und Inhibition der Zellen erfolgte am Vortag ein Mediumwechsel auf 1,5 mL William's E Medium ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) um die allgemeine Zellaktivität zu verringern. Am Tag der Stimulation und/oder Inhibition, bei einer Konfluenz von ca. 80 %, erfolgte ein erneuter Mediumwechsel auf 250 µL William's E Medium ohne FCS. Danach erfolgte die jeweilige in den Versuchen angegebene Stimulation/Inhibition. Die Stimulationszeit betrug in den ersten Experimenten zur Bestimmung der idealen Inkubationszeit 30 min, 4, 8 oder 24 Stunden. In den Folgeexperimenten wurde eine optimale Stimulationszeit von 4 Stunden gewählt. Die Inhibition erfolgte bereits 30 min vor Beginn der jeweiligen Versuche.

2.1.5 Zellernte und Lysatproduktion

Zur Untersuchung der Proteinregulation in den Zellen wurden Zellysate hergestellt. Dazu wurde das Stimulationsmedium entfernt und die Zellen in 60 µL Laemmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, für 10 min bei 99 °Celsius inkubiert und danach für 10 min bei 12000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die entstandenen Lysate wurden entweder direkt für die Western Blot Analyse verwendet oder bei -20 °Celsius gelagert.

2.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Um die Proteine der Zellysate nach Größe aufzutrennen wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden ein Trenngel und ein Sammelgel nach dem unten aufgeführten Pipettierprotokoll vorbereitet. Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurden erst direkt vor dem Einfüllen der Gele hinzugegeben, um die Polymerisation zu starten. Zwei Glasplatten wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und in den Rahmen eines Gießhalters eingespannt. APS und TEMED wurden der Trenngel-Lösung zugefügt, welches direkt danach zwischen die Glasplatten gegossen wurde. Der obere Rand des Gels wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu schaffen und das Antrocknen des Gels zu verhindern. Nach 30 min

wurde das Isopropanol abgegossen und die übriggebliebenen Reste mit destilliertem Wasser ausgewaschen. APS und TEMED wurden der Sammelgel-Lösung zugefügt. Sofort danach wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Formung der Geltaschen eingeführt. Nach der Polymerisation des Trenngels (30 min) wurde der Kamm entfernt und der Gießhalter in eine Elektrophorese-Zelle platziert. Die innere und äußere Kammer der Zelle wurden mit Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt. Die Proben und der molekulare Größenmarker wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Zelle wurde mit ihrem Deckel verschlossen und mit dem Netzteil verbunden. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte für ca. 10 min bei 100 V, bis die Proben und der Größenmarker das Trenngel erreicht hatten. Danach wurde die Spannung für weitere 50-90 min auf 160 V erhöht.

Tabelle 1: Pipettierprotokoll des Trenngels

Trenngel (10 %)	
Reagenz	Volumen
Polyacrylamidgel 30	3332 μL *
SDS 10 %	100 μL
2 M Tris Puffer pH 8,8	1950 μL
Destilliertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$)	Auffüllen bis zu einem Volumen von 10 mL
Zum Starten der Polymerisation	
APS	100 μL
TEMED	10 μL

* Das Volumen des Polyacrylamidgels wurde je nach benötigtem Prozentgehalt des Gels angepasst

Tabelle 2: Pipettierprotokoll des Sammelgels

Sammelgel (3,3 %)	
Reagenz	Volumen
Polyacrylamidgel 30	330 μL
4x Tris-Cl Puffer pH 6,8	830 μL
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	2130 μL
Zum Starten der Polymerisation	
APS	40 μL
TEMED	4 μL

2.3 Western Blot – Semi-dry-blotting

Um die nach Größe aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Membran zu übertragen wurde ein Western Blot durchgeführt. Eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) wurde durch Waschen mit Methanol aktiviert. Der Gießhalter wurde aus der Elektrophorese-Zelle entfernt, das Gel zwischen den Glasplatten gelöst und das

Sammelgel entfernt und verworfen. Das Trenngel, die Membran und sechs Filterpapiere wurden in Transferpuffer getränkt. In einer Semi-dry Blot Box wurden drei Filterpapiere, die Membran, das Gel und weitere drei Filterpapiere auf der Anodenplatte platziert und die Box durch den Kathodendeckel verschlossen. Das elektrophoretische Blotting wurde eine Stunde lang bei 120 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Membran in eine Schale mit 5 % gelöstem Magermilchpulver in Tris-gepufferter Kochsalzlösung + TWEEN®20 (TBS-T) überführt. In dieser Schale wurde die Membran eine Stunde lang inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.

2.4 Proteindetektion

Um die nun an der Membran gebundenen und nach Größe aufgetrennten Zielproteine nachzuweisen, erfolgte eine Inkubation mit einem gegen diese Proteine gerichteten Primärantikörper. Um den gebundenen Primärantikörper sichtbar zu machen, wurde die Membran mit einem gegen den Primärantikörper-gerichteten Zweitantikörper inkubiert. An den Zweitantikörper war Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. HRP ist ein Enzym, welches nach Zusatz von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Luminol eine Redoxreaktion katalysiert, bei der Licht emittiert wird.⁷⁸ Dieses Lichtsignal kann dann über einen digitalen PC Imager oder Röntgenfilm nachgewiesen werden. Die Membran wurde dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen, danach für 24 h auf einem Wippschüttler mit dem primären Antikörper inkubiert. Alle primären Antikörper wurden in einer 5 % Magermilch-TBS-T-Lösung verdünnt. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran erneut in TBS-T gewaschen. Dafür wurde die Membran eine Stunde lang mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal in TBS-T gewaschen. Die HRP-Entwicklerlösung wurde dem unten aufgeführten Pipettierprotokoll entsprechend hergestellt. In der HRP-Entwicklerlösung wurde die Membran 1 min lang inkubiert und direkt danach blasenfrei in transparenter Folie fixiert. Die Detektion erfolgte entweder per Röntgenfilm in einer Dunkelkammer oder mittels PC Imager.

Tabelle 3: Pipettierprotokoll der HRP-Entwicklerlösung

HRP-Entwicklerlösung	
Reagenz	Volumen
H_2O_{dd}	2x 4750 μ L
Tris 2M pH 8,5	500 μ L
H_2O_2	2,6 μ L
Luminol	50 μ L
Cumarsäure	25 μ L

2.5 Ladekontrolle

Zu jedem Western Blot wurde eine Ladekontrolle durchgeführt. Dafür wurden Proteine analysiert, welche ubiquitär ohne Beeinflussung durch die jeweilige Untersuchung exprimiert werden. Über die Ladekontrollen können die eingesetzten Proteinmengen untersucht und gegebenenfalls angepasst werden. Gleich starke Banden in der Ladekontrolle deuten auf einen ähnlichen Proteingehalt der untersuchten Proben hin. Als Ladekontrollen wurden in dieser Arbeit α -Tubulin und GAPDH eingesetzt.

2.6 Proteome Profiler Array

Zur Detektion der relativen Phosphorylierungsgrade von Phospho-Kinasen wurde der Human Phospho-Kinase Array von R&D Biosystems nach Herstellerprotokoll verwendet. Für den Array wurden hiPS-HEP-Zellen wie oben beschrieben auf einer 6-Well Platte angezüchtet, bei 80 % Konfluenz mit SEA stimuliert und die Zellen nach 4 Stunden in 250 μ L Laemmli-Puffer lysiert. Die Membranen wurden für die initiale Blockierung eine Stunde in Array Puffer 1 inkubiert. Die Zelllysate wurden zu einem finalen Volumen von 2 mL mit dem Array Puffer 1 verdünnt und nach Entfernen des Blocking-Puffers für 16 h bei 4 °C auf die Membranen gegeben. Anschließend erfolgten drei Waschvorgänge à 10 min in je 20 mL Waschlösung. Während der Waschvorgänge wurde die 8-Well-Schale sorgfältig mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Membranen wurden für 2 Stunden in der jeweiligen Detection Antibody Lösung inkubiert, danach erneut dreimal gewaschen und anschließend für 30 min in der Streptavidin-HRP-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen wieder dreimal 10 min mit Waschlösung gewaschen und danach auf die untere Seite einer Plastikhülle gelegt. Auf jede Membran wurde 1 mL Chemi Reagent Mix pipettiert und die Membranen mit der oberen Seite der Plastikhülle bedeckt. Der Chemi Reagent Mix wurde vorsichtig durch gleichmäßiges Bestreichen der Plastikhülle auf den Membranen verteilt und vorhandene Luftblasen entfernt. Die Membranen wurden 1 min lang inkubiert. Überschüssiger Chemi Reagent Mix wurde mit einem absorbierenden Labortuch entfernt und die Membranen erneut mit der oberen Seite der Plastikhülle bedeckt und Luftblasen ausgestrichen. Die Entwicklung der Membranen erfolgte, wie oben beschrieben, am Chemostar ML PC Imager.

2.7 Tierversuche

2.7.1 Tiermodell

Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung der Europäischen Konvention für den Schutz von Säugetieren zum Einsatz für experimentelle oder wissenschaftliche Zwecke durchgeführt und vom Regierungspräsidium Giessen unter dem Aktenzeichen V54-19 c 20/15 c GI 18/10 Nr. A1/2014 genehmigt. Unbehandelte Tiere wurden unter dem Aktenzeichen JLU Nr. 687M verwendet.

Für das Tiermodell wurden weibliche Goldhamster der Spezies *Mesocricetus auratus* verwendet. Für den Erhalt des Lebenszyklus der Schistosomen wurden *Biomphalaria glabrata* Schnecken als Intermediärwirt genutzt. Der verwendete *S. mansoni*-Stamm wurde von der Bayer AG (Monheim, Deutschland) bezogen. Bisex- und monosex-Wurmpopulationen für die jeweiligen Hamsterinfektionen wurden durch polymiracidiale (multisexuelle) und monomiracidiale (monosexuelle) Intermediärwirtinfektionen generiert. Die Tierversuche wurden im Institut für Parasitologie der Universität Gießen (Prof. Dr. rer. nat. C. Grevelding) durchgeführt. Die Anzucht, Infektion, Tötung und Konservierung der Organe der Hamster erfolgte im Institut für Parasitologie. Die Hamster wurden im Alter von 9 Wochen im Wasserbad mit ca. 2000 Zerkarien pro Hamster auf natürlichem Wege infiziert. Nach einer Infektionsdauer von 46 Tagen (bisex-Infektion) bzw. 67 Tagen (monosex-Infektion) wurden die Tiere durch eine Überdosierung mit Ketamin/Xylazin getötet. Es folgte eine Punktion der Hamsterherzen und Perfusion des Kreislaufs für ca. 2 min mit M199 Perfusionsmedium. Nach der Perfusion wurde das Abdomen der Hamster eröffnet, die Leber freipräpariert und die Proben entsprechend der geplanten Analysen konserviert. Der Großteil einer jeweiligen Leber wurde direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, um später Western Blot-Lysate herstellen zu können. Leberteilstücke wurden über Nacht in 1 % Formalin/PBS fixiert und anschließend nach dem unten beschriebenen Protokoll für die Herstellung histologischer Paraffinschnitte weiterbehandelt.

2.7.2 Isolation von Soluble Egg Antigen und Aufreinigung von IPSE/Alpha-1

Für die Stimulationsversuche in Zellkultur wurden SEA und natürliches IPSE/Alpha-1 (nIPSE) verwendet. Diese Stoffe wurden durch das Institut für Parasitologie, beziehungsweise durch Dr. Gabriele aus dem Forschungsinstitut Borstel in Borstel, aus *S. mansoni*-Eiern aus infizierten Hamsterlebern präpariert und isoliert. Die Konzentration von SEA wurde densitometrisch mittels des Advanced Protein Assay (Cytoskeleton, Inc.,

Denver, CO) den Herstellerangaben folgend bestimmt. nIPSE/Alpha-1 wurde aus SEA über einen zweischrittigen Chromatographieprozess aufgereinigt. Zunächst erfolgte eine Kationen-Austausch-Chromatographie, gefolgt von einer Affinitätschromatographie durch Bindung eines monoklonalen anti-IPSE/Alpha-1-Antikörpers gekoppelt an *N*-hydroxysuccinimid-aktivierte Sepharose. Das gebundene IPSE/Alpha-1 wurde mittels 0,1 M Glycin/HCL, pH 2,8 eluiert und direkt mit 1 M Tris-Lösung zu einem pH von 7,5 neutralisiert. Die gewonnenen Proben wurden mittels SDS-Page-Gel-Elektrophorese, Western Blot und Silber-Färbung auf Inhalt und Reinheit geprüft. Zur Generierung der schlussendlich gewünschten Konzentration wurden die Proben gegen eine Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,5 dialysiert und als Aliquotierungen bei -80 °C gelagert.

2.7.3 Paraffineinbettung histologischer Schnitte

Teile der Hamsterlebern wurden direkt nach der Entnahme für 16 h bei 4 °C in 1 %iger Formalinlösung fixiert und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden die fixierten Leberproben in Xylol inkubiert. Es folgte das Einbringen des Gewebes in heißes Paraffin. Nach Austrocknen der Paraffinblöcke waren diese bereit für die Herstellung histologischer Schnitte.

2.7.4 Herstellung histologischer Schnitte

Die Paraffin-Blöcke mit den Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Mikrotoms in 3 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden zunächst in einem Kaltwasserbad (ca. 20 °C) aufgefangen und in ein Warmwasserbad (ca. 45 °C) transferiert. Von dort wurden die Schnitte glatt auf einen Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung der Schnitte über Nacht bei 37 °C waren diese bereit für histologische Untersuchungen.

2.7.5 Immunhistochemie

Aus den histologischen Leberschnitten wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Dafür wurden Co-Färbungen durchgeführt, bei denen je zwei unterschiedliche Proteine nachgewiesen worden. Zunächst wurden die bereits dünn-schichtig geschnittenen und in Paraffin eingebetteten Leberschnitte in Xylol inkubiert, um das Paraffin zu lösen. Anschließend wurden die Proben in einer absteigenden Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt. Danach wurden diese Schnitte in Leitungswasser inkubiert und zur Demaskierung Formaldehyd-veränderter Epitope in Citratpuffer zweimal 5 min bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt. Verdampfter Citratpuffer wurde während des Erhitzens ständig nachgefüllt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger für 30 min zum Abkühlen im Puffer belassen. Die Schnitte wurden erneut in Leitungswasser abgewaschen und

zweimal 4 min in PBS gespült. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte 20 min mit natürlichem verdünntem Pferdeserum inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS abgewaschen und entweder über Nacht bei 4 °Celsius oder 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem ersten primären Antikörper behandelt. Nach dieser Behandlung wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und für 30 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschvorgang in PBS und die erste Entwicklung mit dem VECTOR Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit für 5-20 min. Die spezifische Färbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet, um die Entwicklung zum idealen Zeitpunkt zu stoppen. Alle Schnitte einer Färbung wurden identisch behandelt, um Gruppenunterschiede adressieren zu können. Zum Stoppen der Entwicklung wurden die Schnitte in PBS gelegt und anschließend dreimal zehnminütig gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper analog zu der Inkubation des ersten Primärantikörpers. Die Objektträger wurden erneut in PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang in PBS wurden die Schnitte mit dem VECTOR Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit für 5-20 min unter Beobachtung unter einem Mikroskop entwickelt und die Entwicklung schließlich mit Leitungswasser gestoppt. Zur Dehydrierung wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus Ethanol, Isopropanol und Xylol entwässert und mit Eindeckmedium und Deckgläsern verschlossen.

2.7.6 Herstellung von Gewebelysaten

Für die Herstellung der Lysate wurden zunächst die bei -80 °C gelagerten Leberproben der Hamster in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemörsert. Von dem gemörserten Gewebe wurde circa 10 mg in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen und auf Trockeneis gelagert. Die Proben wurden mit der 40-fachen Menge an Laemmli-Puffer versetzt und für 10 Sekunden bei Raumtemperatur mittels Vortexmischer durchgemischt, bis das Pellet vollständig suspendiert war. Die Proben wurden erneut auf Trockeneis gelegt und für 10 min gelagert. Danach wurden sie für 15 min bei 95 °Celsius im Heizblock aufgeköcht und erneut auf dem Vortex gemischt. Es erfolgte eine Abtrennung der nicht gelösten Zellüberreste durch Zentrifugation bei 14000 RPM für 5 min. Der Überstand wurde in drei neue Eppendorfgefäße aliquotiert und eingefroren. Nicht gelöstes Gewebematerial (Pellet) wurde verworfen.

2.8 Statistische Auswertung

Mittels Densitometrie wurden die Unterschiede in Expression und Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine auf den Western Blots analysiert. Es wurden jeweils nicht-infizierte, monosex-infizierte (mit Zerkarien eines Geschlechts) und bisex-infizierte (mit Zerkarien beider Geschlechter infizierte) Hamstergruppen miteinander verglichen. Dabei stellt der Infektionsstatus die unabhängige Variable, also den Einflussfaktor dar. Die Expression bzw. Phosphorylierung der Proteine hingegen ist die abhängige bzw. Zielvariable. Die Nullhypothese lautet: Der Infektionsstatus hat keinen Einfluss auf die Expression/Phosphorylierung der Proteine. Die Alternativhypothese lautet: Der Infektionsstatus beeinflusst die Expression/Phosphorylierung der Proteine.

Da hier mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden, wurde eine Varianzanalyse zur statistischen Auswertung durchgeführt. Eine Grundvoraussetzung um eine Varianzanalyse durchführen zu dürfen, ist, dass die Werte aus einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Um zu bestimmen, ob eine Normalverteilung vorliegt, wurde eine Residualanalyse durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Regressionsgerade aus den Werten der abhängigen Variablen erstellt. Die Regressionsgerade stellt die Idealverteilung der abhängigen Variablen für eine normalverteilte Grundgesamtheit dar. Bei den Residuen handelt es sich um den Abstand zwischen den tatsächlichen Werten der abhängigen Variablen und der Regressionsgeraden. Dabei sollten die Werte möglichst nah und ohne erkennbares Muster um die Regressionsgerade streuen (Abbildung 4).

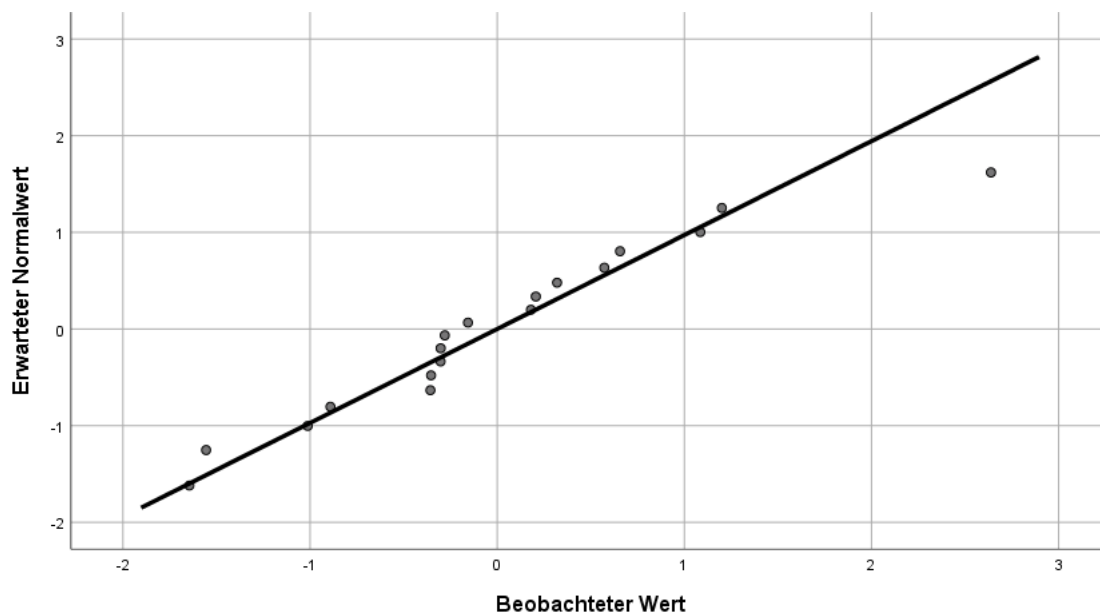
Beispielhafte Regressionsgerade für c-Jun/GAPDH

Abbildung 4: Regressionsgerade für c-Jun/GAPDH. Dargestellt ist eine Gerade, die die Idealverteilung der abhängigen Variablen (c-Jun Expression) für eine normalverteilte Grundgesamtheit darstellt. Die grauen Punkte stellen die tatsächlich beobachteten Werte der c-Jun Expression dar. Da die Werte alle nah und ohne erkennbares Muster um die Gerade streuen, kann davon ausgegangen werden, dass die Werte aus einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen.

Nachdem bestätigt wurde, dass eine Normalverteilung vorlag, wurde eine Varianzanalyse der abhängigen Variablen durchgeführt. Bei der Varianzanalyse werden die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen, hier durch den Infektionsstatus deklariert, miteinander verglichen. Dabei wird überprüft, ob eine Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe zu einer statistisch signifikanten Varianz der Mittelwerte beiträgt. In diesem Fall kann die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese beibehalten werden. Die statistische Auswertung der Varianzanalyse wurde mit dem Programm SPSS V. 26.0 durchgeführt.

2.9 Abbildungen

Die selbst erstellten Abbildungen (Abbildung 3 und Abbildung 11) wurden mit Hilfe der App *BioRender* auf <https://biorender.com/> erstellt und im Rahmen der Laborlizenz der Arbeitsgruppe von Prof. Roeb exportiert.

2.10 Verwendetes Material

2.10.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4:

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller	Produktnummer
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth	6908
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth	9178
Bromophenol blau	Serva Electrophoresis GmbH	15375
Chlorwasserstoff (HCl)	Sigma-Aldrich	30721
Cumarsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth	P030
Ethanol	Fischar	27690
Glycerol	Merck	104092
Glycin	Roth	3908
Immersionsöl	Roth	X899
Isopropanol	Sigma-Aldrich	33539
JNK-Inhibitor	Sigma-Aldrich	420119
Kaliumchlorid (KCl)	Roth	HN02
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck	104973
Luminol	Sigma-Aldrich	123072
Methanol, JT Baker	Thermo Fisher Scientific	8045
Milchpulver	Roth	T145.3
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	3957
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	4360
Neo Mount Eindeckmedium	Merck	1.09016
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26617
Paraffin	Sigma-Aldrich	P3683
Rotiphorese® Gel 30	Roth	3029.1
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH	35925
Tris	Roth	77-86-1
TWEEEN® 20	Serva Electrophoresis GmbH	39796.01
Vector Blue	Vector Laboratories	SK-5200
Vector Red	Vector Laboratories	SK-5100
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich	216763
William's E Medium	PAN Biotech	P04-29050
Xylol	VWR	28975.325

2.10.2 Puffer und Lösungen

10x PBS:

- 80 g Natriumchlorid (NaCl) (1,37 M)
- 2 g Kaliumchlorid (KCl) (27 mM)
- 2,45 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄) (18 mM)
- 11,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) (81 mM)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 1 L, pH 7,4

10x TBS:

- 24,23 g Tris Base (200 mM)
- 80 g NaCl (1,37 M)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 1 L, pH 7,5

Für 1x TBS-T-Puffer: 10x TBS 1:10 + 1 mL TWEEN®20 (für 1 L)

10x Elektrophorese-Laufpuffer:

- 10 g SDS (35 mM)
- 30,3 g Tris-Base (0,25 M)
- 144 g Glycin (1,92 M)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 1 L, pH 8,3

4x Tris/HCL Puffer (SDS-PAGE Trenngel):

- 375 mL 2 M Tris/HCL pH 8,8 (1,5 M)
- 10 mL 20 % SDS (0,4 %)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 500 mL

4x Tris-Cl Puffer (SDS-PAGE Sammelgel):

- 6,05 g Tris-Base (0,5 M) in 40 mL H₂O_{dd}
- Anpassung des pH auf 6,6 mit 1 M HCl
- 100 mL H₂O_{dd}
- Filtration (0,45 µm)
- 0,4 g SDS (0,4 %)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 100 mL

4x SDS-PAGE Ladepuffer (Laemmli Puffer):

- 1,21 g Tris Base (200 mM) aufgelöst in H₂O_{dd} und Anpassung des pH auf 6,8
- 3,09 g DTT (400 mM)
- 4 g SDS (8 %)
- 0,2 g Bromophenol blau (0,4 %)
- 20 mL Glycerol (40 %)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 50 mL

Bjerrum Schafer-Nielsen Puffer (Transferpuffer):

- 5,32 g Tris Base (48 mM)
- 3,93 g Glycin (39 mM)
- Zusatz von 500 mL H₂O_{dd}
- 200 mL Methanol (20 %)
- Zusatz von H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 1 L, pH 9,2

10x Citratpuffer

- 24,269 g Natriumcitrat und 3,358 g Citratsäure aufgelöst in 800 mL H₂O_{dd}
- Anpassung des pH auf 6,0
- Auffüllen mit H₂O_{dd} bis zu einem Endvolumen von 1 L

2.10.3 Primäre Antikörper**Tabelle 5:**

Antikörper	Zielspezies	Hersteller	Produktnummer
p-c-Jun	Kaninchen	Cell Signaling	#3270
c-Jun	Kaninchen	Cell Signaling	#9165
p-JNK	Kaninchen	Cell Signaling	#9251s
p-MKK4	Kaninchen	Cell Signaling	#9156
p-MKK7	Kaninchen	Cell Signaling	#4171
MCM2	Kaninchen	Cell Signaling	#4007
Cleaved Caspase 3	Kaninchen	Cell Signaling	#9661
Cyclin D1	Kaninchen	Cell Signaling	#2978
P27	Kaninchen	Cell Signaling	#3686
GAPDH	Maus	Proteintech	60004-1-Ig
α-Tubulin	Maus	Santa Cruz	Sc5286

2.10.4 Sekundäre Antikörper**Tabelle 6:**

Antikörper	Zielspezies	Hersteller	Produktnummer
Goat anti-Rabbit IgG HRP-linked	Kaninchen	Invitrogen	A16104
Goat anti-Mouse IgG HRP-linked	Maus	Invitrogen	A16072

2.10.5 Kits**Tabelle 7:**

Material	Hersteller	Produktnummer
Cellartis® Enhanced hiPS-HEP v2 Kit	Takara	Y10134
Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	R&DSystems	ARY003C
Impress Horse Anti-rabbit IgG Polymer Kit, Peroxidase	Vector Laboratories	MP-7401
VECTOR Red Alkaline Phosphatase Substate Kit	Vector Laboratories	SK-5300
VECTOR Blue Alkaline Phosphatase Substate Kit	Vector Laboratories	SK-5100

2.10.6 Verbrauchsmaterialien**Tabelle 8:**

Material	Hersteller	Produktnummer
Cell Scraper	Sarstedt AG & Co. KG	83.1830
CELLSTAR® Zellkulturschale	Greiner Bio-One GmbH	664160
CELLSTAR® 6 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH	657160
CELLSTAR® 24 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH	662160
CELLSTAR® 50 mL Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	227261
CELLSTAR® 15 mL Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	188271
CELLSTAR® Pipette	Greiner Bio-One GmbH	710180 (2 mL) 606180 (5 mL) 607180 (10 mL)
Deckgläser	Langenbrink	01-001211
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf	0030120

Gel Blotting Papier Whatman™ GB003	GE Healthcare Life Science	10426892
Mikroskopobjektträger Ultra plus ®	Langenbrink	03-0061
Pasteurpipette 230 mm	VWR	612-1702
PDVF Membran Immobilon®-P	Merck	IPVH0010
Pipettenspitzen	Eppendorf	0030000
Pipettenspitzen	Sarstedt	70.1130.xxx
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Science	10627265
Röntgenfilm CL- XPosure™	Thermo Fisher Scientific	1233850
Röntgenfilmkassette	Roth	X265.1

2.10.7 Instrumente und Geräte

Tabelle 9:

Instrument/Gerät	Hersteller	Version und Produktnummer
Biometra Fastblot™	Biometra	Version B44
NEW-Line ECL ChemoStar PLUS Imager	Intas Science Imaging	1752506
Elektrophoresekammer und Zubehör	Bio-Rad	Mini-Protean ® Tetra System
Geschlossener Gewebeinfiltrationsautomat	Leica	ASP300S
Glättetisch	Leica	HI1220
Heraeus Sicherheitskabinet LaminAir	Heraeus	HBB 2448
Inkubator	Thermo Fisher Scientific	HeraCell 150i
Kamera	Nikon	CoolHx540
Kühlcontainer	VWR	Nalgene ® Cryo 1°C “Mr. Frosty“
Kühl- und Gefrierschränke Gefrierschrank (-80 °C) Gefrierschrank (-20 °C) Kühlschrank	Thermo Fisher Scientific Liebherr Liebherr	HFU T Series Premium No Frost Profi Line
Mikroliterspritze	Hamilton	Microliter™ #805
Mikroskope	Leica Microsystems	Leitz DMR3 DM/LH6
Mikrotom	Leica	RM2165
Netzteil	Thermo Fisher Scientific	Consort EV243
Röntgenfilmentwickler	AGFA	CP100
Stickstoff Tank	Harsco	Version CFB-160
Thermomixer	Eppendorf	5436
Thermo Cyclers	Biometra	Version T 3000
Vortex	IKA-Werke GmbH & Co.KG	Version VF2

Waagen Präzisionswaage Präzisionswaage Analytische Waage	Kern Faust Sartorius	Version 440-47 Version FA-1500-2 Version 1801
Wasserbad für Paraffinschnitte	Leica	HI1210
Wippschüttler	VWR	10860
Zentrifugen	Beckmann Coulter Hettich BmbH & Co.KG VWR	GC-6KR Mirko 120 Micro Star 17R

2.10.8 Software

- Statistische Auswertung via SPSS V. 26.0 (SPSS Inc., IBM corporation, Armonk, NY)
- Erstellung von Abbildungen durch die App *BioRender* auf <https://biorender.com/>

3 Ergebnisse

3.1 SEA und IPSE aktivieren das Protoonkogen c-Jun und den Transkriptionsfaktor STAT3 in induzierten humanen Hepatozyten

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Roeb konnte eine verstärkte Phosphorylierung und Expression von c-Jun in SEA-stimulierten HuH-7-Zellen gezeigt werden.⁷⁴ Um einen Einfluss der Hepatoma-Zelllinie auf die Aktivierung von c-Jun auszuschließen, wurden die entsprechenden Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit hiPS-HEP-Zellen wiederholt. Bei den hiPS-HEP-Zellen handelt es sich um reife Hepatozyten, die aus Stammzellen differenziert wurden. Die Zellen exprimieren die typischen hepatozellulären Marker wie hepatocyte nuclear factor 4 α , Cytokeratin 18 und α 1-Antitrypsin. Sie weisen einen funktionsfähigen Entgiftungsmetabolismus auf und sezernieren typische hepatische Proteine wie Albumin. Dies macht sie zu einem sehr gut geeigneten Zellmodell für die Simulierung von gesundem Lebergewebe.

Die hiPS-HEP-Zellen wurden mit SEA stimuliert. Es wurde ein Phospho-Kinase Proteom Profiler durchgeführt, um einen generellen Überblick über die Signalwege zu erhalten, welche durch diese Stimulation aktiviert wurden. Der Proteom Profiler detektiert die Phosphorylierung von 43 verschiedenen Kinasen und zeigte die Aktivierung von c-Jun, STAT3, HSP70 und CREB in SEA-stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. (Abbildung 5A).

Zellkulturversuche in einer Zeitreihe mit SEA- und IPSE-stimulierten hiPS-HEP-Zellen und nachfolgende Western Blot-Analysen, zeigten eine erhöhte Expression und Phosphorylierung von c-Jun. Bei den p-c-Jun Blots sind 3 Banden sichtbar. Neben p-c-Jun, handelt es sich hier wahrscheinlich um zwei p-JunD Banden, die ebenfalls durch den verwendeten Antikörper erkannt und markiert werden. Unphosphoryliertes c-Jun kann in zwei Banden bei 43 kDa und 48 kDa nachgewiesen werden. Die Versuche zeigten, dass der stärkste Anstieg in c-Jun Expression und Phosphorylierung nach 4 h Stimulation nachweisbar war. Das zeitliche Optimum für eine c-Jun-Stimulierung wurde deswegen in allen weiteren Experimenten auf 4 h gesetzt. (Abb. 5B und C)

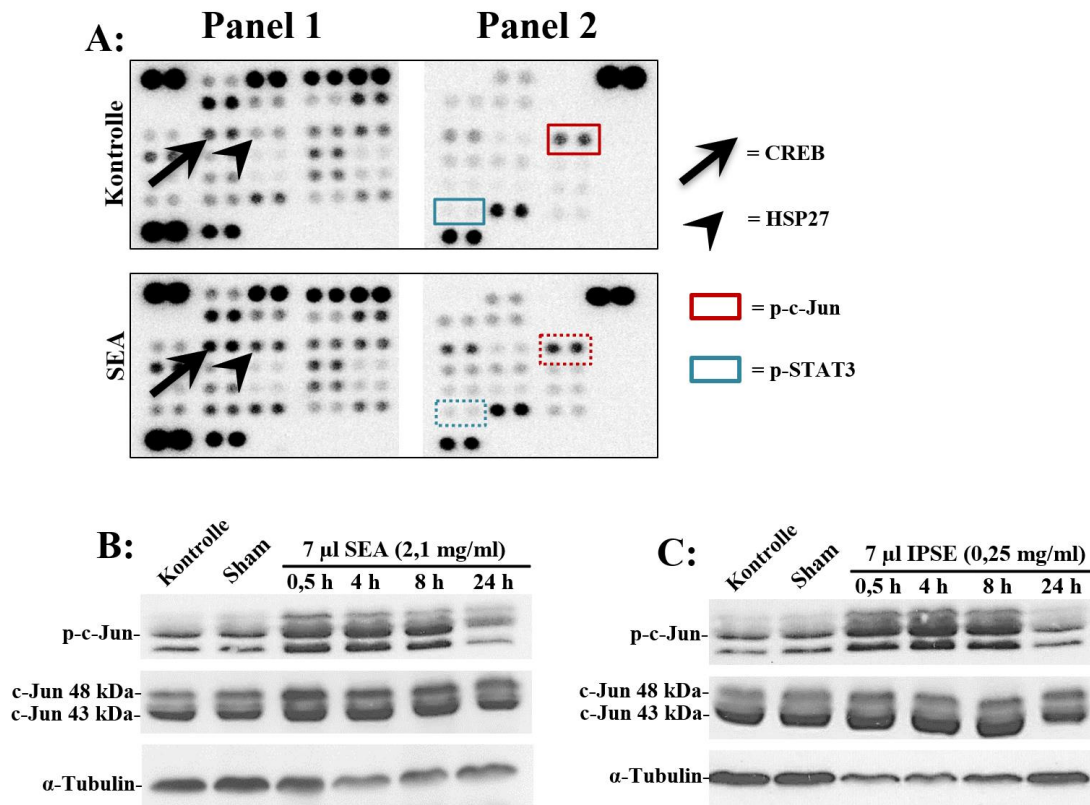


Abbildung 5: Proteom Profiler und Western Blot Analysen von hiPS-HEP-Zellen
A) Phospho-Kinase Proteom Profiler Array von Kontroll- und SEA-stimulierten hiPS-HEP-Zellen. Der Proteom Profiler Array detektiert die Phosphorylierung von 43 verschiedenen Kinasen. p-c-Jun ist durch die roten Boxen markiert und p-STAT3 durch die blauen. Die linierten Boxen kennzeichnen p-c-Jun und p-STAT3-Spiegel in den Kontrollzellen (oberes Feld), während die gepunkteten Boxen p-c-Jun und p-STAT3 in den SEA-stimulierten Zellen hervorheben (unteres Feld). CREB und HSP27 werden durch den Pfeil und die Pfeilspitze angezeigt. **B) + C)** Erhöhte Expression und Phosphorylierung von c-Jun nach SEA-Behandlung (B) und IPSE-Behandlung (C) wurden durch Western Blotting dargestellt.

3.2 c-Jun wird durch SEA und IPSE über den MKK4/7-JNK-Signalweg aktiviert

Die vorherigen Experimente demonstrierten eine c-Jun-Phosphorylierung durch SEA- und IPSE-Behandlung, ergaben aber noch keine Hinweise auf die Upstream-Mechanismen dieser Aktivierung. Der hier verwendete p-c-Jun Antikörper weist spezifisch eine Phosphorylierung am N-terminalen Serin 73 nach. Dieser Phosphorylierungsschritt wird durch die aktivierte Upstream-Kinase JNK katalysiert. Um dies zu bestätigen, wurden Western Blot-Analysen von IPSE-behandelten hiPS-HEP-Zellen durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass es zu einer verstärkten JNK-Phosphorylierung und damit Aktivierung kam. Post-transkriptionell wird JNK in eine

46 kDa und eine 54 kDa Untereinheit gespliced, weswegen in den JNK Western Blots zwei JNK-Banden sichtbar sind (Abb. 6A). Um die Aktivierungssequenz weiter zu verfolgen wurden die Upstream-Kinasen von JNK, MKK 4 und 7 untersucht. Western Blot-Analysen von SEA-behandelten Zellen, zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von MKK4/7 im Vergleich zu den Kontrollzellen. Interessanterweise war die Aktivierung von MKK4/7 in Zellen, die mit IPSE-depletiertem SEA gleicher Proteinkonzentration stimuliert wurden, schwächer als in Zellen, die mit unbehandeltem SEA stimuliert wurden (Abb. 6B). Um zu bestätigen, dass JNK die Kinase ist, die c-Jun phosphoryliert, wurde ein Inhibitionsexperiment durchgeführt. Dabei wurden die Zellen 30 min vor und während der SEA-Stimulation mit einem JNK-Inhibitor behandelt. Dieses Experiment zeigte, dass die Inhibition von JNK erfolgreich die Phosphorylierung von c-Jun unterdrückte und den Spiegel von p-c-Jun in den stimulierten Zellen auf das Maß in den Kontrollzellen senkte (Abb. 6C).

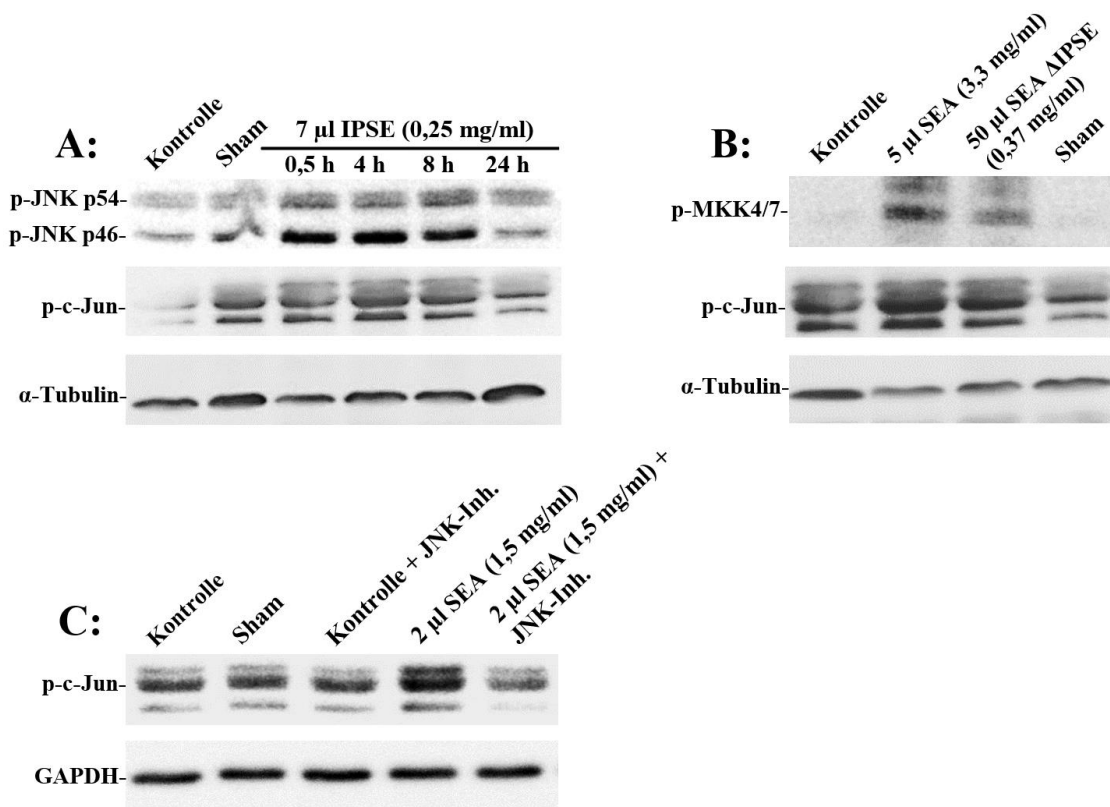


Abbildung 6: Western Blot Analyse von hiPS-HEP-Zellen. Stimulations- und Inhibitionsexperimente demonstrieren das MKK4/7 und JNK upstream von c-Jun aktiviert sind. **A)** Die Western Blot Analyse zeigt das zeitabhängige Aktivierungsmuster von JNK durch IPSE-Stimulation. **B)** SEA-Behandlung führt zu einer verstärkten Aktivierung von MKK4/7 in hiPS-HEP-Zellen. Die Aktivierung wurde durch die IPSE-Depletion aus SEA reduziert. **C)** Inhibition von JNK verhinderte den SEA-abhängigen Anstieg der c-Jun Phosphorylierung.

3.3 SEA und IPSE induzieren Proliferations- und Apoptosemarker in hiPS-HEP-Zellen

Um zu prüfen, ob die c-Jun Aktivierung durch SEA/IPSE die Proliferation beeinflusst, wurde die Expression von MCM2 in IPSE-behandelten hiPS-HEP-Zellen bestimmt. Mittels Western Blotting wurde eine Steigerung der MCM2-Expression in IPSE-behandelten Hepatozyten nachgewiesen. Die gleichen Zellen zeigten eine erhöhte Phosphorylierung von c-Jun (Abb. 7A). Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von c-Jun und der Anstieg der MCM2-Expression zusammenhängen, wurde ein Inhibitionsexperiment mit einem JNK-Inhibitor durchgeführt. Das vorherige Experiment hatte gezeigt, dass eine JNK-Inhibition die Aktivierung von c-Jun verhinderte. Obwohl diese Inhibition auch zu einer Abnahme der MCM2-Expression führte, waren die MCM2-Spiegel in JNK-inhibierten und SEA-behandelten Zellen immer noch höher als in Kontrollzellen (Abb. 7B).

Zusammen mit Caspase 8 und 9 ist Caspase 3 einer der Haupteffektoren von Apoptose und wird weitläufig als ein histologischer Marker für Apoptose verwendet. Nachdem die Caspase 3 durch Caspase 8 oder 9 in seine aktiven Untereinheiten gespalten wird, degradierten diese Untereinheiten mehrere zelluläre Proteine und sind in die Fragmentierung der DNA involviert.⁷⁹ Die aktiven Caspase 3-Untereinheiten können in Western Blots als Caspase 3-Spaltprodukte bei 17 kDa und 19 kDa nachgewiesen werden.

Western Blot-Analysen von SEA-behandelten Zellen zeigten einen Anstieg der Caspase 3-Spaltprodukte. In Zellen, die vor der SEA-Stimulation mit einem JNK-Inhibitor behandelt wurden, waren die Caspase 3-Spaltprodukte in geringerem Ausmaß nachweisbar als in nicht-inhibierten Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen waren sie jedoch immer noch erhöht (Abb. 7C).

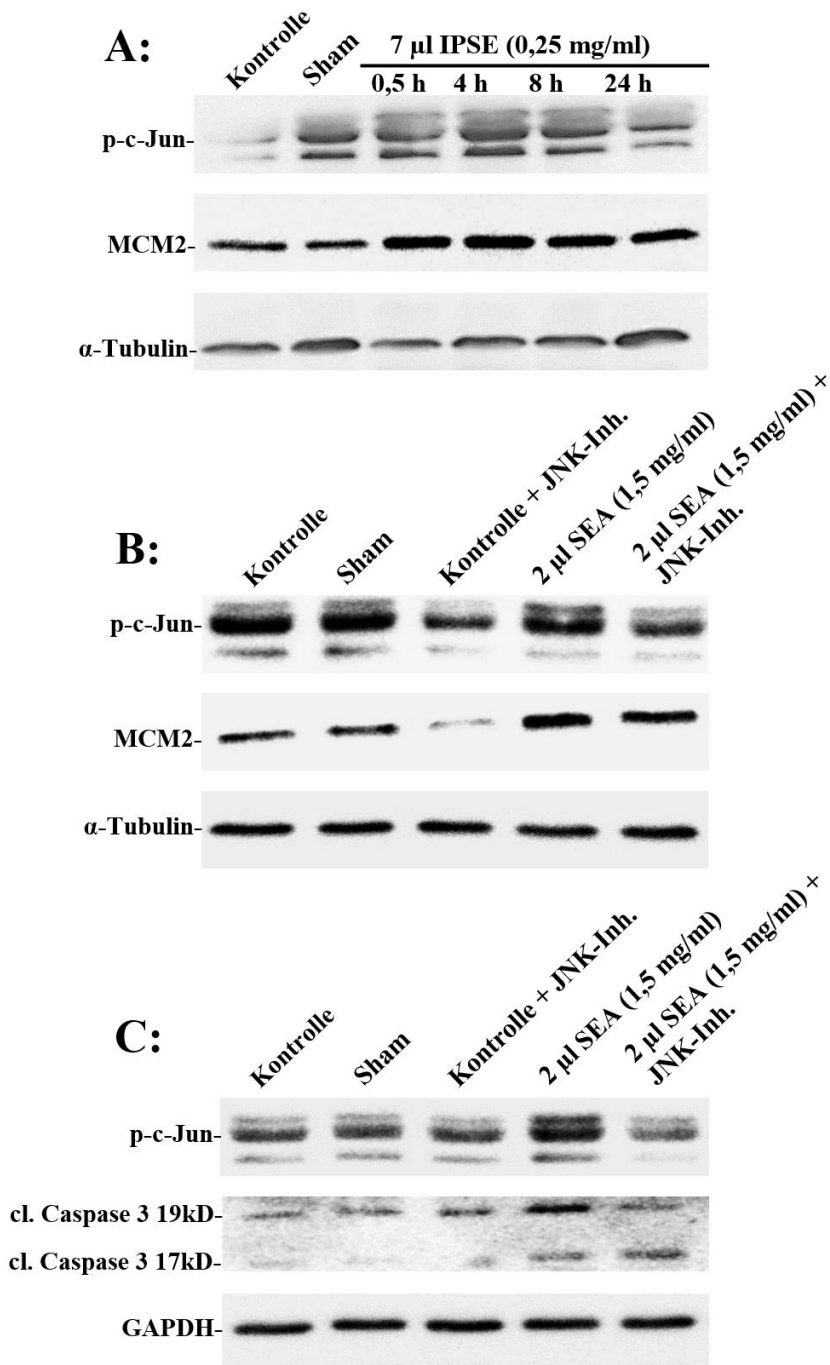


Abbildung 7: Western Blot Analysen von hiPS-HEP-Zellen der Proliferations- und Apoptosemarker MCM2 und cleaved Caspase 3 **A)** IPSE Stimulation der Zellen führt zu einem Anstieg der MCM2 Expression. **B)** Vorbehandlung der hiPS-HEP-Zellen mit einem JNK-Inhibitor verringerte diesen Anstieg. **C)** SEA-Behandlung verursacht einen Anstieg der Caspase 3-Spaltprodukte in den Zellen, während eine Inhibierung von JNK diesen Effekt verminderte.

3.4 Eine Infektion mit *S. mansoni* führt in Hamsterlebern zu einem Anstieg der Expression und Aktivierung von c-Jun sowie seinen Downstream-Faktoren

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten Hamsterlebern von monosex- und bisex-*S. mansoni*-infizierter Hamster im Hinblick auf eine verstärkte Expression und Aktivierung von c-Jun untersucht. Diese Arbeiten hatten gezeigt, dass bisex-Infektionen zu einer verstärkten Expression von c-Jun im Vergleich zu monosex-Infektionen führten. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden nun zusätzlich noch gesunde Hamster als Kontrolle untersucht und mit bisex- und monosex-infizierten Hamstern verglichen. Ziel war es zu überprüfen, ob eine Infektion mit *S. mansoni* selbst einen Effekt auf die c-Jun Expression und Aktivierung hat, oder ob diese Effekte alleine durch die *S. mansoni*-Eier bei einer bisex-Infektion ausgelöst werden.

Es wurden Hamsterlebern, die entweder mit *S. mansoni*-Würmern eines Geschlechtes, Würmern beider Geschlechter oder nicht infiziert waren in Western Blots analysiert. Zuerst wurden die Marker c-Jun und p-c-Jun untersucht. Hier wurden monosex- und bisex-infizierte Hamster mit nicht-infizierten Hamstern verglichen. Die Western Blots zeigten einen Anstieg der c-Jun-Expression sowohl in den monosex- als auch den bisex-infizierten Hamstern im Vergleich zu der nicht-infizierten Kontrollgruppe. Der stärkste Anstieg von c-Jun war in den bisex-infizierten Hamstern nachweisbar. Densitometrische und statistische Analysen bestätigten den Unterschied der c-Jun-Expression. Auch die c-Jun-Phosphorylierung zeigte einen deutlichen Anstieg in bisex-infizierten Hamstern, verglichen zu den nicht-infizierten Hamstern. In den monosex-infizierten Hamstern konnte kein signifikanter Unterschied der c-Jun-Phosphorylierung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 8A-C).

Zusätzlich wurden die Downstream-Proliferationsmarker MCM2 und Cyclin D1 untersucht. Western Blot-Analysen zeigten, dass sowohl MCM2 als auch Cyclin D1 in monosex- und bisex-infizierten Hamstern verstärkt exprimiert wurden verglichen mit den nicht-infizierten Hamstern. Die Aktivierung von Cyclin D1 und MCM2 war am stärksten in bisex-infizierten Hamstern ausgeprägt. Densitometrische Daten bestätigten dieses Ergebnis (Abb. 8D-F).

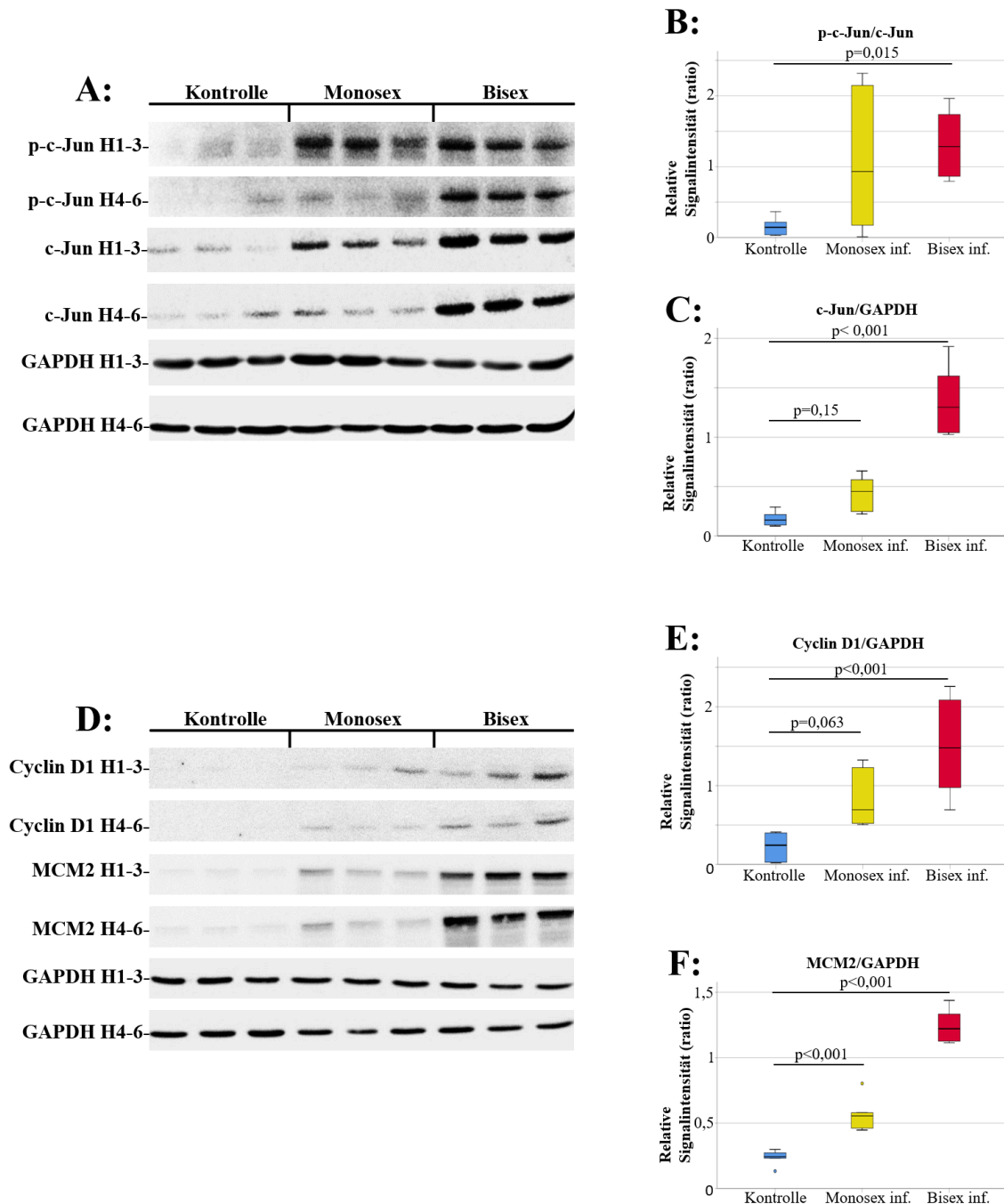


Abbildung 8: Western Blot und statistische Analyse der Expression und Phosphorylierung von c-Jun, MCM2 und Cyclin D1 in Kontroll-, monosex- und bisex-infizierten Hamstern. **A)** Western Blots von p-c-Jun, c-Jun und der zugehörigen Ladekontrolle GAPDH. **B) + C)** Densitometrische und statistische Auswertung der in 4A abgebildeten Western Blots zeigen einen signifikanten Unterschied der c-Jun Expression und Phosphorylierung zwischen bisex-infizierten Hamstern und der Kontrollgruppe. **D)** Western Blots von MCM2, Cyclin D1 und der zugehörigen Ladekontrolle GAPDH. **E) + F)** Densitometrische und statistische Auswertung der in 4D abgebildeten Western Blots zeigen einen Unterschied der Expression von MCM2 und Cyclin D1 zwischen bisex-infizierten Hamstern und der Kontrollgruppe sowie zwischen monosex-infizierten Hamstern und der Kontrollgruppe. **A) bis F)** n=6/Gruppe für die statistische Analyse.

3.5 c-Jun co-lokalisiert nukleär mit den Replikationsfaktoren MCM2 und Cyclin D1 in Hepatozyten von *S. mansoni*-infizierten Hamstern

In Abschnitt 3.4 wurde bereits gezeigt, dass die Expression von MCM2 und Cyclin D1 in Hamsterlebern, die mit *S. mansoni* infiziert waren, erhöht war. Um zu analysieren, welche Leberzellen durch die Infektion beeinflusst werden, wurden immunhistochemische Färbungen auf Leberschnitten von bisex-infizierten Hamstern durchgeführt. Für diesen Zweck wurden Co-Färbungen von c-Jun (rot) und MCM2 (blau) als auch c-Jun (rot) und Cyclin D1 (blau) angefertigt. c-Jun wurde vor allem in perigranulomatösen Hepatozyten verstärkt exprimiert. Ein Anstieg der c-Jun-Expression war außerdem dem Weg des Blutflusses folgend nachweisbar. Die c-Jun-Expression schien dem hämatogenen Fluss von den Portalfeldern aus, wo die Eier und Granulome lokalisiert sind, hin zu den Zentralvenen, zu folgen. Die Co-Färbung von c-Jun und MCM2 zeigte sowohl Hepatozyten, in denen beide Faktoren co-lokalisieren (lila), als auch Zellen die lediglich c-Jun-positiv (rot) oder MCM2-positiv (blau) waren (Abb. 9A).

Die histologische Untersuchung der Co-Färbungen von c-Jun und Cyclin D1 ergab ein ähnliches Ergebnis. Es waren sowohl Hepatozyten in denen beide Faktoren exprimiert wurden (lila) und solche die nur c-Jun (rot) bzw. Cyclin D1 (blau) exprimieren, nachweisbar (Abb. 9B). In beiden Experimenten schien sich die Aktivierung vornehmlich um das Granulom herum zu konzentrieren und mit zunehmender Distanz zwischen Hepatozyten und Granulom abzunehmen.

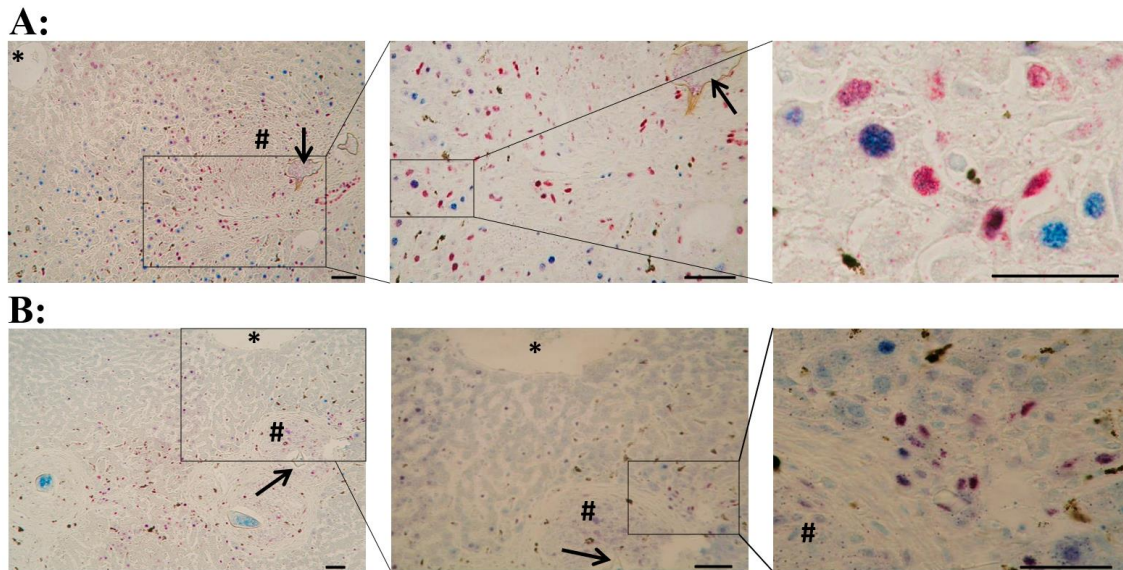


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von bisex *S. mansoni*-infizierten Hamsterlebern. **A)** Expression von c-Jun (rot) und MCM2 (blau) in Hepatozyten um das *S. mansoni*-Ei (Pfeil) und Granulom (#) herum. Hepatozyten in denen c-Jun und MCM2 co-lokalisieren sind lila gefärbt. Die Aktivierung von c-Jun und MCM2 scheint dem Blutfluss von Ei und Granulom Richtung Zentralvene (*) zu folgen. **B)** Expression von c-Jun (rot) und Cyclin D1 (blau) in Hepatozyten um das *S. mansoni*-Ei (Pfeil) und Granulom (#) herum. Hepatozyten in denen c-Jun und Cyclin D1 co-lokalisieren sind lila gefärbt. Zentralvene (*) Die Vergrößerungen sind jeweils für A+B links 100x, mittleres Feld 200x und rechtes Feld 1000x. Der Balken entspricht 100 µm.

3.6 p27 wird in den Lebern infizierter Hamster verstärkt exprimiert und co-lokalisiert mit c-Jun

In den Abschnitten 3.3 und 3.4 wurde gezeigt, dass sowohl Proliferation als auch Apoptose in Hepatozyten durch *S. mansoni* beeinflusst wird. Zelluläre Seneszenz stellt neben Apoptose einen weiteren wichtigen Abwehrmechanismus der Zellen im Umgang mit potentiellen Gefahren für das Erbgut dar.⁷¹ Um zu untersuchen, ob in den Leberproben infizierter Hamster Hinweise auf die Einleitung zellulärer Seneszenz nachweisbar waren, wurden Western Blot Analysen und immunhistochemische Färbungen mit dem Seneszenzmarker p27 durchgeführt.

Die Western Blot Analysen ergaben, dass es zu einer erhöhten p27-Expression in bisex-infizierten Hamstern kam. Ein Unterschied zwischen monosex-infizierten und nicht-infizierten Hamstern konnte nicht festgestellt werden (Abb. 10A).

Immunhistochemische Co-Färbungen von c-Jun (rot) und p27 (blau) zeigten eine Expression beider Faktoren um die Granulome herum. Wie zuvor waren auch hier

Hepatozyten nachweisbar, in denen die Faktoren co-lokalisierten (lila) oder einzeln exprimiert wurden. Die Anzahl der c-Jun oder p27 positiven Hepatozyten schien mit Distanz zu den Granulomen abzunehmen (Abb. 10B).

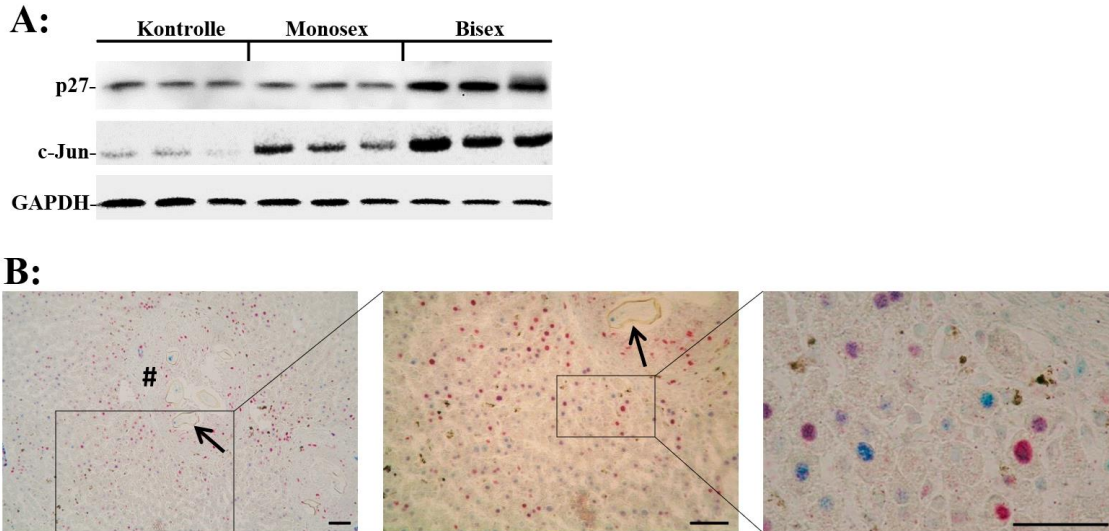


Abbildung 10: Western Blot und immunhistochemische Analysen der c-Jun und p27 Expression in bisex *S. mansoni*-infizierten Hamsterlebern. **A)** Western Blot Analyse von Leberproben von Kontroll-, monosex- und bisex- *S. mansoni*-infizierten Hamstern zeigen eine erhöhte p27 Expression in bisex-infizierten Hamstern. **B)** Immunhistochemische Analyse einer Leberprobe von bisex *S. mansoni*-infizierten Hamstern. Expression von c-Jun (rot) und p27 (blau) in Hepatozyten neben einem Cluster von *S. mansoni*-Eiern (Pfeil) und umgebenden Granulom (#). Hepatozyten die sowohl c-Jun als auch p27 exprimieren sind lila gefärbt. Die Vergrößerungen sind 100x im linken Feld, 200x im mittleren Feld und 1000x im rechten Feld. Der Balken entspricht 100 µm.

4 Diskussion

Die Schistosomiasis betrifft bereits heute mehr als 230 Millionen Menschen weltweit und ist damit eine der häufigsten parasitären Erkrankungen.^{2,42} Durch Migration und den Klimawandel wird die Anzahl der Schistosomiasis-Infektionen in der nahen Zukunft wahrscheinlich noch weiter ansteigen.⁸⁰ Bereits 2013 kam es auf Korsika zu einem Ausbruch urogenitaler Schistosomiasis.⁸¹ Dies unterstreicht das Risiko, dass sich die Schistosomiasis durch die Einschleppung exotischer Erreger aufgrund von vermehrter internationaler Bewegung schon bald aus Afrika auch auf weitere Teile Südeuropas ausbreiten könnte.^{2,80} 90 % der Schistosomiasis-Infektionen kommen in sub-Sahara-Afrika vor, wo sowohl *S. haematobium* als auch *S. mansoni* endemisch sind. *S. haematobium* gilt seit Jahren als ein bestätigter Risikofaktor für Urothelkarzinome.¹⁵ Es sind vielfältige Mechanismen beschrieben, durch die *S. haematobium* die Karzinogenese fördern kann. *S. haematobium* wurde mit der Entstehung von oxidativem Stress, chronischer Inflammation und Epithelschäden in Verbindung gebracht.¹⁵ Außerdem wurde postuliert, dass die Eier von *S. haematobium* in der Lage sind Substanzen wie z.B. SEA zu sekretieren, die Onkogene aktivieren, DNA-Schäden verursachen und die Proliferation steigern.^{15,40}

Vermutlich ist eine Infektion mit *S. mansoni* allein kein Auslöser für Karzinogenese. Jedoch deuten zahlreiche Fallstudien und erste Kohortenstudien darauf hin, dass die Infektion mit dem Parasiten die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms, Prostatakarzinoms und hepatozellulären Karzinoms fördern könnte.^{15,82,83} Aktuell wird *S. mansoni* von der International Agency for Research on Cancer der Gruppe 3 zugeteilt. Diese klassifiziert *S. mansoni* als potentiell Karzinogen, zu dem noch nicht genügend Daten zur Bestimmung der exakten Karzinogenität vorliegen.¹⁴ Außerdem wurde gezeigt, dass *S. mansoni*-Infektionen die Leberschädigung bei HCV-infizierten Patienten potenzieren können. Diese co-infizierten Patienten hatten eine höhere Rate an HCC, und die Tumore waren durchschnittlich größer, öfter multifokal, und aggressiver.⁴¹ So wie *S. haematobium*, verursacht auch *S. mansoni* eine chronische Entzündung und oxidativen Stress.⁸⁴ Des Weiteren ist bekannt, dass *S. mansoni* die Immunantwort des Wirts beeinflusst. Nach der initialen Th1-fokussierten Antwort in der Akutphase der Infektion, erfolgt in der chronischen Phase ein Wechsel zu einer Th2-fokussierten Antwort, die die Ausbildung von Granulomen und Leberfibrose moderiert.²² Th1-Zellen sind ein wichtiges Werkzeug des Immunsystems, um den Organismus gegen Tumore zu schützen.

Multiple Studien haben gezeigt, dass hohe Th1-Zytokin-Spiegel mit einem Schutz vor Progression unterschiedlicher Krebsarten verbunden sind. Darunter fallen auch die HCC-Entwicklung nach HBV Infektion.⁸⁵⁻⁸⁸ Th2-Zytokine hingegen können für Tumore eine günstige Umgebung schaffen. IL-10, eines der Hauptzytokine der Th2-Immunantwort, ist in der Lage, die Th1-Zytokinproduktion zu hemmen und die Aktivität von Antigen-präsentierenden Zellen sowie NK-Zellen zu senken.²¹ Außerdem wurde gezeigt, dass Th2-Zytokine Angiogenese-fördernd sind.⁸⁹ Weiterhin sind hohe Spiegel dieser Zytokine in Lebergewebe von HCC-Patienten mit einer erhöhten Metastasierungsrate assoziiert.⁹⁰ Generell korrelieren erhöhte Spiegel der Th2-Zytokine IL-10 und IL-4 mit einer schlechteren Prognose von Krebserkrankungen.^{91,92} Vor diesem Hintergrund kann der induzierte Wechsel der Immunantwort von einem Th1-Fokus zu einem Th2-Fokus als ein weiterer möglicher karzinogener Faktor einer *S. mansoni*-Infektion betrachtet werden. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Eier des Parasiten ein direktes karzinogenes Potential haben könnten, da sie Protoonkogene in benachbarten Hepatozyten aktivieren können.^{93,94} *Tong et al.* haben vorgeschlagen, dass eine Kombination aus Protoonkogen-Aktivierung, chronischer Inflammation und immunmodulatorischen Funktionen der Schlüssel zum Verständnis des karzinogenen Potentials von *S. mansoni* sein könnte.¹⁵

Vor kurzem haben wir die Aktivierung des Protoonkogens c-Jun durch *S. mansoni* entdeckt.⁷⁴ Dies war einer der ersten Schritte zum Verständnis, welche Protoonkogene in welcher Weise durch den Parasiten beeinflusst werden. Der Aktivierungsweg und die Downstream-Faktoren einer solchen c-Jun-Aktivierung blieben jedoch noch unklar. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag darin, die Aktivierungssequenz und Downstream-Effekte der c-Jun-Aktivierung genauer zu analysieren. Für diesen Zweck wurden *in vivo* und *in vitro* Experimente durchgeführt. Für die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Zellkulturexperimente wurden hiPS-HEP-Zellen verwendet. Nach der Kultivierung der Zellen und Stimulation mit SEA oder IPSE, wurden sie für einen Proteome Profiler Human-Phospho-Kinase Array verwendet oder als Lysate für Western Blot-Analysen präpariert. Syrische Hamster wurden mit den Parasiten infiziert, um *in vivo* Konditionen zu simulieren, die vergleichbar mit der menschlichen Situation sind. Aus den Lebern der Hamster wurden Lysate für Western Blots und histologische Schnitte für immunhistologische Färbungen gewonnen.

Die Hauptschlussfolgerungen, die aus dieser Arbeit gezogen werden können, sind:

- Das Protoonkogen c-Jun wird über den MKK4/7-JNK-Signalweg durch aus *S. mansoni*-Eiern gewonnenes SEA und IPSE aktiviert.
- Die c-Jun-Aktivierung führt sowohl zu Proliferation als auch Apoptose, was zusammengenommen mit der schon bekannten DNA-Schädigung auf replikativen Stress hinweist.
- Stress-induzierte Seneszenz, angedeutet durch die p27-Expression, wird in Hepatozyten von *S. mansoni*-infizierten Hamstern ausgelöst, wahrscheinlich aufgrund von replikativem Stress.

4.1 Aktivierung von Protoonkogenen durch SEA/IPSE

Der Proteom Profiler Human Phospho-Kinase Array zeigte eine Phosphorylierung von c-Jun in hiPS-HEP Zellen. Somit wurde bestätigt, dass die SEA-Stimulation den gleichen Effekt, den wir in HuH7-Zellen beobachtet hatten, auch in Hepatozyten induziert. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass der Effekt in HuH-7-Zellen artifiziell durch deren Transformation zu einer Adenokarzinomzelllinie hervorgerufen wurde. Zusätzlich dazu zeigte der Proteom Profiler noch die Aktivierung weiterer Faktoren, die mit hepatozellulärer Karzinogenese in Zusammenhang stehen, nämlich des Protoonkogens CREB, HSP70 und des Transkriptionsfaktors STAT3.⁹⁵⁻⁹⁷ Die Aktivierung dieser Faktoren zeigt, dass ein komplett neues Spektrum an Signalwegen durch Ei-sekretierte Faktoren im Parenchym des Wirts beeinflusst wird, die näher erforscht werden können. Es ist bekannt, dass das Protoonkogen CREB in der Karzinogenese unterschiedlicher Krebsarten involviert ist, zum Beispiel Leukämie, kolorektales und hepatozelluläres Karzinom.⁹⁷⁻⁹⁹ Bekanntermaßen fördert CREB Proliferation, Zellzyklus-Progression, Immortalisierung und maligne Transformation.⁹⁹ HSP70 ist ein Chaperonprotein, das an der Faltung von Proteinen während der Biosynthese oder der Korrektur fehlgefalteter Proteine beteiligt ist. HSP70 hat jedoch auch anti-apoptotische Funktionen, steigert die Proliferation und das Zellüberleben unter Stress.¹⁰⁰ Eine Überexpression von HSP70 kann in einer Vielzahl von Tumoren, inklusive HCC, nachgewiesen werden und korreliert generell mit einer schlechteren Prognose.¹⁰⁰ HSP70 stellt den Tumoren einen Verteidigungsmechanismus gegen Chemotherapeutika und programmierten Zelltod bereit und fördert deren Proliferation. Diese Effekte werden über diverse Signalwege vermittelt, darunter auch JNK und STAT3, die auch in hiPS-HEP-Zellen durch SEA-Behandlung induziert wurden.^{96,100-102} Die momentan geplante

follow-up Studie könnte zeigen, ob HSP70 tatsächlich der Aktivator von c-Jun und STAT3 in SEA-stimulierten Zellen ist.

Sowohl c-Jun als auch STAT3 sind wichtige Marker der hepatozellulären Karzinogenese.^{103,104} Es ist bekannt, dass c-Jun in Proliferation, Tumorüberleben, Tumordifferenzierung, Invasion und Metastasierung involviert ist.¹⁰⁵ Experimente mit Mäusen, in denen durch Diethylnitrosamin (DEN)-Gabe HCCs induziert wurden, haben gezeigt, dass die Anzahl und Größe der Tumore in c-Jun-knock-out-Mäusen niedriger waren. Die Studie zeigte weiterhin, dass c-Jun für das Überleben der Tumore wichtig war und sie durch Antagonisierung von p53 vor der Einleitung von Apoptose schützte.⁵⁵ STAT3 ist ein weiterer bekannter Regulator von Proliferation und Zellüberleben. Es wurde gezeigt, dass bis zu 60% aller menschlichen HCCs STAT3 positiv sind.¹⁰³ In Tumoren fördert STAT3 die Proliferation, Angiogenese und das Tumorzellüberleben durch Hemmung der Apoptose. Außerdem hemmt es die Expression mehrerer pro-inflammatorischer Gene und unterdrückt somit eine effiziente Immunabwehr.¹⁰⁶

Zellkulturexperimente und korrespondierende Western Blot-Analysen bestätigten die im Proteom Profiler beobachtete Erhöhung der c-Jun Phosphorylierung in hiPS-HEP-Zellen und zeigten weiterhin auch einen Anstieg der c-Jun Expression. Experimente mit Stimulation der Zellen in einer Zeitreihe zeigten die stärkste Aktivierung von c-Jun 4 h nach SEA-Stimulation. Interessanterweise glich die Aktivierung und Expression von c-Jun, sowohl nach SEA als auch nach IPSE-Stimulation, nach 24 h wieder den Leveln der Kontroll-Zellen. Am wahrscheinlichsten lässt sich dies durch den Abbau von SEA erklären. SEA ist ein Gemisch aus verschiedenen Antigenen aus den Schistosomeneiern. Somit ist die Wirkung des SEA wahrscheinlich zeitlich begrenzt und der kontinuierliche Effekt wird *in vivo* durch eine konstante Produktion aufrechterhalten. Die permanente Aktivierung der Tumorgenese-fördernden Signalwege im *in vivo* Modell belegt daher, dass zumindest molekularbiologisch wichtige Faktoren, die die Krebsentstehung fördern, durch eine Infektion mit *S. mansoni* gegeben sind. Demgegenüber fehlen nach wie vor belastbare klinische Daten aus kontrollierten Studien, deren Erhebung in Endemiegebieten bislang nicht möglich waren. Vor diesem Hintergrund unterstreichen die Ergebnisse unserer Forschung mit Nachdruck, dass eine Steigerung der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit gegenüber neglected tropical diseases wie Schistosomiasis weitreichende Erkenntnisse über die Pathologie der Erkrankung liefern könnten und Verbesserungen für Diagnostik und Therapie ermöglichen würden.

Unsere Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass *S. mansoni*-Ei-sekretierte Faktoren zu einer Aktivierung unterschiedlicher Signalwege führen, die mit hepatozellulärer Karzinogenese assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die c-Jun-Aktivierung untersucht. Die anderen angesprochenen Signalwege stellen einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Forschung dar und könnten potentiell einen Einfluss auf einige der unten aufgeführten Ergebnisse haben.

4.2 c-Jun Aktivierung über den MKK4/7-JNK Signalweg

Die Bedeutung des Protoonkogens c-Jun für die hepatische Karzinogenese ist sehr gut charakterisiert.^{55,56,95,104} c-Jun kann an vielen unterschiedlichen Stellen phosphoryliert werden, was entweder zu einer Zu- oder Abnahme der DNA-Bindungsaffinität führt.⁴⁷ Die Phosphorylierung der verschiedenen Stellen wird durch unterschiedliche Enzyme katalysiert. Die Glycogen Synthase kinase 3 (GSK-3) kann das C-terminale Ende von c-Jun phosphorylieren und somit dessen DNA-Bindungsaffinität senken, während die MAP-Kinasen JNK und ERK eine N-terminale Phosphorylierung verursachen und die DNA-Bindungsaffinität von c-Jun erhöhen.^{47,48} In unserem Fall war c-Jun am N-terminalen Serin 73 phosphoryliert. Die Western Blot-Analysen zeigten außerdem eine vermehrte Aktivierung von JNK als auch MKK4/7, den Upstream-Aktivatoren von JNK.¹⁰⁷ Die Inhibitionsexperimente bestätigten schließlich, dass die c-Jun-Aktivierung tatsächlich JNK-abhängig war. Dies bewies, dass JNK die Kinase war, die c-Jun in diesem Fall phosphorylierte. Die Aktivierung von JNK ist interessant, da bekannt ist, dass JNK sowohl Apoptose als auch Proliferation fördern kann.^{54,107} Für beides wurden in dieser Arbeit, Downstream von c-Jun, Hinweise gefunden. JNK aktiviert nicht nur c-Jun, sondern auch noch eine Reihe weitere Onkogene wie c-fos, BCR-Abl und Ras.¹⁰⁴ Es ist bekannt, dass JNK fundamental an hepatozellulärer Karzinogenese beteiligt ist.⁵³ Die Blockierung von JNK inhibierte die Proliferation von HCC-Zellen *in vitro* und führte zu einer starken Reduktion von DEN-induziertem HCC-Wachstum in Mäusen.^{108,109} Eine JNK-Überaktivierung beeinflusst direkt die Proliferation der Zellen und geht mit einer erhöhten Expression von Zellzyklus kontrollierenden Genen wie Cyclin D1 und anderen Proliferationsfaktoren wie proliferating cell nuclear antigen (PCNA) oder MCM2 einher.¹⁰⁴ Zusätzlich ist JNK auch noch in der Formation eines proinflammatorischen Hintergrundes durch gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α , als auch der Ausbildung von Leberfibrose beteiligt.¹⁰⁴ Insgesamt gesehen, korreliert eine JNK-Überaktivierung in HCC-Gewebe mit einer schlechteren Prognose der Patienten.⁵³ JNK könnte auch ein wichtiger Faktor für die Chemotherapie-Resistenz

von HCCs sein. In 2012 zeigten *Hagiwara et al.*, dass hohe JNK-Level in HCC mit einer schwächeren Antwort auf Sorafenib assoziiert waren. Sorafenib ist ein Multi-Kinase-Inhibitor, der momentan in der Therapie von fortgeschrittenen HCC-Stadien eingesetzt wird.¹¹⁰

In dieser Studie wurde gezeigt, dass SEA über den MKK4/7-JNK-Signalweg zu einer Aktivierung von c-Jun führt. Noch zu klären bleibt, wie SEA diesen Signalweg einleitet. Wie oben diskutiert, könnte dies mit einer HSP70-Aktivierung assoziiert sein, allerdings müssen andere Mechanismen ebenfalls in Betracht gezogen werden. JNK ist eine Stress-aktivierte Protein-Kinase; also ist es auch denkbar, dass SEA die Zelle einem hohen Stresslevel aussetzt, wodurch es wiederum zu einer Aktivierung von JNK via MKK4/7 kommt. Es wurde bereits demonstriert, dass eine *S. mansoni*-Infektion in Mäusen mitochondrialen Schaden in deren Lebern verursacht.¹¹¹ Dies resultiert in der Ausbildung einer hohen Menge an reaktiven oxygen species (ROS) und der Einleitung von Apoptose über den intrinsischen Weg. Außerdem kam es zur erhöhten Expression des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B.¹¹¹ Auf diese Weise verursachter oxidativer Stress, pro-apoptotische- und pro-inflammatorische Signale könnten schließlich die Aktivierung von JNK bedingen. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass eine Komponente des SEA extrazellulär an ein G-Protein auf der Zellmembran bindet und somit eine MAPK-Kaskade auslöst, die schließlich in einer JNK-Phosphorylierung resultiert. Um zu verstehen, wie genau die SEA-abhängige JNK-Aktivierung erfolgt, werden weitere Forschungsarbeiten zur Entschlüsselung der beteiligten intrazellulären Mechanismen nötig sein.

4.3 Downstream-Effekte der c-Jun-Aktivierung

Eine c-Jun-Aktivierung kann verschiedene Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Stressabwehr und Apoptose beeinflussen.^{47,53} Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die JNK-abhängige c-Jun-Aktivierung zu einer erhöhten Expression der Proliferationsmarker MCM2 und Cyclin D1 führte. Der Vergleich von Western Blot Analysen von gesunden Kontrollhamstern mit monosex- und bisex-infizierten Hamstern zeigte, dass sowohl c-Jun als auch die Downstreamfaktoren MCM2 und Cyclin D1 in monosex- und bisex-infizierten Hamstern verstärkt exprimiert wurden. In bisex-infizierten Hamstern war der Anstieg der Expression jedoch deutlich größer als in monosex-infizierten Hamstern. Insgesamt kann somit davon ausgegangen werden, dass der hauptsächliche Effekt zur Aktivierung von Protoonkogenen bei einer *S. mansoni*-

Infektion durch die Schistosomeneier und nicht die Würmer selbst verursacht wird. Histologisch konnte gezeigt werden, dass c-Jun und MCM2/Cyclin D1 in Hepatozyten um das Granulum und die *S. mansoni*-Eier herum co-lokalisierten. Es gab allerdings auch Zellen, die zwar die Proliferationsmarker exprimierten, jedoch c-Jun negativ waren. In Western Blot Analysen von SEA-stimulierten hiPS-HEP-Zellen senkte eine Inhibierung von JNK das Ausmaß an MCM2-Expression, reduzierte sie allerdings nicht auf das Level der Kontrollzellen. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse deutet darauf hin, dass JNK und c-Jun nicht die einzigen Faktoren sind, die die Zell-Proliferation nach SEA-Behandlung steigern.

Tatsächlich sind all die oben diskutierten karzinogenen Faktoren HSP70, CREB und STAT3, deren erhöhte Expression im Proteom Profiler beobachtet wurde, ebenfalls in der Lage die Proliferation anzuregen.^{98,100,106} Es scheint sehr wahrscheinlich, dass neben c-Jun einer oder mehrere dieser Faktoren, oder sogar ein noch unbekannter Faktor, ebenfalls zu einer Steigerung der Proliferation führt. In der Tat könnte der Hauptmechanismus, über den JNK die Proliferation einleitet, ein indirekter sein. Es gibt Hinweise darauf, dass JNK in Hepatozyten, während der HCC-Transformation Apoptose einleitet.⁵³ Dies verleitet dann wiederum die umliegenden Hepatozyten dazu, kompensatorisch zu proliferieren. Eine so überschießende kompensatorische Proliferation könnte ein weiterer Antrieb für die hepatozelluläre Karzinogenese sein.⁵³ Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass Caspase 3-Spaltprodukte in den Zellkultur-Experimenten der SEA-behandelten hiPS-HEP-Zellen nachweisbar waren. Caspase 3-Spaltprodukte indizieren, dass Apoptose in den Zellen eingeleitet wurde. Dieser Anstieg der apoptotischen Aktivität war JNK-abhängig, da eine Vorbehandlung der Zellen mit einem JNK-Inhibitor die Spaltung von Caspase 3 nach SEA-Stimulation verringerte.

Es ist allerdings auch möglich, dass JNK die Proliferation über einen direkten Weg fördert. JNK kann die Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen wie Cyclin D1 über die Aktivierung von c-Jun und die Formation des AP-1-Komplexes steigern.¹¹² Auch in dieser Arbeit konnte eine erhöhte Expression von Cyclin D1 in Western Blot-Analysen und immunhistochemischen Färbungen von bisex *S. mansoni*-infizierten Hamstern nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass Cyclin D1 weder strikt mit c-Jun co-lokalisiert, noch nur in Hepatozyten direkt neben c-Jun positiven Hepatozyten exprimiert wird. Dies spricht ebenfalls für die Theorie, dass noch weitere Faktoren neben c-Jun und JNK an der Steigerung der Proliferation beteiligt sind. Es

könnte allerdings auch ein Hinweis darauf sein, dass sowohl ein direkter als auch ein indirekter Mechanismus, über den JNK die Proliferation anregen kann, hier teilhaben. So könnte in Zellen, in denen c-Jun und Cyclin D1 co-lokalisieren, die Proliferation über eine gesteigerte Expression infolge einer c-Jun-Aktivierung bedingt sein. In Zellen, die Cyclin D1 positiv und c-Jun negativ sind, könnte die gesteigerte Proliferation kompensatorisch durch JNK-bedingte Apoptoseeinleitung in Nachbarzellen, ausgelöst werden.

Eine weitere Erklärung für den Anstieg von apoptotischer Aktivität wäre replikativer Stress. Wir haben in Vorarbeiten die Präsenz von γ -H2AX, einem Marker für DNA-Doppelstrangbrüche, in Hepatozyten nahe am Granulom und den Eiern nachgewiesen.⁷⁴ In Kombination mit der Beobachtung, dass SEA und die *S. mansoni*-Eier gleichzeitig Proliferation und Apoptose induzieren, unterstützt dies die Idee, dass die Hepatozyten unter replikativem Stress leiden. Der ausgelöste, hohe replikative Druck führt dazu, dass den Hepatozyten Fehler während der Replikation unterlaufen. Dadurch werden DNA-Schäden verursacht, hier angedeutet durch γ -H2AX, was wiederum die Einleitung von Apoptose zur Folge hat. Replikationsstress ist schwierig zu definieren. Charakteristisch für Replikationsstress ist eine Abnahme der DNA-Syntheserate infolge von Fehlern während der Polymerisation, die entweder repariert werden oder zum Stopp der Synthese führen.⁶⁹ Eine erhöhte Expression von Onkogenen führt zu replikativem Stress durch eine erhöhte Expression und Aktivierung von Zellzyklus regulierenden Proteinen wie Cyclinen und CDKs. Dadurch wird in den Zellen die Replikation eingeleitet, obwohl sie nicht alle Vorbereitungsschritte durchlaufen haben.¹¹³ Normalerweise führt dies in Zellen zum DNA-Synthesestopp, was wiederum in Reparatur, Einleitung von Seneszenz oder Apoptose resultiert. Es kann jedoch auch zur malignen Transformation von Zellen beitragen. Mutationen, die durch replikativen Stress verursacht wurden, können Protoonkogene aktivieren oder die Zelle in die Lage versetzen sich der Apoptose oder Seneszenz zu widersetzen.^{69,114}

Während es schwierig ist zu bestimmen, welche der besprochenen Mechanismen hier teilhaben, scheint es am wahrscheinlichsten, dass eine Kombination aus Protoonkogenaktivierung, chronischer Inflammation und Apoptoseinduktion für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Es kann angenommen werden, dass JNK/c-Jun und andere Faktoren die Proliferation steigern und Apoptose induzieren. Die apoptotischen Zellen können die Proliferation dann noch weiter erhöhen, indem sie

umgebene Hepatozyten dazu verleiten, kompensatorisch zu proliferieren. Alles in allem erscheint es plausibel, dass SEA und die *S. mansoni*-Eier das Potential haben, karzinogene Signalwege zu aktivieren, die die Proliferation von Hepatozyten steigern, und so zu replikativem Stress führen.

4.4 Seneszenz in Hepatozyten *S. mansoni*-infizierter Hamster

Die Western Blot Analysen *S. mansoni*-infizierter Hamsterlebern zeigten einen Anstieg der p27-Expression, was darauf hinweist, dass dort Seneszenz eingeleitet wurde. Zusätzlich verdeutlichten die immunhistochemischen Analysen, dass die p27-Expression vornehmlich in Hepatozyten in unmittelbarer Nachbarschaft zu *S. mansoni*-Eiern und Granulomen nachweisbar war. p27 co-lokalisierte dabei teilweise mit c-Jun war jedoch auch in einigen c-Jun negativen Zellen nachweisbar. Western Blot Analysen zeigten, dass die p27-Spiegel in den monosex-infizierten Hamstern nicht höher waren als in der Kontrollgruppe, obwohl die c-Jun-Expression in dieser Gruppe erhöht war. Dies deutet entweder darauf hin, dass der Anstieg an c-Jun-Expression in den monosex-infizierten Hamstern nicht ausreichte, um Seneszenz auszulösen, oder dass c-Jun nicht der Auslöser für die Stress-induzierte Seneszenz in den Hamstern war. Dies würde ebenfalls zu der Beobachtung passen, dass in der Immunhistochemie p27-positive aber c-Jun-negative Zellen nachweisbar waren.

Die Einleitung zellulärer Seneszenz als Antwort auf replikativen Stress ist ein in der Literatur bereits gut beschriebener Mechanismus. *Venkatachalam et al.* zeigten in 2017, dass sub-letale Dosen von oxidativem Stress in Zellkultur mit Myoblasten zu DNA-Doppelstrangbrüchen führten, was schlussendlich Stress-induzierte Seneszenz in diesen Zellen auslöste.¹¹⁵ Weiterhin demonstrierten *Di Micco et al.*, dass die Expression des Onkogens Ras zu Hyperreplikation, folgendem DNA-Schaden und schließlich Seneszenz-Einleitung in humanen Fibroblasten führte.¹¹⁶

Alles in allem stellt der Nachweis zellulärer Seneszenz einen weiteren wichtigen Hinweis dafür dar, dass *S. mansoni*-Eier das Potential haben, die Integrität der DNA zu schädigen und karzinogene Signalwege zu aktivieren, worauf die Zellen mit Abwehrmechanismen wie der Einleitung von Seneszenz oder Apoptose reagieren.

4.5 *S. mansoni* und hepatozelluläres Karzinom

Die Schistosomiasis wird bereits seit den 70er Jahren mit Karzinogenese in Verbindung gebracht.¹⁵ Leider ist die Beziehung zwischen den verschiedenen Unterarten und

Krebsentstehung immer noch nicht eindeutig geklärt. Auf der einen Seite wird *S. haematobium* von der IARC als ein definitives Karzinogen für Harnblasenkrebs angesehen. Auf der anderen Seite werden *S. japonicum* und *S. mansoni* seit mehr als 20 Jahren als mögliche Karzinogene diskutiert, ohne dass dies eindeutig bewiesen oder widerlegt werden kann.^{13,15,45} Die Signalwege, die momentan als Ursache für die karzinogenen Effekte von *S. mansoni* diskutiert werden, sind die Umwandlung einer Th1- in eine Th2-fokussierte Immunantwort, die Ausbildung einer chronischen Inflammation, oxidativer Stress und die Aktivierung von Protoonkogenen.^{15,17,41} Bis vor kurzem war relativ wenig darüber bekannt, welche Protoonkogene durch *S. mansoni* aktiviert werden und wie diese Aktivierung stattfinden könnte. In unserer Studie konnten wir erste Fortschritte auf diesem Gebiet machen und zeigen, dass das SEA aus den Eiern der Schistosomen das Protoonkogen c-Jun aktiviert. Weiterhin haben wir gezeigt, dass diese Aktivierung zu DNA-Schädigung, angedeutet durch γ -H2AX, führt.⁷⁴

Die vorliegende Arbeit erbrachte zusätzliche Hinweise darauf, dass SEA karzinogene Signalwege aktiviert, die mit hepatozellulärer Karzinogenese in Verbindung stehen, nämlich JNK-c-Jun, STAT3, HSP70 und CREB.^{98,100,104,106} Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivierung dieser Signalwege zu einem Anstieg der Proliferation und damit auch zu proliferativem Stress in SEA-stimulierten Hepatozyten in der Zellkultur oder Hepatozyten nahe den *S. mansoni*-Eiern in den Hamsterlebern führte. Zusätzlich ergaben die Experimente, dass sowohl Seneszenz als auch Apoptose in Hepatozyten induziert werden, die dem Einfluss der *S. mansoni*-Eier bzw. SEA ausgesetzt waren. Die Hypothese, die aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden kann, lautet, dass die *S. mansoni*-Eier durch Substanzen wie SEA und IPSE onkogene Signalwege in Hepatozyten nahe der Granulome aktivieren, was über proliferativen Stress zu DNA-Schäden führt. Dies aktiviert die DNA-damage-response der Zellen, wodurch es zur Einleitung von Seneszenz oder Apoptose kommt (Abbildung 11). Wenn die DNA-Schäden, die durch diese Effektkaskade verursacht werden, zu stark werden, könnte dies zur dysplastischen Degeneration der Zellen führen. Es scheint jedoch so, dass die durch *S. mansoni* verursachten Schäden nicht ausreichen, um alleine Neoplasien zu verursachen. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür wäre, dass die etablierten Abwehrmechanismen der Zellen dysplastische Entwicklungen gerade noch verhindern können. Kürzlich schlugen *El-Tonsy et al.* vor, dass die Schäden, die durch *S. mansoni* in den Lebern von betroffenen Patienten verursacht werden, einen eher langsamen, progressiven Charakter haben und allein nicht potent genug sind, um eine HCC-Bildung

in einer normalen Lebensspanne eines Menschen zu initiieren. Sollte jedoch eine weitere leberschädigende Noxe präsent sein, dann wird die HCC-Entwicklung schneller und aggressiver sein, da sich die Leber bereits in einem vorgeschädigten Status befindet.⁴¹ Diese Hypothese scheint sehr gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu korrelieren. Hier wurden sowohl Anzeichen für die Schäden die durch *S. mansoni* entstehen (Aktivierung von Protoonkogenen, proliferativer Stress) als auch den Abwehrmechanismen der Zellen für diese Schäden gefunden (Seneszenz, Apoptose). Es scheint, als wären die Hepatozyten in der Lage, die durch *S. mansoni*-Infektion induzierten Schäden durch ihre Abwehrmechanismen zu kompensieren, wodurch eine maligne Entartung verhindert wird. Bei Vorliegen einer zusätzlichen schädigenden Noxe wie einer HBV-Infektion sind die Abwehrmechanismen zur Prävention von Karzinogenese jedoch bereits erschöpft und können die zusätzlichen Schäden durch die zweite Infektion nicht mehr neutralisieren. Deswegen kommt es bei Co-Infektionen zu einem früheren Auftreten der Tumoren und einem aggressiveren Verlauf.

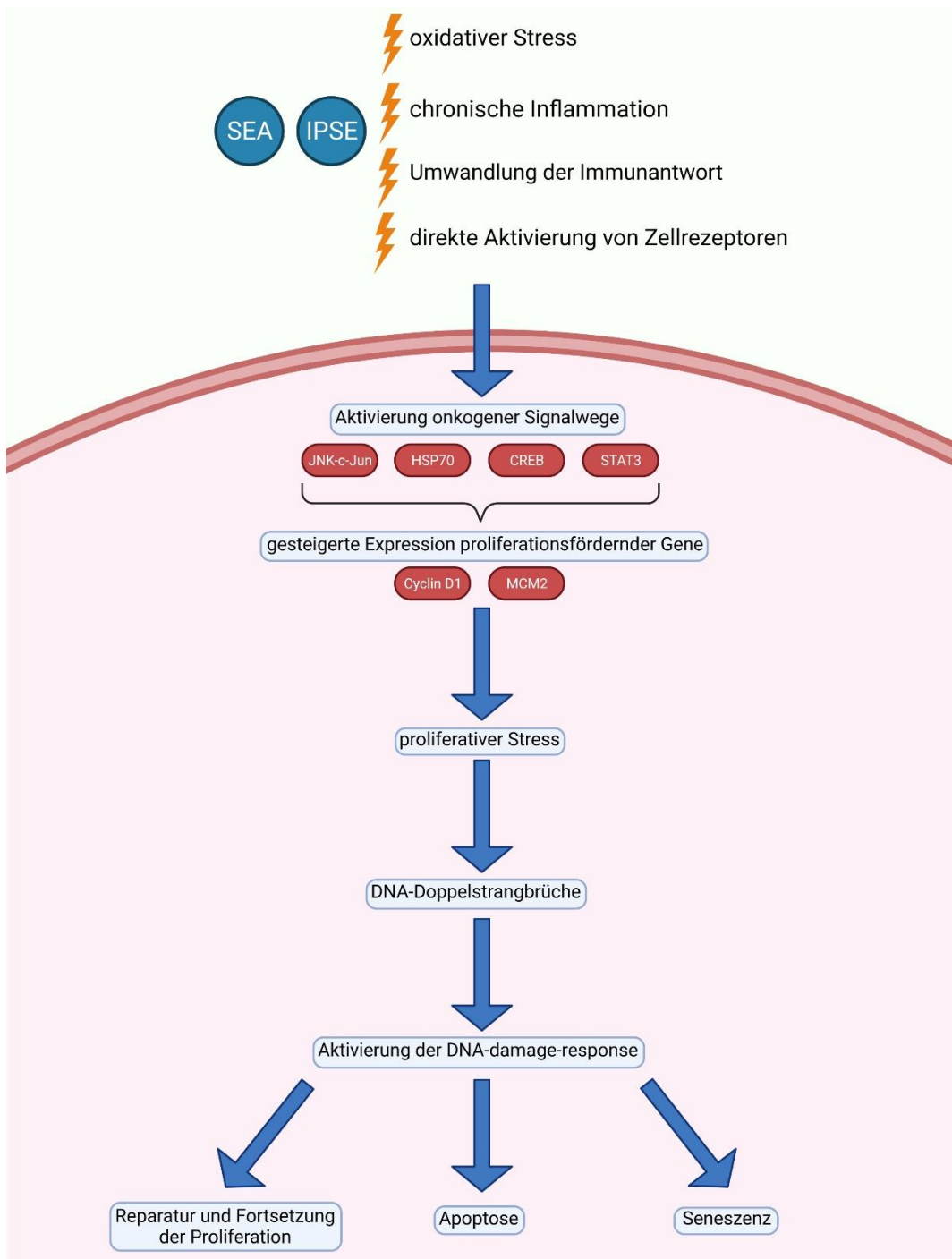


Abbildung 11: Zusammenfassung der Ergebnisse und des vorgeschlagenen Mechanismus Direkte Interaktionen von SEA/IPSE mit Zellrezeptoren und indirekte Effekte wie oxidativer Stress, können in den Zellen zur Aktivierung onkogener Signalwege führen. Dadurch kommt es zur Steigerung der Expression proliferationsfördernder Gene. Dies führt zu proliferativem Stress, der DNA-Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüchen zur Folge hat. Durch die Aktivierung der DNA-damage-response kommt es schließlich zur Reparatur der Schäden, der Einleitung von Apoptose oder Seneszenz. *Created with BioRender.com*

4.6 Limitierungen dieser Arbeit

Für die in dieser Arbeit diskutierten Experimente wurden sowohl Zellkultur- als auch Tierversuche durchgeführt. Tierversuche müssen immer kritisch daraufhin hinterfragt werden, ob der potentielle Wissens- und Verständnis-Zugewinn, im Vergleich zu der Tötung der Tiere gerechtfertigt ist. Ein Ethikvotum muss beantragt und erworben werden, um zu validieren, ob Tierexperimente anwendbar sind. *In vivo* Experimente sind jedoch von hoher Bedeutung, um die Ergebnisse der Zellkultur zu bestätigen, da sie die Konditionen im Körper realistischer simulieren als reine Zellkulturversuche. Gemäß den Prinzipien der 3Rs wurden für diese Studie Leberproben weiblicher Hamster verwendet, die für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus von *S. mansoni* bestimmt waren. Somit konnten Leberproben, die ansonsten verworfen worden wären, noch wichtige Forschungseinblicke liefern. Die in dieser Studie genutzten Hamster haben einen wertvollen Wissensgewinn darüber ermöglicht, wie *S. mansoni*-Eier ihr umgebenes Gewebe beeinflussen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Eier und ihre enthaltenen Biomoleküle wie SEA und IPSE auch Hepatozyten beeinflussen können, obwohl die Eier von einem dicht gepackten Granulom umschlossen sind. Dies sind Erkenntnisse, die *in vitro* nicht zu überprüfen gewesen wären.

Für die Zellkulturversuche wurden hiPS-HEP-Zellen verwendet, die derzeit als Goldstandart für Lebertoxizitätstestungen angesehen werden.⁷⁷ Während der Experimente zeigte sich allerdings, dass die Zellen sehr leicht durch Veränderungen der Kulturbedingungen stimulierbar sind. In einigen Versuchen zeigten die Zellen ein sehr hohes Basislevel an c-Jun-Expression und Phosphorylierung, was andeutet, dass die Zellen schon vor der SEA/IPSE-Behandlung unter Stress standen. In Abb. 7B wird deutlich, dass die p-c-Jun-Spiegel in der Kontrolle fast so hoch waren wie in den SEA-stimulierten Zellen; MCM2 hingegen war nur in den stimulierten Zellen erhöht. Dieses Problem der gestressten Zellen ohne korrespondierenden Stimulus ist ein Phänomen, das in zukünftigen Experimenten adressiert und verbessert werden sollte.

In Abb. 8A wird deutlich, dass die Menge an p-c-Jun innerhalb der Gruppe der monosex-infizierten Hamster stark schwankte. Sie reicht von einem Expressionsspiegel ähnlich der WT-Hamster bis zu dem der bisex-infizierten Hamster. Diese Experimente wurden mehrfach durchgeführt, so dass eine Verwechslung der Proben ausgeschlossen werden kann. Die wahrscheinlichste Erklärung beruht auf interindividuellen Unterschieden der assoziierten Leberpathologie, die auch bei einer monosex-Infektion nicht zu

vernachlässigen ist. Histologisch wird dies insbesondere durch unterschiedlich starke inflammatorische Infiltrate in den Lebern einzelner Tiere deutlich.

4.7 Ausblick auf zukünftige Forschung

Diese Arbeit erbrachte erstmals tieferreichende Einblicke in die Mechanismen, die für das karzinogene Potential von *S. mansoni* verantwortlich sind. Sie liefert außerdem einen Erklärungsversuch, warum eine *S. mansoni*-Infektion alleine trotzdem nicht zur Krebsentstehung führt, diese jedoch bei Vorliegen einer zusätzlichen Noxe potenzieren kann. Das hier hauptsächlich untersuchte Protoonkogen c-Jun wurde sowohl Upstream als auch Downstream verfolgt. So konnte gezeigt werden, dass c-Jun über den MMK4/7-JNK-Signalweg durch SEA/IPSE aktiviert wird. Interessant wäre noch, welche Zellrezeptoren durch die extrazellulär vorliegenden Stoffe SEA/IPSE aktiviert werden, um intrazellulär die Aktivierung der MAPK-Kaskade einzuleiten. Zukünftige Inhibitionsexperimente könnten hier durch spezifische Hemmung einzelner Rezeptoren Aufklärung verschaffen. Neben dem in dieser Arbeit untersuchten JNK-c-Jun-Signalweg wurden noch weitere onkogene Signalwege aufgedeckt, die durch die *S. mansoni*-Eier aktiviert werden. Dies stellt einen spannenden Ansatz für zukünftige Forschung dar, insbesondere da einige der hier vorgestellten Ergebnisse darauf hinweisen, dass das onkogene Potential nicht alleine auf eine c-Jun Aktivierung zurückzuführen ist. So zeigten die immunhistochemischen Analysen, dass die Proliferationsmarker MCM2 und Cyclin D1 als auch der Seneszenzmarker p27 teilweise in Hepatozyten exprimiert wurden, die c-Jun negativ waren. Dies deutet darauf hin, dass andere Faktoren die Expression dieser Marker in Hepatozyten verursachten. Der Proteom Profiler ergab bereits erste Hinweise, welche anderen Signalwege an den *S. mansoni*-vermittelten Effekten beteiligt sein könnten, nämlich CREB, HSP70 und STAT3. Somit stehen für follow-up Studien bereits erste Forschungsziele zur Verfügung, die untersucht werden können. In laufenden Studien wird momentan versucht, die hier erbrachten Ergebnisse in Darmgewebe zu replizieren. *S. mansoni*-Eier bleiben auch dort im Gewebe fixiert und könnten ähnliche Effekte wie in der Leber verursachen.

Insgesamt bleibt zu hoffen, dass die hier erbrachten, ersten Fortschritte in der Aufdeckung der Aktivierung onkogener Signalwege durch Schistosomen einen Anstoß für weitere Forschung auf diesem Gebiet darstellen. Als eine der von der WHO als neglected-diseases bezeichneten Erkrankungen stellt die Schistosomiasis weltweit ein großes Problem dar. Das Forschungsinteresse auf diesem Gebiet ist dennoch gering, weil die

Erkrankung in den westlichen Ländern noch eine Rarität darstellt. Durch einen global gesteigerten Forschungsaufwand könnten viele der heute noch unzureichend untersuchten neglected-diseases schneller und besser erforscht werden. Auf dieser Grundlage könnten dann verbesserte Diagnostik- und Therapieverfahren für diese global weit verbreiteten Erkrankungen entwickelt werden, um Millionen Menschen eine höhere Lebensqualität zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Die Schistosomiasis ist weltweit eine der häufigsten parasitären Infektionskrankheiten mit derzeit mehr als 230 Millionen Menschen die eine präventive Behandlung benötigen. Ausgelöst wird die Erkrankung von Trematoden des Genus *Schistosoma*, von denen fünf verschiedene humanpathogene Formen bekannt sind. Schon seit längerer Zeit werden Schistosomiasis-Infektionen mit Karzinogenese in Verbindung gebracht. Dabei gilt *S. haematobium* als ein bestätigtes Karzinogen für Blasenkrebs. *S. mansoni* hingegen wird als ein mögliches Karzinogen für die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms diskutiert, ohne das je eine direkte Beziehung nachgewiesen werden konnte. Für das karzinogene Potential der Schistosome werden aktuell in der Literatur die Etablierung einer chronischen Inflammation, oxidativer Stress, Immunmodulation und die Aktivierung von Protoonkogenen diskutiert. In Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass *S. mansoni*-Eier das Protoonkogen c-Jun aktivieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen dieser Aktivierung zu untersuchen und ihre Downstream-Effekte zu erforschen. Hierzu wurden Zellkulturversuche mit hiPS-HEP-Zellen durchgeführt, die mit aus *S. mansoni*-Eiern isolierten Stoffen stimuliert wurden. Des Weiteren wurden Hamsterlebern von *S. mansoni*-infizierten Hamstern mittels Immunhistochemie und Western Blot-Analysen untersucht. Das Protoonkogen c-Jun wurde in Hepatozyten durch SEA/IPSE-Stimulation über den MKK4/7-JNK-Signalweg aktiviert. Diese Aktivierung führte außerdem zur erhöhten Expression der Proliferationsmarker MCM2 und Cyclin D1. Zusätzlich wurden Hinweise auf Apoptose- und Seneszenz-Einleitung gefunden. Zusammen mit dem aus Vorversuchen bekanntem Ergebnis, dass SEA in Hepatozyten DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen verursacht, erschloss sich hieraus, dass die Leberzellen unter proliferativem Stress stehen. Die Hypothese die aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden kann lautet, dass die *S. mansoni*-Eier über Ei-sekretierte Faktoren Protoonkogene wie c-Jun in Hepatozyten aktivieren. Dies führt über die erhöhte Expression von Proliferationsmarkern wie MCM2 und Cyclin D1 zu proliferativem Stress, wodurch DNA-Schäden entstehen. Diese DNA-Schäden führen zur Aktivierung der DNA-damage-response der Hepatozyten, worüber Abwehrmechanismen wie die Induktion von Seneszenz oder Apoptose eingeleitet werden. Insgesamt erbrachte die vorliegende Arbeit somit erste tieferreichende Einblicke in das karzinogene Potential einer *S. mansoni*-Infektion durch Aufklärung der Aktivierungssequenz und der Downstream-Effekte einer *S. mansoni*-vermittelten c-Jun-Aktivierung.

6 Summary

Schistosomiasis is one of the most-common parasitic diseases worldwide, with more than 230 million people currently requiring preventive treatment. The disease is caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, of which five different subspecies can infect humans. Schistosomiasis-infections have been associated with carcinogenesis for a long time. *S. haematobium* is considered a definite carcinogen for bladder cancer. In contrast, *S. mansoni* has been discussed as a possible carcinogen for hepatocellular carcinoma, with no clear association ever being made. The mechanisms, which are currently being discussed in the literature for schistosomiasis-related carcinogenesis, are the induction of chronic inflammation, oxidative stress, modulation of the immune response and the activation of protooncogenes. In previous work we demonstrated the activation of the protooncogene c-Jun via *S. mansoni* eggs. The goal of this study was to elucidate the mechanisms of this activation and its' downstream effects. For this purpose, cell culture experiments with hiPS-HEP-cells, which were stimulated with substances isolated from *S. mansoni* eggs, were performed. Additionally, hamster livers of *S. mansoni*-infected hamsters were analysed via immunohistochemistry and Western Blots. The protooncogene c-Jun was activated via the MKK4/7-JNK-pathway in hepatocytes stimulated with SEA/IPSE. Additionally, this activation led to an increased expression of proliferation markers like MCM2 and Cyclin D1. Furthermore, evidence suggesting the induction of apoptosis and senescence was revealed as well. This, taken together with the results from our previous work, which showed that SEA could induce DNA-damage in the form of DNA-double-strand breaks in hepatocytes, led to the conclusion that the liver cells suffer from replication stress. The hypothesis that can be deduced from these findings is that egg-secreted factors from the *S. mansoni* eggs activate protooncogenes like c-Jun in surrounding hepatocytes. This causes replication stress via an increased expression of proliferation markers like MCM2 and Cyclin D1, which leads to DNA-damage. This DNA-damage in turn activates the DNA-damage-response of the hepatocytes, which results in the activation of cellular defence mechanisms, like the induction of apoptosis or senescence. In summary, this work provides first major insights into the carcinogenic potential of a *S. mansoni* infection by elucidating the activation sequence and downstream-effects of a *S. mansoni*-induced c-Jun activation.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
AP-1	activator protein-1	Aktivatorprotein-1
APS	ammonium persulfate	Ammoniumpersulfat
ATF	activating transcription factor	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATM	ataxia telangiectasia mutated	Ataxia telangiectasia mutiert
CDK	cyclin-dependent kinase	Cyclin-abhängige Kinase
Chk	checkpoint kinase	Checkpointkinase
CREB	cAMP response element- binding protein	cAMP Antwortelementbindendes Protein
DC	dendritic cells	Dendritische Zellen
DDR	DNA-damage-response	DNA-Schadensantwort
DEN	diethylnitrosamine	Diethylnitrosamin
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-double-strand breaks	DNA-Doppelstrangbrüche
DTT	1,4-Dithiothreitol	1,4-Dithiothreitol
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Europäisches Zentrum für Krankheitskontrolle und- prävention
EGF	epidermal growth factor	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	extracellular signal-regulated kinase	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FCS	fetal calf serum	fetales Kälberserum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyd 3- Phosphatdehydrogenase
GSK-3	glycogen Synthase kinase 3	Glykogensynthase-Kinase 3
H ₂ O _{dd}	distilled water	destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	Wasserstoffperoxid
HBV	hepatitis B virus	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatocellular carcinoma	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	hydrogen chloride	Chlorwasserstoff
HCV	hepatitis C virus	Hepatitis-C-Virus
hiPS-HEP	human induced stem-cell derived hepatocytes	menschlich induzierte, stammzell-entstammte Hepatozyten
HRP	horseradish peroxidase	Meerrettich-Peroxidase
HSP70	heat shock protein 70	Hitzeschockprotein 70
IARC	International Agency for Reasearch on Cancer	Internationale Agentur für Krebsforschung
IgG	immunoglobulin G	Immunglobulin G
IL-10	interleukin 10	Interleukin 10
IL-13	interleukin 13	Interleukin 13
IL-2	interleukin 2	Interleukin 2
IL-4	interleukin 4	Interleukin 4
IL-5	interleukin 5	Interleukin 5

IL-6	interleukin 6	Interleukin 6
INF γ	interferon γ	Interferon γ
IPSE	IL-4-inducing principle from <i>Schistosoma mansoni</i> eggs	IL-4-induzierendes Prinzip aus <i>Schistosoma mansoni</i> Eiern
JNK	c-Jun-N-terminal kinase	c-Jun-N-terminale Kinase
KCl	potassium chloride	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	potassium hydrogen phosphate	Kaliumhydrogenphosphat
MAP3K	mitogen-activated protein kinase kinase kinase	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen-Kinasen-Kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen-Kinase
MKK4	mitogen-activated protein kinase kinase 4	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen-Kinase 4
MKK7	mitogen-activated protein kinase kinase 7	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen-Kinase 7
MCM	mini-chromosome maintenance complex	Mini-Chromosom Erhaltungskomplex
Na ₂ HPO ₄	disodium hydrogen phosphate	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	sodium chloride	Natriumchlorid
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Nukleärer Faktor kappa-Leichtketten-Verstärker von aktivierten B-Zellen
nIPSE	natural IPSE	natürliches IPSE
NK-Zellen	natural killer cells	natürliche Killerzellen
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1
p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1B
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	Nukleäres Antigen proliferierender Zellen
PDGF	platelet-derived growth factor	Plättchen-entstammter Wachstumsfaktor
pRB	retinoblastoma protein	Retinoblastomprotein
PTEN	phosphatase and tensin homolog	Phosphatase und Tensin Homolog
PVDF	polyvinylidene fluoride	Polyvinylidenfluorid
ROS	reactive oxygen species	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. mekongi</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Schistosoma mekongi</i>
SAPK	stress-activated protein kinase	Stress-aktivierte Proteinkinase

Abkürzungsverzeichnis

SDS	sodium dodecyl sulphate	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese
SEA	soluble egg antigen	lösliches Ei-Antigen
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	Signal Umwandler und Aktivator der Transkription 3
TBS	Tris-buffered saline	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-buffered saline + Tween20	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween20
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetramethylenethylendiamin
TGF	Transforming growth factor	Transformierender Wachstumsfaktor
Th1-Zellen	Type 1 T-helper cell	Typ 1 T-Helferzelle
Th2-Zellen	Type 2 T-helper cell	Typ 2 T-Helferzelle
TNF α	tumor necrosis factor α	Tumornekrosefaktor α
Treg	regulatory T-cells	regulatorische T-Zellen
WHO	World Health Organisation	Weltgesundheitsorganisation
γ -H2AX	H2A histone family member X	H2A Histonfamilienmitglied X

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von Schistosomen am Beispiel von <i>S. mansoni</i>	4
Abbildung 2: MAPK-Aktivierungskaskade	11
Abbildung 3: Versuchsaufbau der Experimente	16
Abbildung 4: Regressionsgerade für c-Jun/GAPDH.	26
Abbildung 5: Proteom Profiler und Western Blot Analysen von hiPS-HEP-Zellen	34
Abbildung 6: Western Blot Analyse von hiPS-HEP-Zellen. Stimulation- und Inhibitionsexperimente demonstrieren das MKK4/7 und JNK Upstream von c-Jun aktiviert sind.....	35
Abbildung 7: Western Blot Analysen von hiPS-HEP-Zellen der Proliferations- und Apoptosemarker MCM2 und cleaved Caspase 3	37
Abbildung 8: Western Blot und statistische Analyse der Expression und Phosphorylierung von c-Jun, MCM2 und Cyclin D1 in Kontroll-, monosex- und bisex- infizierten Hamstern.....	39
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung von bisex <i>S. mansoni</i> -infizierten Hamsterlebern	41
Abbildung 10: Western Blot und immunhistochemische Analysen der c-Jun und p27 Expression in bisex <i>S. mansoni</i> -infizierten Hamsterlebern	42
Abbildung 11: Zusammenfassung der Ergebnisse und des vorgeschlagenen Mechanismus	54

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierprotokoll für das Trenngel	19
Tabelle 2: Pipettierprotokoll für das Sammelgel	19
Tabelle 3: Pipettierprotokoll für die HRP-Entwicklerlösung.....	20
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	27
Tabelle 5: Primäre Antikörper	29
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper	30
Tabelle 7: Kits	30
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 9: Instrumente und Geräte	31

10 Literaturverzeichnis

1. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2015;383(9936):2253-2264. doi:10.1016/S0140-6736(15)61949-2
2. WHO. Schistosomiasis. Published 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> abgerufen am 15.01.22 um 12:35
3. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. 2006 - Steinmann - Schisto and water resources development - review of people at-risk. Published online 2006:411-425. <http://infection.thelancet.com/vol>
4. WHO. Schistosomiasis (Bilharzia). Published 2022. https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1 abgerufen am 15.01.22 um 12:42
5. U Olveda D. Bilharzia: Pathology, Diagnosis, Management and Control. *Tropical Medicine & Surgery*. 2013;01(04):1-19. doi:10.4172/2329-9088.1000135
6. Boissier J, Moné H, Mitta G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015;15(7):757-758. doi:10.1016/S1473-3099(15)00084-5
7. Kincaid-Smith J, Rey O, Toulza E, Berry A, Boissier J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A Need to Quantify the Risks. *Trends in Parasitology*. 2017;33(8):600-609. doi:10.1016/j.pt.2017.04.009
8. ECDC. Local transmission of *Schistosoma haematobium* in Corsica , France Main conclusions and options for mitigation. *Rapid Risk Assessment*. 2014;(May). http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/risk-assessment-Schistosoma-haematobium-Corsica-update_TOR1N6.pdf abgerufen am 17.01.22 um 18:29
9. Burchard G, Ehrhardt S, Grobusch M, Junghans T, Löscher T, Reisinger E, Richter J, Stich A, Sudeck H. Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Schistosomiasis (Bilharziose). *AWMF online Das Portal der wissenschaftlichen Medizin*. 2013;42(5):1-36.
10. McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN. Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4(1):1-19. doi:10.1038/s41572-018-0013-8
11. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research*. 2013;4(5):433-444. doi:10.1016/j.jare.2013.01.005
12. Gonçalves-Macedo L, Lopes EP, Domingues ALC, Markman-Filho B, Mota VG, Luna CF. Schistosomiasis and hepatopulmonary syndrome: The role of concomitant liver cirrhosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(7):469-473. doi:10.1590/0074-02760160383
13. Ishii A, Matsuoka H, Aji T, Ohta N, Arimoto S, Wataya Y, Hayatsu H. Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1994;305(2):273-281. doi:10.1016/0027-5107(94)90247-X
14. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. 2012;100(Pt B):371-384.

15. van Tong H, Brindley PJ, Meyer CG, Velavan TP. Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine*. 2017;15:12-23. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.034
16. Weglage J, Wolters F, Hehr L, Lichtenberger J, Wulz C, Hempel F, Baier A, Quack T, Köhler K, Longerich T, Schramm G, Irungbam K, Mueller H, von Buelow V, Tschuschner A, Odenthal M, Drebber U, Arousy M el, Ramalho LNZ, Bankov K, Wild P, Pons-Kühnemann J, Tschammer J, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Schistosoma mansoni eggs induce Wnt/ β -catenin signaling and activate the protooncogene c-Jun in human and hamster colon. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-14. doi:10.1038/s41598-020-79450-4
17. Kamal S, Madwar M, Bianchi L, Tawil AEL, Fawzy R, Peters T, Rasenack JWF. Clinical, virological and histopathological features: Long-term follow-up in patients with chronic hepatitis C co-infected with S. mansoni. *Liver*. 2000;20(4):281-289. doi:10.1034/j.1600-0676.2000.020004281.x
18. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Reading L9 - Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006;368(9541):1106-1118. doi:10.1016/S0140-6736(06)69440-3
19. Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(16):1212-1220. doi:10.1056/NEJMra012396
20. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(3):666-675. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.007
21. P. K. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review*. 2003;8(3):223-246.
22. Zheng B, Zhang J, Chen H, Nie H, Miller H, Gong Q, Liu C. T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11(February):1-13. doi:10.3389/fimmu.2020.00061
23. Grzych J marie, Pearce E, Cheever A, Caulada A, Caspar P, Lewis F, Sher A. EGG DEPOSITION IS THE MAJOR STIMULUS FOR THE PRODUCTION OF Th2 CYTOKINES IN MURINE SCHISTOSOMIASIS MANSONI. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1991;146(4):1322-1327.
24. Pearce EJ. Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunology*. 2005;27(7-8):265-270. doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00765.x
25. Carvalho L, Sun J, Kane C, Marshall F, Krawczyk C, Pearce EJ. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology*. 2009;126(1):28-34. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03008.x
26. Zaccane P, Burton OT, Gibbs SE, Miller N, Jones FM, Schramm G, Haas H, Doenhoff MJ, Dunne DW, Cooke A. The S. mansoni glycoprotein ω -1 induces Foxp3 expression in NOD mouse CD4 + T cells. *European Journal of Immunology*. 2011;41(9):2709-2718. doi:10.1002/eji.201141429
27. Everts B, Hussaarts L, Driessen NN, Meevissen MHJ, Schramm G, van der Ham AJ, van der Hoeven B, Scholzen T, Burgdorf S, Mohrs M, Pearce EJ, Hokke CH, Haas H, Smits HH,

- Yazdanbakhsh M. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(10):1753-1767. doi:10.1084/jem.20111381
28. Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, Amadou A, Plymoth A, Roberts LR, Diseases L, Angeles L, Angeles L, Angeles L, Group B, Institutet K. HHS Public Access prevention and management. 2019;16(10):589-604. doi:10.1038/s41575-019-0186-y.A
29. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-2576. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061
30. Onkologie L. Konsultationsfassung Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Wesentliche Neuerungen in der Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. Published online 2021:29-109.
31. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Seminars in Liver Disease*. 2010;30(1):3-16. doi:10.1055/s-0030-1247128
32. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-2576. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061
33. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127(5 SUPPL.):5-16. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.011
34. Massarweh NN, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control*. 2017;24(3):1-11. doi:10.1177/1073274817729245
35. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Incidence and risk factors. *Gastroenterology*. 2004;127(5 SUPPL.):35-50. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.014
36. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2014;383(9930):1749-1761. doi:10.1016/S0140-6736(14)60121-5
37. Okushin K, Tsutsumi T, Ikeuchi K, Kado A, Enooku K, Fujinaga H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K. Helicobacter pylori infection and liver diseases: Epidemiology and insights into pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2018;24(32):3617-3625. doi:10.3748/wjg.v24.i32.3617
38. Shi Y, Jiang Z, Yang Y, Zheng P, Wei H, Lin Y, Lv G, Yang Q. Clonorchis sinensis infection and co-infection with the hepatitis B virus are important factors associated with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Parasitology Research*. 2017;116(10):2645-2649. doi:10.1007/s00436-017-5572-1
39. Omar HH, Taha SA, Hassan WH, Omar HH. Impact of schistosomiasis on increase incidence of occult hepatitis B in chronic hepatitis C patients in Egypt. *Journal of Infection and Public Health*. 2017;10(6):761-765. doi:10.1016/j.jiph.2016.11.010
40. Abdel-Rahim AY. Parasitic infections and hepatic neoplasia. *Digestive Diseases*. 2001;19(4):288-291. doi:10.1159/000050695

41. El-Tonsy MM, Hussein HM, Helal TES, Tawfik RA, Koriem KM, Hussein HM. Human Schistosomiasis mansoni associated with hepatocellular carcinoma in Egypt: current perspective. *Journal of Parasitic Diseases*. 2016;40(3):976-980. doi:10.1007/s12639-014-0618-0
42. El-Tonsy MM, Hussein HM, Helal TES, Tawfik RA, Koriem KM, Hussein HM. Schistosoma mansoni infection: Is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? *Acta Tropica*. 2013;128(3):542-547. doi:10.1016/j.actatropica.2013.07.024
43. Toda KS, Kikuchi L, Chagas AL, Tanigawa RY, Paranaguá-vezozzo DC, Pfiffer T, Rocha MDS, Avancini V, Alves F, Carrilho FJ. Hepatocellular Carcinoma Related to Schistosoma mansoni Infection: Case Series and Literature Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015;3(4):260-264. doi:10.14218/jcth.2015.00027
44. von Bülow V, Lichtenberger J, Grevelding CG, Falcone FH, Roeb E, Roderfeld M. Does Schistosoma Mansoni Facilitate Carcinogenesis? *Cells*. 2021;10(8). doi:10.3390/cells10081982
45. E. P. Association between schistosomiasis and cancer: A review. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2007;15(3):145-148.
46. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. 2001;20(19 REV. ISS. 2):2390-2400. doi:10.1038/sj.onc.1204383
47. Meng Q, Xia Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein and Cell*. 2011;2(11):889-898. doi:10.1007/s13238-011-1113-3
48. Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *European Journal of Cell Biology*. 2014;93(1-2):76-81. doi:10.1016/j.ejcb.2013.10.003
49. Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK, Tjian R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*. 1987;238(4832):1386-1392. doi:10.1126/science.2825349
50. Wisdom R, Johnson RS. <Wisdom-1999-c-Jun regulates cell.pdf>. 1999;18(1):188-197.
51. Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997;9(2):240-246. doi:10.1016/S0955-0674(97)80068-3
52. Gen SW. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biology and Therapy*. 2004;3(2):156-161. doi:10.4161/cbt.3.2.614
53. Bubici C, Papa S. JNK signalling in cancer: In need of new, smarter therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*. 2014;171(1):24-37. doi:10.1111/bph.12432
54. Zeke A, Misheva M, Reményi A, Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016;80(3):793-835. doi:10.1128/mubr.00043-14
55. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF. Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell*. 2003;112(2):181-192. doi:10.1016/S0092-8674(03)00042-4

56. Trierweiler C, Hockenjos B, Zatloukal K, Thimme R, Blum HE, Wagner EF, Hasselblatt P. The transcription factor c-JUN/AP-1 promotes HBV-related liver tumorigenesis in mice. *Cell Death and Differentiation*. 2016;23(4):576-582. doi:10.1038/cdd.2015.121
57. Wu Q, Wu W, Fu B, Shi L, Wang X, Kuca K. JNK signaling in cancer cell survival. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(6):2082-2104. doi:10.1002/med.21574
58. Schmitz S, Desel C. Zellzyklus und Proliferation, Differenzierung und Seneszenz. In: *Der Experimentator Zellbiologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2018:113-129. doi:10.1007/978-3-662-56111-9_5
59. Welsch U, Kummer W, Deller T. *Lehrbuch Histologie*. 4th ed. Elsevier GmbH.; 2014. 67-75.
60. Koch B. Untersuchungen zur Regulation des G1 / S - Checkpoints. *Dissertation*. Published online 2010.
61. Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2005;16(3):311-321. doi:10.1016/j.semcdb.2005.02.007
62. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(3):1-12. doi:10.1101/cshperspect.a008904
63. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(45):42462-42467. doi:10.1074/jbc.C100466200
64. Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;1(3):179-186. doi:10.1038/35043058
65. Netzker R. Ablauf der Replikation. In: Deutzmann R, Hauser K, Netzker R, Rassow J, eds. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2012. doi:10.1055/b-002-6235
66. Ishimi Y. Regulation of MCM2-7 function CDC45. Published online 2018:125-133.
67. Li, Xu. Post-Translational Modifications of the Mini-Chromosome Maintenance Proteins in DNA Replication. *Genes*. 2019;10(5):331. doi:10.3390/genes10050331
68. Yousef EM, Furrer D, Laperriere DL, Tahir MR, Mader S, Dlorio C, Gaboury LA. MCM2: An alternative to Ki-67 for measuring breast cancer cell proliferation. *Modern Pathology*. 2017;30(5):682-697. doi:10.1038/modpathol.2016.231
69. Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(5):276-280. doi:10.1038/nrc3916
70. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes and Development*. 2014;28(2):99-114. doi:10.1101/gad.235184.113
71. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*. 2019;99(2):1047-1078. doi:10.1152/physrev.00020.2018
72. Flores JM, Martín-Caballero J, García-Fernández RA. P21 and p27 a shared senescence history. *Cell Cycle*. 2014;13(11):1655-1656. doi:10.4161/cc.29147

73. Chen J, Pan J, Wang J, Song K, Zhu D, Huang C, Duan Y. Soluble egg antigens of *Schistosoma japonicum* induce senescence in activated hepatic stellate cells by activation of the STAT3/p53/p21 pathway. *Scientific Reports*. 2016;6(July):1-11. doi:10.1038/srep30957
74. Roderfeld M, Padem S, Lichtenberger J, Quack T, Weiskirchen R, Longerich T, Schramm G, Churin Y, Irunbam K, Tschuschner A, Windhorst A, Grevelding CG, Roeb E. *Schistosoma mansoni* Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. *Hepatology*. Published online 2019. doi:10.1002/hep.30192
75. Nakabayashi H, Miyano K, Sato J, Yamane T, Taketa K. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research*. 1982;42(9):3858-3863.
76. Holmgren G, Ulfenborg B, Asplund A, Toet K, Andersson CX, Hammarstedt A, Hanemaaijer R, Küppers-Munther B, Synnergren J. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes with mature features and potential for modeling metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(2). doi:10.3390/ijms21020469
77. Pradip A, Steel D, Jacobsson S, Holmgren G, Ingelman-Sundberg M, Sartipy P, Björquist P, Johansson I, Edsbacke J. High content analysis of human pluripotent stem cell derived hepatocytes reveals drug induced steatosis and phospholipidosis. *Stem Cells International*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/2475631
78. Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinović V, Cabral JMS, Fonseca LP. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*. 2003;9(03):199-247. doi:10.1016/S1387-2656(03)09003-3
79. Liu PF, Hu YC, Kang BH, Tseng YK, Wu PC, Liang CC, Hou YY, Fu TY, Liou HH, Hsieh IC, Ger LP, Shu CW. Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*. 2017;12(7):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0180620
80. de Laval F, Savini H, Bianche-Valero E, Simon F. Human schistosomiasis: An emerging threat for Europe. *The Lancet*. 2014;384(9948):1094-1095. doi:10.1016/S0140-6736(14)61669-X
81. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne JF, Huyse T, Mas-Coma S, Toulza E, Barré-Cardi H, Rollinson D, Kincaid-Smith J, Oleaga A, Galinier R, Foata J, Rognon A, Berry A, Mouahid G, Henneron R, Moné H, Noel H, Mitta G. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(8):971-979. doi:10.1016/S1473-3099(16)00175-4
82. Basílio-de-Oliveira CA, Aquino A, Simon EF, Eyer-Silva WA. Concomitant prostatic schistosomiasis and adenocarcinoma: case report and review. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2002;6(1):45-49. doi:10.1590/S1413-86702002000100007
83. H Salim OE, Hamid HKS, Mekki SO, Suleiman SH, Ibrahim SZ. Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: A possible causal relationship. *World Journal of Surgical Oncology*. 2010;8:1-6. doi:10.1186/1477-7819-8-68

84. Soliman NA, Keshk WA, Shoheib ZS, Ashour DS, Shamloula MM. Inflammation, Oxidative Stress and L-Fucose as Indispensable Participants in Schistosomiasis-Associated Colonic Dysplasia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(3):1125-1131. doi:10.7314/apjcp.2014.15.3.1125
85. Kennedy R. Multiple roles for CD4 T cells in anti-tumor immune responses_KennedyCelisImmRev08.pdf. 2008;222:129-144.
86. Tang QF, Ji Q, Tang Y, Hu SJ, Bao YJ, Peng W, Yin PH. Golgi Phosphoprotein 2 Down-regulates the Th1 Response in Human Gastric Cancer Cells by Suppressing IL-12A. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;14(10):5747-5751. doi:10.7314/apjcp.2013.14.10.5747
87. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Research*. 2011;71(4):1263-1271. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907
88. Yan J, Liu XL, Xiao G, Li NL, Deng YN, Han LZ, Yin LC, Ling LJ, Liu LX. Prevalence and clinical relevance of T-helper cells, Th17 and Th1, in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*. 2014;9(5):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0096080
89. Larsen H, Muz B, Khong TL, Feldmann M, Paleolog EM. Differential effects of Th1 versus Th2 cytokines in combination with hypoxia on HIFs and angiogenesis in RA. *Arthritis Research and Therapy*. 2012;14(4):R180. doi:10.1186/ar3934
90. Budhu A, Forgues M, Ye QH, Jia HL, He P, Zanetti KA, Kammula US, Chen Y, Qin LX, Tang ZY, Wang XW. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*. 2006;10(2):99-111. doi:10.1016/j.ccr.2006.06.016
91. Hattori E, Okumoto K, Adachi T, Takeda T, Ito JI, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Saito T, Togashi H, Kawata S. Possible contribution of circulating interleukin-10 (IL-10) to anti-tumor immunity and prognosis in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2003;27(4):309-314. doi:10.1016/j.hepres.2003.07.002
92. Berghella AM, Contasta I, Pellegrini P, del Beato T, Adorno D. Peripheral blood immunological parameters for use as markers of pre-invasive to invasive colorectal cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2002;17(1):43-50. doi:10.1089/10849780252824064
93. Madbouly KM, Senagore AJ, Mukerjee A, Hussien AM, Shehata MA, Navine P, Delaney CP, Fazio VW. Colorectal cancer in a population with endemic *Schistosoma mansoni*: Is this an at-risk population? *International Journal of Colorectal Disease*. 2007;22(2):175-181. doi:10.1007/s00384-006-0144-3
94. Zalata KR, Nasif WA, Ming SC, Lotfy M, Nada A NA, El-Hak NG, Leech SH. p53, Bcl-2 and C-Myc expressions in colorectal carcinoma associated with schistosomiasis in Egypt. *Cellular Oncology*. 2005;27(4):245-253. doi:10.1155/2005/547010

95. Machida K, Tsukamoto H, Liu J. c-Jun mediates HCV hepatocarcinogenesis through STAT3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. *Hepatology* (... 2010;52(2):480-492. doi:10.1002/hep.23697.c-Jun
96. Wang C, Zhang Y, Guo K, Wang N, Jin H, Liu Y, Qin W. Heat shock proteins in hepatocellular carcinoma: Molecular mechanism and therapeutic potential. *International Journal of Cancer*. 2016;138(8):1824-1834. doi:10.1002/ijc.29723
97. Zhou SJ, Deng YL, Liang HF, Jaoude JC, Liu FY. Hepatitis B virus X protein promotes CREB-mediated activation of miR-3188 and notch signaling in hepatocellular carcinoma. *Cell Death and Differentiation*. 2017;24(9):1577-1587. doi:10.1038/cdd.2017.87
98. Shankar DB, Cheng JC, Kinjo K, Federman N, Moore TB, Gill A, Rao NP, Landaw EM, Sakamoto KM. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2005;7(4):351-362. doi:10.1016/j.ccr.2005.02.018
99. Steven A, Heiduk M, Recktenwald C v., Hiebl B, Wickenhauser C, Massa C, Seliger B. Colorectal carcinogenesis: Connecting K-RAS-induced transformation and CREB activity in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Research*. 2015;13(8):1248-1262. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0590
100. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(6):1181-1188. doi:10.1093/carcin/bgt111
101. Kumar S, Stokes J 3rd, Singh UP, Scissum Gunn K, Acharya A, Manne U, Mishra M. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters*. 2016;374(1):156-166. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.056
102. Zhe Y, Li Y, Liu D, Su DM, Liu JG, Li HY. Extracellular HSP70-peptide complexes promote the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via TLR2/4/JNK1/2MAPK pathway. *Tumor Biology*. 2016;37(10):13951-13959. doi:10.1007/s13277-016-5189-5
103. Jung KH, Yoo W, Stevenson HL, Deshpande D, Shen H, Gagea M, Yoo SY, Wang J, Eckols TK, Bharadwaj U, Tweardy DJ, Beretta L. Multifunctional Effects of a Small-Molecule STAT3 Inhibitor on NASH and Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(18):5537-5546. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2253
104. Wang J, Tai G. Role of C-Jun N-terminal Kinase in Hepatocellular Carcinoma Development. *Targeted Oncology*. 2016;11(6):723-738. doi:10.1007/s11523-016-0446-5
105. Watanabe T, Hiasa Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Ikeda Y, Matsuura B, Chung RT, Onji M. Protein Kinase R Modulates c-Fos and c-Jun Signaling to Promote Proliferation of Hepatocellular Carcinoma with Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE*. 2013;8(7). doi:10.1371/journal.pone.0067750
106. Hu Z, Luo D, Wang D, Ma L, Zhao Y, Li L. IL-17 Activates the IL-6/STAT3 Signal Pathway in the Proliferation of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(6):2379-2390. doi:10.1159/000484390
107. Dhanasekaran DN, Premkumar Reddy E. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes and Cancer*. 2017;8(9-10):682-694. doi:10.18632/genesandcancer.155

108. Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*. 2005;121(7):977-990. doi:10.1016/j.cell.2005.04.014
109. Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Mechanisms of liver disease: Cross-talk between the NF- κ B and JNK pathways. *Biological Chemistry*. 2009;390(10):965-976. doi:10.1515/BC.2009.111
110. Hagiwara S, Kudo M, Nagai T, Inoue T, Ueshima K, Nishida N, Watanabe T, Sakurai T. Activation of JNK and high expression level of CD133 predict a poor response to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2012;106(12):1997-2003. doi:10.1038/bjc.2012.145
111. Chen TTW, Cheng PC, Chang KC, Cao JP, Feng JL, Chen CC, Lam HYP, Peng SY. Activation of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes in a mouse model of *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Helminthology*. 2020;94. doi:10.1017/S0022149X19000622
112. Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF- κ B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(28):10544-10551. doi:10.1073/pnas.0603499103
113. Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015;10:425-448. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040424
114. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*. 2014;16(1):2-9. doi:10.1038/ncb2897
115. Venkatachalam G, Surana U, Clément MV. Replication stress-induced endogenous DNA damage drives cellular senescence induced by a sub-lethal oxidative stress. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(18):10564-40582. doi:10.1093/nar/gkx684
116. di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garré M, Giovanni Nuciforo P, Bensimon A, Maestro R, Giuseppe Pelicci P, D'Adda Di Fagagna F. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006;444(7119):638-642. doi:10.1038/nature05327

11 Anhang

11.1 Genehmigung Abbildung 1: Lebenszyklus von Schistosomen am Beispiel von *S. mansoni*

Das New England Journal of Medicine erlaubt generell die Verwendung von Inhalten für Dissertationen.

„Content (full-text or portions thereof) may be used in print and electronic versions of a dissertation or thesis without formal permission from the Massachusetts Medical Society (MMS), Publisher of the *New England Journal of Medicine*.“

Nachzulesen auf <https://www.nejm.org/about-nejm/permissions> unter dem Punkt: Reuse of Content Within a Thesis or Dissertation. (Stand 30.01.22)

11.2 Lizenzvertrag Abbildung 112: MAPK-Aktivierungskaskade

06.01.22, 18:24

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 06, 2022

This Agreement between Mr. Jakob Lichtenberger ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5223141118451

License date Jan 06, 2022

Licensed Content Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content Publication British Journal of Pharmacology

Licensed Content Title JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets

Licensed Content Author Salvatore Papa, Concetta Bubici

Licensed Content Date Dec 10, 2013

Licensed Content Volume 171

Licensed Content Issue 1

Licensed Content Pages 14

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

Format Print and electronic

Portion Figure/table

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/6

06.01.22, 18:24

RightsLink Printable License

Number of figures/tables 1

Will you be translating? Yes, without English rights

Number of languages 1

Title Mr.

Institution name Medical Clinic II Gastroenterology

Expected presentation date Oct 2022

Portions Figure 1

Specific Languages German

Requestor Location
Mr. Jakob Lichtenberger
Adolph-Kolping-Straße 1
Giessen, Hessen 35392
Germany
Attn: Mr. Jakob Lichtenberger

Publisher Tax ID EU826007151

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. (see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or

06.01.22, 18:24

RightsLink Printable License

+1-978-646-2777.

12 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Roderfeld M, Padem S, **Lichtenberger J**, Quack T, Weiskirchen R, Longerich T, Schramm G, Churin Y, Irungbam K, Tschuschner A, Windhorst A, Grevelding CG, Roeb E. Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. Hepatology. 2020 Aug;72(2):626-641. doi: 10.1002/hep.30192. Epub 2019 Feb 12. PMID: 30053321; PMCID: PMC7496692.

Weglage J, Wolters F, Hehr L, **Lichtenberger J**, Wulz C, Hempel F, Baier A, Quack T, Köhler K, Longerich T, Schramm G, Irungbam K, Mueller H, von Buelow V, Tschuschner A, Odenthal M, Drebber U, Arousy ME, Ramalho LNZ, Bankov K, Wild P, Pons-Kühnemann J, Tschammer J, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Schistosoma mansoni eggs induce Wnt/ β -catenin signaling and activate the protooncogene c-Jun in human and hamster colon. Sci Rep. 2020 Dec 23;10(1):22373. doi: 10.1038/s41598-020-79450-4. PMID: 33361772; PMCID: PMC7758332.

von Bülow V, **Lichtenberger J**, Grevelding CG, Falcone FH, Roeb E, Roderfeld M. Does *Schistosoma Mansoni* Facilitate Carcinogenesis? Cells. 2021 Aug 4;10(8):1982. doi: 10.3390/cells10081982. PMID: 34440754; PMCID: PMC8393187.

Publizierte Abstracts:

Lichtenberger J, Padem S, Quack T, Grevelding CG, Tschuschner A, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatozelluläre c-Jun Aktivierung durch *Schistosoma mansoni* Infektion im Hamster Modell und primären humanen Hepatozyten. GASL-Kongress, Heidelberg 02/2019 Zeitschrift für Gastroenterologie 2019; 57(01): 63 – 63 DOI: 10.1055/s-0038-1677214

Nicht-publizierte Abstracts:

Lichtenberger J, Padem S, Quack T, Grevelding CG, Tschuschner A, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatocellular c-Jun Activation via *S. mansoni* infection in a hamster model and primary human hepatocytes. FALK-Workshop, Heidelberg 02/2019

Vorträge:

Padem S, **Lichtenberger J**, Quack T, Grevelding CG, Tschuschner A, Roderfeld M, and Roeb E. "Hepatozellulärer Replikationsstress und DNA-Doppelstrangbrüche durch *Schistosoma mansoni* Infektion im Hamster-Modell." *Zeitschrift für Gastroenterologie* 56, no. 08 (August 2018): e308-e308. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1668936>. DGVS-Kongress, München 09/2018 Sprecher: **Lichtenberger J**

13 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Frau Univ. -Prof. Dr. med. Elke Roeb für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe bedanken. Ich habe Prof. Roeb als eine klinisch und fachlich extrem kompetente Leiterin der Arbeitsgruppe erlebt, die bei Anliegen stets schnell zu erreichen war und ohne die, die hier vorliegende Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen wäre.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld, der für mich immer den ersten Ansprechpartner darstellte. Durch seinen Enthusiasmus und Forschungsdrang motivierte er mich stets neue Ergebnisse zu produzieren und unerforschte Aspekte der Thematik zu untersuchen.

Weiterer Dank gilt Dr. Yury Churin mit dem ich viele Arbeitsmethoden und Ergebnisse diskutierte und so oft auf neue Ideen zur weiteren Forschung kam. Außerdem möchte ich mich bei Annette Tschuschner und Heike Müller für Einarbeitung in die Labormethoden und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken. Meinen Mitdoktoranden Christoph Imiela und Dr. Karuna Irungbam, will ich ebenfalls meinen Dank für gemeinsame Zeit im Labor aussprechen, durch die die Stimmung immer gut war und die Zeit nie langweilig wurde.

Zu guter Letzt will ich mich auch noch bei meiner Familie, meinen Freunden und Kommilitonen bedanken, die für mich immer ein offenes Ohr hatten und mir durch ihre emotionale Unterstützung viel Rückhalt und Willenskraft gaben.