

**Analyse der Beeinflussung der AP-1-Promotoraktivität und assoziierter  
Signalkaskaden durch *Schistosoma mansoni*-Eiantigene in humanen  
Enterozyten mittels Reporter-gen-Assays**

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

vorgelegt von Victoria Anna Luise Wirth  
aus Völklingen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin  
Schwerpunkt Gastroenterologie  
Medizinische Klinik II

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

Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 10.09.2024

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Erkrankung Schistosomiasis</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i> .....	2
1.1.2	Pathophysiologie und klinische Symptome der Schistosomiasis.....	3
1.1.3	Diagnostik und Therapie bei Schistosomiasis .....	5
<b>1.2</b>	<b>Bedeutung der durch <i>Schistosoma mansoni</i>-Eier abgesonderten Antigene..</b>	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Karzinogenese</b> .....	<b>6</b>
1.3.1	Das kolorektale Karzinom .....	6
1.3.1.1	Grundzüge der klinischen Symptome, Diagnostik und Therapie .....	6
1.3.1.2	Risikofaktoren und Prävention .....	7
1.3.1.3	Präkanzerose adenomatöse Polypen .....	8
1.3.1.4	Molekularbiologische Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese.....	8
1.3.2	Schistosomiasis und Karzinogenese .....	10
1.3.2.1	Potentielle Mechanismen der Neoplasieentstehung bei Schistosomiasis.....	11
1.3.2.2	<i>Schistosoma mansoni</i> und hepatozelluläre Karzinome .....	11
1.3.2.3	<i>Schistosoma mansoni</i> und kolorektale Karzinome.....	12
<b>1.4</b>	<b>Aktivierung von onkogenen Signalwegen in Kolonepithelzellen durch <i>S. mansoni</i></b> .....	<b>13</b>
1.4.1	Transkriptionsfaktor AP-1 .....	14
1.4.2	MAP-Kinase-Signalkaskaden .....	15
1.4.3	Potentiell involvierte Hormon- und Wachstumsrezeptoren sowie Kinasen .....	16
1.4.3.1	Insulin- und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor .....	17
1.4.3.2	PI3K/Akt-Signalweg .....	17
1.4.3.3	Androgenrezeptor .....	18
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>21</b>
2.1.1	Instrumente und Geräte.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	23

2.1.4 Puffer und Lösungen .....	24
2.1.5 Zelllinien .....	25
2.1.6 Medien und Zusatzstoffe .....	26
2.1.7 <i>Schistosoma mansoni</i> -Eier, SEA, IPSE und SEA-Fraktionen.....	26
2.1.8 Kommerzielle Kits.....	27
2.1.9 Inhibitoren/ Stimulanzen .....	27
2.1.10 Antikörper .....	28
2.1.11 Software .....	28
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Zellkultur mit SW620-Zellen.....	28
2.2.2 Transformation und Plasmidgewinnung .....	29
2.2.3 Reporter-gen-Assay.....	32
2.2.3.1 Transfektion der SW620-Zellen .....	36
2.2.3.2 Stimulation und Inhibition der SW620-Zellen .....	36
2.2.3.3 SEA-Konzentrationsreihen .....	37
2.2.3.4 Stimulation mit nIPSE und HEK-IPSE.....	38
2.2.3.5 Kokultur mit <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiern.....	38
2.2.3.6 SEA-Fraktionen .....	38
2.2.3.7 Durchführung des Assay.....	39
2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität.....	39
2.2.5 Western Blot Analyse.....	39
2.2.5.1 Gewinnung von Lysaten .....	40
2.2.5.2 Proteinseparation durch Gel-Elektrophorese .....	40
2.2.5.3 Proteintransfer auf eine Trägermatrix.....	41
2.2.5.4 Immunchemischer Nachweis der spezifischen Proteine .....	41
2.2.6 Statistische Auswertung.....	42
2.2.7 Abbildungen.....	43
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Einfluss der Transfektion, Stimulanzen und <i>S. mansoni</i>-Eier auf die Vitalität der SW620-Zellen .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Untersuchung der Auswirkung von <i>Schistosoma mansoni</i>-Eiantigenen auf die AP-1-Promotoraktivität in Kolonepithelzellen .....</b>	<b>45</b>

3.2.1	Konzentrationsabhängige Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA aus verschiedenen <i>S. mansoni</i> -Ei-Isolationen .....	46
3.2.2	Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiern .....	47
<b>3.3</b>	<b>Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit Bestandteilen von <i>Schistosoma mansoni</i>-Eiantigenen.....</b>	<b>49</b>
3.3.1	Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit IPSE.....	49
3.3.2	Molekülmassen-spezifische Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit fraktionierten <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigenen.....	50
<b>3.4</b>	<b>Wachstums- und Hormonrezeptoren beeinflussen die durch <i>Schistosoma mansoni</i>-Eiantigene induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen .....</b>	<b>55</b>
3.4.1	Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung des Insulinrezeptors/ Insulin-like growth factor 1-Rezeptors.....	57
3.4.2	Verminderte Induktion der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung des Androgenrezeptors.....	58
3.4.3	Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch kombinierte Inhibition des Insulin-/ IGF-1- und des Androgenrezeptors .....	59
<b>3.5</b>	<b>Kinasen beeinflussen die <i>Schistosoma mansoni</i>-Eiantigen-induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen.....</b>	<b>61</b>
3.5.1	PI3K/Akt-Signalweg: Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung der Akt 1/2/3-Kinase .....	61
3.5.2	MAP-Kinase-Signalkaskaden .....	62
3.5.2.1	Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung der MEK 1/2-Kinase.....	62
3.5.2.2	Synergistische Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch SEA und gleichzeitige Inhibition der p38 MAP-Kinase .....	64
<b>3.6</b>	<b>Glutathion vermindert die <i>Schistosoma mansoni</i>-Eiantigen-induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen.....</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Schistosoma mansoni</i> und kolorektale Karzinogenese .....</b>	<b>68</b>
4.1.1	Beeinflussung der AP-1-Promotoraktivität in Kolonepithelzellen durch <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigene .....	68

4.1.2 Funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Bestandteile der <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigene .....	70
4.1.2.1 Auswirkungen von IPSE auf den Transkriptionsfaktor AP-1 .....	70
4.1.2.2 Annäherung an weitere Eiantigene, die den Transkriptionsfaktor AP-1 funktionell aktivieren.....	71
4.1.3 <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigen-induzierte Signalwege im Kolonepithel .....	73
4.1.3.1 Wachstums- und Hormonrezeptoren beeinflussen die <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigen-induzierte AP-1-Aktivität in Enterozyten .....	73
4.1.3.2 Kinasen beeinflussen die <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigen-induzierte AP-1-Aktivität in Enterozyten.....	76
4.1.4 Hinweise auf <i>Schistosoma mansoni</i> -Eiantigen-induzierten oxidativen Stress im Kolonepithel .....	79
4.1.5 Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse für die potentielle Beziehung zwischen einer <i>Schistosoma mansoni</i> -Infektion und kolorektaler Karzinogenese .....	81
<b>4.2 Nutzen und Vorteile des Reportergen-Assays als Screening Tool .....</b>	<b>82</b>
<b>4.3 Mögliche Anwendung der Erkenntnisse und Ausblick auf zukünftige Forschung.....</b>	<b>83</b>
<b>4.4 Limitation dieser Arbeit.....</b>	<b>84</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>6 Summary.....</b>	<b>86</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>10 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>11 Anhang.....</b>	<b>106</b>
<b>12 Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>13 Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>112</b>
<b>14 Danksagung.....</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

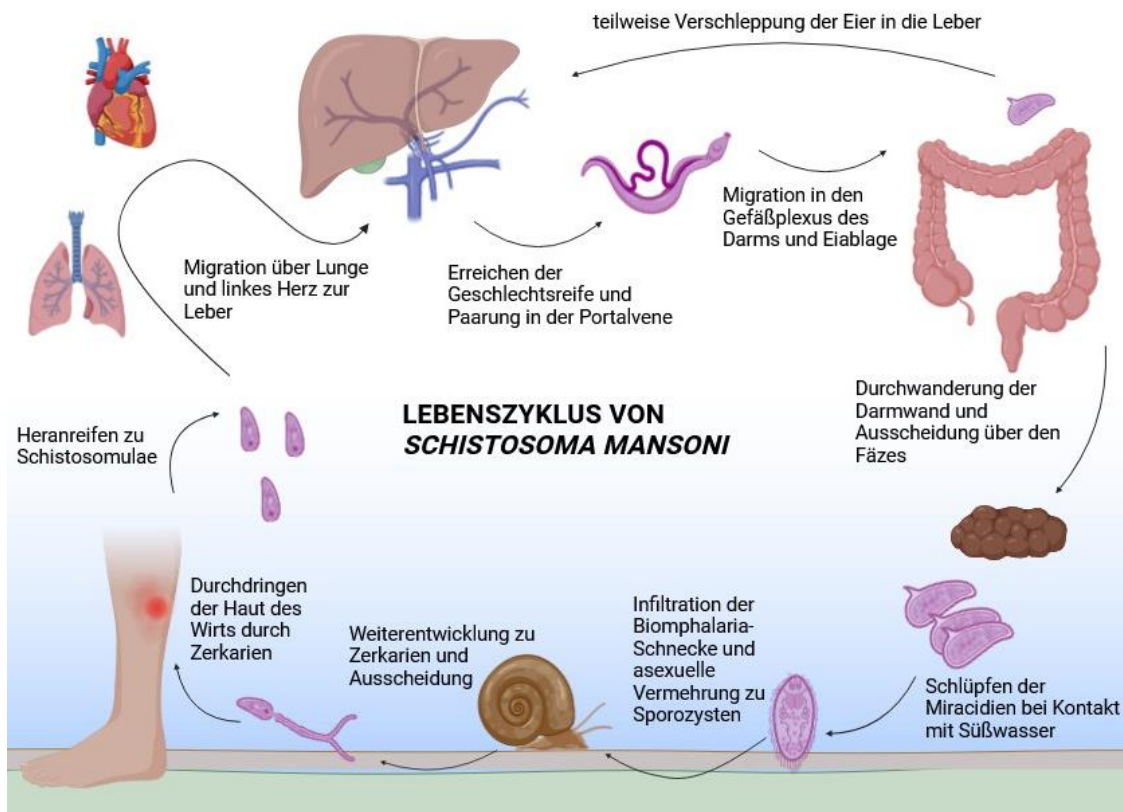
Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) listet aktuell 21 sogenannte vernachlässigte Tropenkrankheiten (neglected tropical diseases, NTDs).<sup>1</sup> Weltweit leiden schätzungsweise nahezu zwei Milliarden Menschen an einer oder mehreren dieser Krankheiten oder leben mit dem Risiko einer Infektion. Besonders betroffen sind Regionen in Afrika, Asien und Südamerika mit unzureichendem Zugang zu sanitären Anlagen, sauberem Trinkwasser und mit mangelnder Gesundheitsfürsorge.<sup>2</sup> Die NTDs führen direkt oder indirekt zu geschätzt mehr als 500 000 Todesfällen jährlich.<sup>3</sup> Gleichzeitig wird der wirtschaftliche Schaden für die betroffenen Regionen auf mehrere Milliarden Dollar pro Jahr geschätzt.<sup>1,4</sup> Fünf dieser NTDs machen gemeinsam bereits über eine Milliarde Betroffene aus.<sup>5</sup> Es handelt sich um die Onchozerkose (zirka 37 Millionen Erkrankte), das Trachom (zirka 84 Millionen Erkrankte), die Lymphatische Filariose (zirka 120 Millionen Erkrankte), Parasitosen durch Geohelminthen (je nach Erreger jeweils zwischen 576 und 807 Millionen Erkrankte) und die Schistosomiasis.<sup>2,5</sup>

## 1.1 Die Erkrankung Schistosomiasis

Die Schistosomiasis wird auch Bilharziose genannt und ist nach der Malaria die zweithäufigste parasitäre Erkrankung weltweit. Die WHO schätzt die Zahl der Erkrankten auf zirka 240 Millionen Menschen und die assoziierten Todesfälle auf ungefähr 200 000 jährlich.<sup>3,4,6</sup> Die Endemiegebiete erstrecken sich vor allem auf die Tropen und Subtropen. Dort leben nahezu 780 Millionen Menschen in der ständigen Gefahr sich mit Schistosomen zu infizieren.<sup>4,6,7</sup> Studien zeigen, dass fast jeder dauerhaft in einer solchen Region lebende Mensch zu irgendeinem Zeitpunkt an Schistosomiasis erkrankt.<sup>8</sup> Durch Globalisierung, Migration und Tourismus verbreitet sich die Erkrankung auch in gemäßigten Breitengraden wie Europa.<sup>9,10</sup> Der Klimawandel mit veränderten Temperaturprofilen und Niederschlägen könnte die Lebensbedingungen und Überwinterungschancen für den Parasiten in Europa verbessern. In Korsika kam es bereits vor mehr als zehn Jahren zu einem Ausbruch der Schistosomiasis.<sup>9,10</sup> Es gibt fünf verschiedene humanpathogene Unterarten. *Schistosoma haematobium* löst die urogenitale Variante der Erkrankung aus. Infektionen mit *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. japonicum* und *S. mansoni* hingegen führen zu einer intestinalen Schistosomiasis.<sup>11,12</sup>

### 1.1.1 Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*

Als Schistosomiasis bezeichnet man eine Infektion mit Trematoden (Saugwürmern) des Genus *Schistosoma*. Die Zerkarien, eine larvale Form der *Schistosoma mansoni*, finden sich in kontaminiertem Süßwasser.<sup>13</sup> Wie in Abbildung 1 dargestellt, infizieren die Zerkarien den Endwirt, beispielsweise den Menschen, indem sie dessen Haut penetrieren. Innerhalb des Wirtes bahnen sich die Zerkarien ihren Weg über das Lymphgefäßsystem und Venolen zum Blutgefäßsystem. Dort reifen sie zu Schistosomulae. Dem Blutfluss folgend migrieren die Schistosomulae über Lunge und Herz in die Leber. In der Portalvene ihres Wirtes erlangen sie innerhalb von 4 bis 6 Wochen ihre Geschlechtsreife.<sup>13</sup> Die nun Schistosomen genannten Saugwürmer sind etwa 7 bis 20 mm lang.<sup>14</sup> Adulte Schistosomen leben durchschnittlich drei bis zehn Jahre.<sup>8</sup> Es wurde von Ausnahmefällen berichtet, in denen die Parasiten mehr als 30 Jahre überlebten.<sup>15</sup> Im Gegensatz zu anderen Trematoden erfolgt die Vermehrung der Schistosomen im Wirt sexuell. Nach der Paarung migrieren die Parasiten in den Gefäßplexus des Darms. Hier beginnt das Schistosomenweibchen mit der Ablage von bis zu 300 Eiern pro Tag.<sup>11</sup> Diese sind dazu bestimmt, die Darmwand zu durchwandern und mit dem Fäzes ausgeschieden zu werden. Ein Teil der Eier bleibt allerdings auf dieser Passage in der Darmwand fixiert oder wird zuvor hämatogen in die Leber gespült. Hier bleiben diese Eier in den Sinusoiden der Leber stecken. Aus den erfolgreich über den Fäzes ausgeschiedenen Eiern schlüpfen bei Kontakt mit Süßwasser die ersten larvalen Form der Trematoden, die Miracidien. Im Süßwasser infiltrieren die Miracidien die Biomphalaria-Schnecke. Innerhalb dieses Zwischenwirts erfolgt die asexuelle Vermehrung der Miracidien zu multizellulären Sporozysten. Nach etwa vier bis sechs Wochen entwickeln sie sich zu Zerkarien weiter.<sup>13</sup> Jede infizierte Schnecke scheidet täglich mehrere Tausend Zerkarien aus.<sup>8</sup> Diese können dann etwa 72 Stunden im Süßwasser überleben und potentiell einen Wirt infizieren, wodurch der Infektionszyklus von Neuem beginnt.<sup>14,16</sup>



**Abbildung 1: Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*** (zusammengestellt nach Gryseels, Polman *et al.* 2006; Ross, Bartley *et al.* 2002; Schwartz, Fallon 2018; erstellt mit BioRender)

### 1.1.2 Pathophysiologie und klinische Symptome der Schistosomiasis

Das Immunsystem eines infizierten Menschen ist nicht in der Lage, eine Schistosomeninfektion vollständig zu eliminieren. Vielmehr stellt sich eine Balance ein, die sowohl den Wirt als auch den Parasiten am Leben erhält.<sup>3,17</sup> Im Verlauf unterscheidet man die akute Form der Schistosomiasis von der subakuten und der chronischen. Dabei variiert die Immunreaktion des Wirts in Zusammenhang mit den verschiedenen Entwicklungsstufen des Parasiten.<sup>10</sup>

Bei der spezifischen Immunreaktion spielen einwandernde T- und B-Zellen eine wichtige Rolle. Man unterscheidet in Bezug auf die T-Helferzellen (Th-Zellen) zwei Typen der Immunreaktion. Innerhalb der ersten fünf Wochen kommt es zunächst zu einer Typ 1-dominanten Immunreaktion.<sup>11</sup> Die Th1-Zellen induzieren durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , eine akute Entzündungsreaktion. Mit Beginn der Eiablage kommt es nach fünf bis sechs Wochen zu einer Verschiebung der adaptiven Immunantwort und zu einem Wechsel zu einer Typ 2-Reaktion.<sup>3</sup> In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass ein solcher Wechsel nur bei Tieren vorkam, die mit beiden Schistosomengeschlechtern infiziert worden waren. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Schistosomeneier für die Th2-Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen.<sup>18</sup> Die

Schistomeneier selbst sind bioaktiv. Sie interagieren durch die Absonderung von Antigenen proaktiv mit dem Gewebe des Wirts.<sup>19</sup> Die durch die Eier modifizierte Immunantwort wirkt dabei sowohl einer Gewebsnekrose als auch einem Abtöten der Eier entgegen. So können die Eier bis zu drei Monate im Gewebe überleben.<sup>20</sup> Die lokale Inflammation und Th2-Aktivierung erleichtern zusätzlich die Passage der Eier durch die Darmwand.<sup>7,13</sup> Hierzu konkludent scheiden T-Zell-defiziente Mäuse und immunsupprimierte Menschen deutlich weniger Eier aus.<sup>13</sup> Der Wechsel von einer Typ 1- auf eine Typ 2-Immunantwort ist entscheidend für die spätere Chronifizierung der Erkrankung.<sup>3</sup> Die Th2-Immunantwort konzentriert sich eher auf die humorale Abwehr. Die während der Th2-Antwort abgesonderten Interleukine sind essentiell für die granulomatöse Immunreaktion.<sup>21</sup> Durch die vermehrte Einwanderung von Granulozyten kommt es in der Leber und im Darm zur Bildung von Granulomen. Der Wirt profitiert davon, da somit das umliegende Gewebe von toxischen parasitären bzw. Ei-Antigenen abgeschirmt wird.<sup>11,22</sup> Im zeitlichen Verlauf der Infektion verringert sich die Anzahl der Th2-Zellen und eine Immunsuppression entsteht. Es kommt zur vermehrten Einwanderung von Fibroblasten. Die Granulome schrumpfen und kalzifizieren.<sup>3</sup>

Bei der Infektion des Menschen tritt, nach dem Eindringen der Zerkarien durch die Haut, häufig eine Dermatitis mit Pruritus auf.<sup>3</sup> Die akute Form, auch Katayama-Syndrom genannt, tritt meist zwei bis zwölf Wochen nach der Infektion auf.<sup>8</sup> Das Katayama-Syndrom betrifft vor allem erstmalig infizierte Menschen.<sup>21</sup> Die Symptome können unter anderem trockenen Husten, teils hohes Fieber, Arthralgien, Ödeme und Fatigue umfassen. Größtenteils kommt es zu einer spontanen Heilung der Betroffenen.<sup>8</sup> Die Ablagerungen von Antigen-Antikörper-Komplexen können jedoch in einer Hepatosplenomegalie oder einer Glomerulonephritis resultieren.<sup>23</sup>

Bei häufiger Reinfektion oder einer chronischen Infektion mit Schistosomen kann es wie beschrieben zu einer Chronifizierung der Erkrankung kommen.<sup>21</sup> Zunächst entstehen durch die Fixierung der Eier im Gewebe im Rahmen der Schistosomiasis subakute entzündliche Läsionen in der Leber und im Kolon.<sup>3</sup> Im Darm verursachen die auf ihrer Passage durch die Darmwand stecken gebliebenen Eier Ulzerationen, Mikroabszesse und Mukosahyperplasien.<sup>7</sup> Wie zuvor erläutert, begünstigt hierbei die Immunreaktion des Wirtes die Granulombildung im jeweils betroffenen Gewebe.<sup>21</sup> Bei der chronischen Schistosomiasis des Kolons können sich Pseudopolypen und eine Polyposis ausbilden.<sup>22,24</sup> Symptomatisch wird die ausgelöste Kolitis durch abdominelle Krämpfe, Diarrhoe und blutige Stühle.<sup>4</sup> In gravierenden Fällen kann es zu Stenosen des Kolons oder des Rektums kommen.<sup>7</sup> Die hepatische Form kann zu einem fibrotischen Umbau des Leberparenchyms führen. Es können eine portale Hypertension, Aszites, eine Hepatosplenomegalie und portokavale Kollateralkreisläufe

mit teils ausgeprägten Ösophagusvarizen entstehen.<sup>4,25</sup> Bei einer *S. haematobium*-Infektion und einer resultierenden urogenitalen Schistosomiasis werden die Schistosomeneier über das Harnwegsystem ausgeschieden. Eine solche Infektion kann zu fibrotisch bedingter Blasen- und Harnleiterobstruktion, genitalen Ulzera, Infertilität und Nierenversagen führen.<sup>7</sup> Alle Arten der Schistosomiasis führen derweil zu systemischer Morbidität. Auf Grund der chronischen Entzündung entstehen so Anämien, eine Malnutrition und eine verzögerte kindliche Entwicklung.<sup>26–28</sup>

### 1.1.3 Diagnostik und Therapie bei Schistosomiasis

Schistosomiasis wird über die Detektion von Eiern im Stuhl oder im Urin diagnostiziert. Alternativ können in Blut- oder Urinproben Antikörper oder Antigene bestimmt werden.<sup>4</sup> Die chronische Form der Schistosomiasis wird für drei Tage mit 40 bis 60 mg des Antihelminthikums Praziquantel pro Kilogramm Körpergewicht behandelt. Diese Behandlung zielt vor allem auf die erwachsenen Schistosomen und nicht auf die heranreifenden Parasiten ab.<sup>8</sup> Daher ist sie bei der akuten Form unzureichend wirksam. Insgesamt ist Praziquantel mit einer bis zu 80-prozentigen Heilungsrate das Mittel der Wahl bei allen Unterarten der Schistosomiasis.<sup>3</sup> Nebenwirkungen sind beispielsweise abdominelle oder kraniale Schmerzen sowie Schwindel.<sup>8</sup> Auf Grund mangelnder gleichwertiger Alternativen zu Praziquantel wird vor einer möglichen Resistenzentwicklung gewarnt. Dringend werden in diesem Bereich therapeutische Innovationen oder Impfungen gegen die Schistosomiasis benötigt.<sup>21</sup>

## 1.2 Bedeutung der durch *Schistosoma mansoni*-Eier abgesonderten Antigene

Die *S. mansoni*-Eier sind bioaktiv und sondern ein komplexes Gemisch von Faktoren ab.<sup>24</sup> Bei SEA (soluble egg antigens) handelt es sich um einen Extrakt aus homogenisierten Schistosomeneiern.<sup>29</sup> Insgesamt besteht SEA aus mindestens 30 Glykoproteinen. Welchen Vorteil und Nutzen diese für den Parasiten und welche schädlichen Auswirkungen sie auf den Wirt haben, ist Gegenstand derzeitiger Forschung.<sup>30</sup> Die Molekülmasse dieser Faktoren liegt zwischen 10 und über 200 kDa.<sup>30</sup> Unter der Molekülmasse versteht man die Summe der atomaren Massen aller Atome in einem Molekül. Angegeben wird sie in Dalton (Da). Anhand der Molekülmasse lassen sich beispielsweise Biomoleküle voneinander unterscheiden und analysieren.<sup>31</sup> So wurden bei der Schistosomiasis unter anderem Substanzen mit der Molekülmasse von 25, 29 oder 150 bis 166 kDa identifiziert, die in der Lage sind, spezifische T-Zellen anzuregen.<sup>30</sup> Die drei bisher am besten erforschten *S. mansoni*-Eiantigene, die eine Immunreaktion des Wirts auslösen, sind omega-1, kappa-5 und IPSE/ alpha-1.<sup>32</sup>

Alpha-1 liegt als Homodimer mit einer molekularen Masse von etwa 33 bis 35 kDa vor.<sup>33</sup> Alpha-1 sorgt für eine Aktivierung von basophilen Granulozyten, die daraufhin IL-4 und IL-13 absondern. IL-4 wiederum ist ein wichtiges Signal für die Induktion einer Th2-Antwort. Auf Grund dieses Mechanismus erhielt alpha-1 auch den Namen „IL-4-induzierender Faktor aus *S. mansoni*-Eiern“ (IL-4-inducing principle from *S. mansoni* eggs), kurz IPSE.<sup>34</sup> Eine weitere Eigenschaft von IPSE ist, dass es in der Lage ist, die Proliferation von Endothelzellen und die Angiogenese zu stimulieren.<sup>35</sup> Außerdem verfügt es über eine Nukleus-Lokalisationssequenz. In den Nuklei der Wirtszellen wirkt IPSE auf die Transkription ein und beeinflusst so die zelluläre Aktivität.<sup>35,36</sup>

Die Molekülmasse von kappa-5 liegt in etwa bei 50 kDa.<sup>37</sup> Es konnte gezeigt werden, dass kappa-5 ein Ziel von humanen IgG- und IgE-Antikörpern ist. Auf Grund der Mengen an produziertem kappa-5 und der immunogenen Eigenschaften wird angenommen, dass kappa-5 eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Parasiten mit dem Wirt spielt. Dennoch ist die genaue biologische Funktion von kappa-5 bisher noch nicht bekannt.<sup>38</sup>

Das dritte Glykoprotein, omega-1, ist ein Monomer mit einer molekularen Masse von zirka 31 kDa. Omega-1 ist spezifisch für eine *S. mansoni*-Infektion.<sup>29</sup> Es hat hepatotoxische Eigenschaften. Es wird vermutet, dass es sich bei omega-1 um eine zytotoxische RNase handelt. Diskutiert wird, dass RNAsen vor einer Apoptose schützen oder diese induzieren können.<sup>39</sup> Auch wird debattiert, ob omega-1 die zellulär bedingte Immunreaktion des Wirtes beeinflusst und so eine Rolle in der immunvermittelten Exkretion der Schistosomeneier spielt.<sup>39</sup>

### **1.3 Karzinogenese**

Karzinome sind durch das unkontrollierte Wachstum von abnormen Zellen charakterisiert, die auch das umliegende Gewebe infiltrieren.<sup>12</sup> 2020 starben laut Schätzungen der WHO 10 Millionen Menschen weltweit in Zusammenhang mit einer Krebserkrankung. 19,2 Millionen Menschen erhielten eine Karzinomdiagnose.<sup>40</sup>

#### **1.3.1 Das kolorektale Karzinom**

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist das dritthäufigste diagnostizierte Karzinom. Mit zirka 700 000 Toten pro Jahr ist es außerdem die zweithäufigste karzinomassoziierte Todesursache weltweit.<sup>41,42</sup>

##### **1.3.1.1 Grundzüge der klinischen Symptome, Diagnostik und Therapie**

Das KRK zeigt häufig nur ein langsames Wachstum. Daher existieren zumeist nur unspezifische oder gar keine Frühsymptome. In Frage kommen Veränderungen des

Stuhlgangs, abdominelle Schmerzen oder eine für maligne Geschehen häufige B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust).<sup>43</sup> Zur Diagnostik sollte neben der obligatorischen digital-rektalen Untersuchung eine Koloskopie des gesamten Kolons inklusive Biopsieentnahme erfolgen. Zur Abklärung etwaiger Metastasen in Leber oder Lunge sollten sich eine Abdomensonographie, eine thorakale Röntgenaufnahme und gegebenenfalls computertomographische Untersuchungen des Körperstamms anschließen. Danach erfolgt die Einstufung des Tumors in verschiedene Stadien. Auch molekularbiologische Untersuchungen und die Bestimmung von Tumormarkern zur Verlaufskontrolle werden empfohlen. Anhand dieser Stadien und Charakterisierungen wird in einer interdisziplinären Tumorkonferenz ein Therapiekonzept entworfen.<sup>44</sup> Sehr vereinfacht gesagt besteht das therapeutische Ziel darin, den Tumor und gegebenenfalls betroffene umliegende Strukturen operativ komplett zu reseziieren. Ferner erfolgt eine systematische Lymphadenektomie. Ist die Neoplasie im Kolon lokalisiert, so kann je nach Stadium zusätzlich begleitend eine chemotherapeutische Therapie erwogen werden. Bei rektaler Lage kommen eine neoadjuvante Radiochemotherapie oder Radiatio in Frage. Höhere Stadien sind prognostisch tendenziell ungünstig und erfordern individuelle und/ oder palliative Behandlungskonzepte.<sup>44</sup>

### **1.3.1.2 Risikofaktoren und Prävention**

Die Entstehung von kolorektalen Karzinomen wird sowohl durch hereditäre als auch durch exogene Faktoren bedingt.<sup>45</sup> Etwa 20 bis 30 Prozent haben eine erbliche Komponente, wie beispielsweise das Hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) oder die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP).<sup>42</sup> Die übrigen 70 bis 80 Prozent der KRK treten sporadisch auf.<sup>42</sup> Nicht-hereditäre Risikofaktoren sind Ernährungs- und Lebensstilgewohnheiten. Beispiele hierfür sind Rauchen, Alkoholkonsum, ballaststoffarme Nahrung und Adipositas.<sup>44</sup> Auf eine entzündliche Ätiologie entfallen ferner etwa ein bis zwei Prozent.<sup>42</sup> Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), wie die Colitis ulcerosa oder der Morbus Crohn, können hierbei in der Entstehung eines KRK resultieren.<sup>42,44</sup> Durch persönliche prädisponierende Faktoren oder eine positive Familienanamnese lässt sich das individuelle Lebenszeitrisiko für eine KRK-Entwicklung einschätzen.<sup>46</sup> Zur Prävention werden in Deutschland aktuell für Personen ohne ein erhöhtes Risiko ab dem 50. Lebensjahr Vorsorgeuntersuchungen empfohlen.<sup>44</sup> Im Rahmen einer Koloskopie werden etwaig vorhandene Kolonpolypen abgetragen.<sup>44</sup> Durch die komplette Entfernung wird das von manchen Kolonpolypen ausgehende Malignomrisiko eliminiert.<sup>47</sup>

### **1.3.1.3 Präkanzerose adenomatöse Polypen**

Bei adenomatösen Kolonpolypen handelt es sich um Ansammlungen von epithelialen Zellen. Die Polypen bilden sich in der Mukosa, einer der Schichten der Darmwand, und protrudieren ins Darmlumen.<sup>43</sup> Potentiell können solche Kolonpolypen im fortgeschrittenen Stadium in fokalen Schleimhautatypien resultieren. Sie sind somit Prädilektionsstellen für die Entstehung eines KRK.<sup>48,49</sup> Etwa 90 Prozent der kolorektalen Karzinome entstehen aus Adenomen.<sup>44</sup> Man unterscheidet klassische (85-90%) von serratierten (10-15%) Adenomen. Die serratierten Adenomen sind eine Gruppe aus verschiedenen Subtypen mit unterschiedlichem Entartungsrisiko.<sup>46</sup> Histologisch sind die klassischen Adenome häufig tubulär mit kleinen, rundlichen, atypischen Drüsen strukturiert. Wenn sie sich entwickeln, entsteht oftmals stellenweise eine längliche, villös genannte Struktur.<sup>43</sup> Während des Wachstums der Adenome häufen sich dabei genetische Mutationen und epigenetische Veränderungen. Je villöser, größer und zahlreicher die klassischen Adenome sind, desto höher ist daher das Malignitätsrisiko.<sup>46</sup> Bei einer Entartung kann es schließlich dazu kommen, dass die Polypen in benachbarte Wandschichten des Kolons oder des Rektums ein- oder sogar über das jeweilige Organ hinauswachsen. Maligne Zellen können durch einen Anschluss an das Lymph- oder Blutgefäßsystem in andere Organe gelangen.<sup>43</sup> Bei den CED können auf Grund der Schäden im entzündeten Gewebe sogenannte Pseudopolypen entstehen. Dabei handelt es sich nicht um eigentliche Tumore und das karzinogene Risiko liegt unter dem der adenomatösen Kolonpolypen. Jedoch steigt das Entartungsrisiko bei CED im Kolon, vor allem bei einer Colitis ulcerosa, mit der Dauer und der Schwere der Kolitis.<sup>46</sup>

### **1.3.1.4 Molekularbiologische Mechanismen der kolorektalen Karzinogenese**

Laut einem Modell zur „Adenom-Karzinom-Sequenz“ von Fearon und Vogelstein sind DNA-Schäden und genetische Instabilität wichtige Komponenten der kolorektalen Karzinogenese.<sup>45</sup>

#### **DNA-Schäden**

DNA-Schäden sind ein häufiges Ereignis im Lebenszyklus einer Zelle.<sup>50</sup> Als DNA-Schäden werden physikalisch oder chemisch verursachte Veränderungen der DNA in Zellen bezeichnet. Die DNA kann durch viele verschiedene endogene und exogene Reize, wie Strahlung, Chemikalien oder freie Radikale, geschädigt werden.<sup>51</sup> Über eine Vielzahl von Signalwegen werden die betroffenen DNA-Abschnitte identifiziert und der Schaden behoben oder die Replikation gestoppt. Alternativ wird ein programmierter Zelltod eingeleitet.<sup>50</sup> Beispiele für DNA-Reparatursysteme sind die Mismatch-Reparatur für nicht zueinander passende Basenpaare, die Nukleotid-Exzisionsreparatur, ein

System für die Reparatur von transkriptionsassoziierten Schäden oder die Basenexzisionsreparatur für modifizierte Basen.<sup>52</sup> Sind diese Mechanismen nicht erfolgreich, können DNA-Schäden zu Mutationen, Karzinomen oder dem Absterben der Zelle beziehungsweise des Organismus führen.<sup>50</sup>

### **Genetische Instabilität**

Die Mechanismen für genetische Instabilität sind Mikrosatelliten- und chromosomale Instabilität<sup>42</sup> sowie eine veränderte Methylierung der Genpromotorregionen. Letztere verhindert die Transkription der betroffenen Gene, welche somit funktionell deaktiviert werden. Mitunter werden so Tumorsuppressorgene deaktiviert, die ihrerseits für die Überwachung wachstumsfördernder Gene zuständig sind.<sup>43,53</sup> Auch können Gene, die die DNA-Mismatch-Reparatur bedingen, inaktiviert werden.<sup>46</sup> Ein Defekt des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems ist unter anderem entscheidend für die in beiden Adenomarten vorkommende Mikrosatelliten-Instabilität.<sup>43</sup> Kurze, repetitive DNA-Sequenzen im nicht-codierenden Bereich des Genoms nennt man Mikrosatelliten. Bei der Mikrosatelliten-Instabilität kommt es in diesen Regionen zu einer unregelmäßigen Replikation.<sup>43</sup> Dadurch werden Tumorsuppressoren, deren Gene solche Regionen enthalten, inaktiviert.<sup>46</sup> Schließlich erhöht dies die Vulnerabilität für weitere genetische Mutationen.<sup>43</sup> Die chromosomale Instabilität ist mit zirka 84 Prozent noch häufiger. Sie ist charakterisiert durch Veränderungen in der Anzahl und Struktur der Chromosomen. Es kann eine Kaskade an Mutationen angestoßen werden, die typischerweise den klassischen Adenomen zu Grunde liegt. Häufig wird dadurch die Aktivierung der WNT- (Zusammensetzung aus Wg für Wingless und Int-1), MAPK- (Mitogen aktivierte Proteinkinase) und PI3K- (Phosphatidylinositol 3-Kinase) Signalwege verändert.<sup>42</sup> Zunächst kommt es zu einer sporadischen oder vererbten Mutation oder dem Verlust des APC-Tumorsuppressorgens. Daraus resultieren Veränderungen der Chromosomentrennung während der Zellteilung.<sup>43,54</sup> Unter physiologischen Umständen reguliert APC außerdem über den Abbau von  $\beta$ -Catenin den WNT-Signalweg. Eine Akkumulation von  $\beta$ -Catenin durch eine APC-Mutation kann so zu einer Dysregulation der zellulären Differenzierung und Proliferation führen.<sup>42</sup> Nachfolgend treten Mutationen des Onkogens KRAS auf.<sup>43,54</sup> Die serratierten Adenome entwickeln sich unterdessen häufig aus einer Mutation des BRAF-Gens.<sup>43</sup> Ras und Raf aktivieren die MAPK-Signalwege, Ras ferner auch den PI3K-Signalweg.<sup>55</sup> Durch Mutationen kann es zu einer dauerhaften Aktivierung der Signalwege mit verändertem Wachstums-, Überlebens- und Differenzierungsverhalten der Kolonzellen kommen.<sup>55</sup> Schließlich kann es in der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ zum Verlust der Funktion des p53-Genes kommen. p53 reguliert beispielsweise die Apoptose der Darmzellen. Es wirkt somit als wichtiges tumorsuppressives Stellglied potentiell onkogenen Prozessen entgegen.<sup>43,54</sup>

## **Inflammation und oxidativer Stress**

Obwohl es sich bei den polypösen Veränderungen im Darm von CED-Patienten um Pseudopolypen handelt, verlaufen viele der onkogenen Mechanismen im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen identisch.<sup>46</sup> Aktivierte Entzündungszellen sondern genotoxische Mediatoren ab. Es handelt sich beispielsweise um reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale oder proinflammatorische Zytokine.<sup>46</sup> Unter reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) fasst man eine Gruppe von sauerstoffenthaltenden Molekülen zusammen, die hochreaktiv und sehr kurzlebig sind.<sup>52</sup> In den Mitochondrien wird Sauerstoff für die Energiegewinnung verwertet. Auch hier entstehen ROS.<sup>52</sup> Diese werden unter physiologischen Bedingungen anschließend wieder umgesetzt. Für gewisse Prozesse, wie die Abwehr von Mikroorganismen oder zur Kontrolle von Signaltransduktionen, benötigt der Körper ROS.<sup>56</sup> Häufen sie sich jedoch an, so bezeichnet man dies als oxidativen Stress.<sup>57</sup> Ein Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress sind Antioxidantien. Diese können endogen produziert oder exogen über die Nahrung aufgenommen werden. Ein endogenes, nicht-enzymatisches Antioxidans ist z.B. reduziertes Glutathion (GSH). GSH kann ROS abfangen und in eine weniger reaktive Form umwandeln.<sup>58</sup> Greifen die antioxidativen Mechanismen nicht, sind die reaktiven Sauerstoffspezies in der Lage, DNA-Schäden zu verursachen und Reparaturmechanismen zu beeinflussen.<sup>52</sup> Es kann zu Veränderungen karzinomassoziiierter Faktoren kommen. Häufig hiervon betroffen sind z.B. der Tumorsuppressor p53, DNA-Basenexzisions-Reparaturproteine oder Transkriptionsfaktoren wie AP-1. Auch eine Aktivierung des Ras-Signalweges wird diskutiert.<sup>46</sup>

### **1.3.2 Schistosomiasis und Karzinogenese**

Eine Vielzahl von auf den menschlichen Organismus einwirkenden Einflüssen gilt als karzinogen. Die Entstehung von schätzungsweise jedem fünften Karzinom wird mit einer Infektion mit verschiedenen Viren, Bakterien oder Parasiten in Verbindung gebracht.<sup>12,59</sup> In weniger entwickelten Ländern sind die Prävalenzen solcher onkogener Infektionen höher und infektionsbedingte Malignome daher besonders häufig.<sup>59</sup> Die Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) stuft eine Infektion mit *S. haematobium* als definitiv karzinogen für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Harnblase ein.<sup>7,60</sup> Die Beweislage bezüglich der karzinogenen Gefährdung bei einer Infektion mit *S. mansoni* ist laut Einstufung der IARC momentan noch unzureichend.<sup>19,60</sup> Dennoch werden mögliche prädisponierende oder unterstützende Zusammenhänge einer chronischen *S.*

*mansoni*-Infektion mit der Entstehung von hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen vielfach diskutiert.<sup>12,19</sup>

### **1.3.2.1 Potentielle Mechanismen der Neoplasieentstehung bei Schistosomiasis**

Für die definitiv karzinogen wirkende *S. haematobium*-Infektion wurden diverse molekularbiologische Veränderungen beschrieben. Auf dieser Grundlage werden mehrere Mechanismen für die Entstehung von Neoplasien bei Schistosomiasis diskutiert.<sup>12</sup> Bei der chronischen Inflammation um die im Kapillarsystem fixierten Eier der Schistosomen werden Entzündungszellen aktiviert. Dadurch werden genotoxische Mediatoren abgesondert. Es entsteht oxidativer Stress. Daraus kann eine genomische Instabilität resultieren. Auch kann es zu einer Dysregulation verschiedener in der Karzinogenese involvierter Signalwege und Onkogene kommen.<sup>61,62</sup> Studien beschreiben Veränderungen des Onkogens KRAS und der Expression des Apoptoseregulators Bcl-2 sowie des Tumorsuppressors p53.<sup>63,64</sup> Zusätzlich wird während der Entwicklung der Parasiten ständig das Epithelgewebe beschädigt und eine Wundheilung induziert.<sup>12,65</sup> Potentiell kommt es in den Zellen der betroffenen Regionen aus diesen Gründen vermehrt zu DNA-Schäden. Gleichzeitig sind die Reparaturmechanismen unzureichend. Dies begünstigt die Transformation und Proliferation der Zellen.<sup>66</sup> Die beschriebene parasitär hervorgerufene Immunsuppression verhindert die immunsystemvermittelte Überwachung und Apoptose solcher suspekter Zellen.<sup>67</sup> Durch all diese Mechanismen ändern sich das Wachstum, Überleben und die Proliferation der Zellen. Diese Veränderungen können schließlich die Entstehung von Malignomen begünstigen.<sup>12,68</sup>

### **1.3.2.2 *Schistosoma mansoni* und hepatozelluläre Karzinome**

Das hepatozelluläre Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) stellt die dritthäufigste karzinomassoziierte Todesursache weltweit dar.<sup>69</sup> Es resultiert aus chronischen Lebererkrankungen verschiedener Ätiologien.<sup>70</sup> Eine Infektion mit *S. mansoni* alleine induziert nach aktuellem Wissensstand vermutlich keine hepatozelluläre Karzinogenese.<sup>71,72</sup> Jedoch wurde ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *S. mansoni*, den Hepatitis B- und C-Viren sowie der Inzidenz eines HCC beschrieben. Dabei könnte die reduzierte Immunantwort bei einer Schistosomiasis eine Infektion mit den Hepatitis-Viren erleichtern und die Krankheitsdauer verlängern. Diese prolongierte Infektionszeit könnte dann wiederum die Entstehung eines HCC begünstigen.<sup>12</sup> Insgesamt deuten verschiedene Studien darauf hin, dass *S. mansoni*, unter der zusätzlichen Einwirkung weiterer Risikofaktoren, Dysplasien und das Fortschreiten eines HCC vorantreibt.<sup>19,71</sup>

Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) fördern das Auftreten und die Entwicklung von Dysplasien während der Entstehung eines HCC.<sup>71</sup> So wird die Zellproliferation begünstigt, die Apoptose verhindert und die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen erschwert.<sup>73</sup> In chronisch oder akut von Schistosomiasis betroffenen Hepatozyten konnten Roderfeld *et al.* die dauerhafte Aktivierung von c-Jun und STAT3 zeigen.<sup>73</sup> Außerdem konnte demonstriert werden, dass *S. mansoni*-SEA unter Beteiligung von JNK/c-Jun die Zellproliferation in Hepatozyten induziert.<sup>74,75</sup> In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Roeb (Schwerpunkt Gastroenterologie der JLU Gießen) konnte gezeigt werden, dass die Schistosomeneier den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel von Hepatozyten umprogrammieren. Dies führte zu einer Erschöpfung der Nährstoffspeicher des Leberparenchyms und einem Ungleichgewicht des Redox-Systems. Letzteres kann wie beschrieben oxidativen Stress zur Folge haben.<sup>76</sup> Auch die Aktivierung des Immunsystems kann bei einer Schistosomiasis zu oxidativem Stress führen.<sup>77,78</sup> Zu diesem Redox-Ungleichgewicht konkludente Ergebnisse fanden de Oliveira *et al.* in einer Studie mit *S. mansoni*-infizierten Mäusen.<sup>79</sup> In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass der oxidative Stress DNA-Schäden und die Auslösung onkogener Signalwege bewirkt. Es wird eine gesteigerte Aktivierung von c-Jun, STAT3 und der MAP-Kinase ERK induziert. Diese Kombination könnte die Hepatozyten für Neoplasien präkonditionieren oder solche fördern. Beide Effekte konnten durch die Anwendung des Antioxidans Glutathion reduziert werden.<sup>76</sup>

### **1.3.2.3 *Schistosoma mansoni* und kolorektale Karzinome**

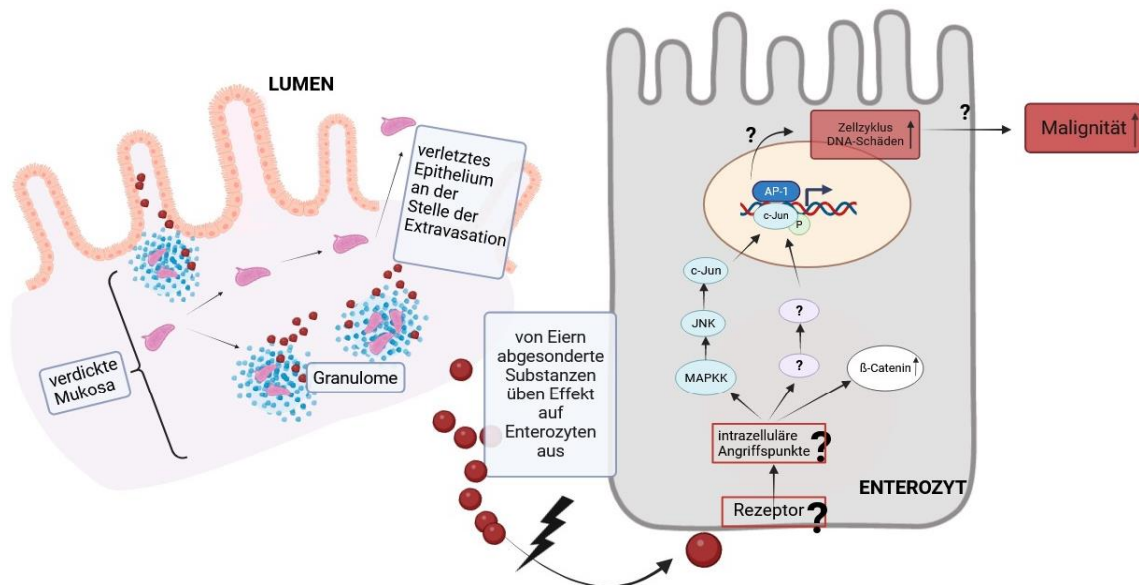
Zahlreiche Studien diskutieren den potentiellen Zusammenhang zwischen einer *S. mansoni*-Infektion und der Entstehung eines KRK.<sup>80</sup> Vermutet wird, dass die Granulome um die Schistosomeneier sowie die Entstehung von Pseudopolypen und Ulzerationen in der enteralen Mukosa zu Dysplasien führen.<sup>49,81</sup> Es wird eine Analogie zur Karzinogenese bei der CED Colitis ulcerosa angenommen. Wie bereits erklärt können wiederholte Episoden von Schädigungen und Reparaturen der Mukosa ein Stimulus für die Entartung von Gewebe sein.<sup>49</sup> In einer klinischen Studie von Madbouly *et al.* aus dem Jahr 2007 wurden KRK-Patienten mit und ohne Schistosomiasis-assoziiertes Kolitis verglichen. Die Kolitispatienten erkrankten in einem signifikant jüngeren Alter an einem KRK.<sup>82</sup> Das frühere Auftreten eines KRK bestätigt auch ein Fallbericht von Almeida *et al.*<sup>83</sup> Zusätzlich litten die Betroffenen häufiger unter multizentrischen Karzinomen und solchen in höheren und somit prognostisch ungünstigeren Stadien (III und IV).<sup>66,82</sup> Auch auf molekularer Ebene mehren sich die Hinweise auf eine Korrelation zwischen einer Karzinogenese und Schistosomiasis.

Madbouly *et al.* beschreiben eine gehäufte Veränderung in der Expression des Tumorsuppressorgens p53 bei Schistosomiasis-Patienten. Wie beschrieben sind Veränderungen des p53-Signalweges durch eine Mutation von p53 ein wichtiger Schritt bei der Entstehung des KRK.<sup>82</sup> Zalata *et al.* beschreiben in ihrer Studie, wie eine Infektion mit *S. mansoni* in kolorektalem Gewebe das Expressionsmuster des Bcl-2-Proteins verändert. Dadurch ergibt sich eine Dysregulation der Apoptose, welche die Entstehung eines KRK begünstigen könnte.<sup>84</sup> Soliman *et al.* erläutern in ihrer Arbeit die Assoziation von *S. mansoni*-Infektionen und Mikrosatelliten-Instabilität im KRK. Wie zuvor erklärt ist die Mikrosatelliten-Instabilität ein Zeichen für eine defiziente DNA-Reparatur.<sup>85</sup> Auch wird diskutiert, ob die chronische Inflammation proliferative Stimuli liefert. Diese könnten durch andere Karzinogene entstandene maligne Foki zum Wachstum anregen.<sup>49</sup> Trotz aller Hinweise ist eine Kausalität zwischen einer *S. mansoni*-Infektion und der Entstehung eines KRK weiterhin nicht durch Studien belegt. Hinreichende Erklärungen auf molekularbiologischer Ebene fehlen.<sup>86</sup>

#### **1.4 Aktivierung von onkogenen Signalwegen in Kolonepithelzellen durch *S. mansoni***

In der AG Prof. Roeb konnten grundlegende molekulare Mechanismen identifiziert werden, die bei der Interaktion der *S. mansoni*-Eiantigene mit den Kolonepithelzellen des Wirtes eine Prädisposition für KRK bewirken könnten. Die Abbildung 2 zeigt den Stand der Forschung zu den aktivierten Signalwegen im Kolonepithel bei einer *S. mansoni*-Infektion. Es konnte gezeigt werden, dass die Eiantigene während einer *S. mansoni*-Infektion in Kolonepithelzellen sowohl die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin- als auch des MAPK/ERK/JNK/c-Jun-Signalweges induzieren.<sup>24</sup> Diese Signalwege nehmen eine Schlüsselrolle in der Proliferation von Epithelzellen während der Karzinogenese ein.<sup>42,87,88</sup> c-Jun ist ein möglicher Bestandteil des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 (Aktivator Protein 1).<sup>89</sup> In dieser Studie konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die SEA-vermittelte Aktivierung der MAPK-Signalkaskade über die Aktivierung von c-Jun zu einer Induktion des Zellzyklusmarkers Cyclin D1 führte. Sowohl die Aktivierung von c-Jun als auch von Cyclin D1 wurde auch durch IPSE induziert.<sup>24</sup> Cyclin D1 sowie auch Ki67 und Mcm2, die ebenfalls durch Eiantigene induziert wurden, gelten als prognostische Marker im Zusammenhang mit KRK.<sup>24,90,91</sup> In infizierten Versuchstieren und auch in SEA-stimulierten Kolonepithelzellen *in vitro* wurden erhöhte Marker für DNA-Schäden ( $\gamma$ H2a.x) und DNA-Reparaturen (Parp-1) identifiziert. Mittels eines Comet-Assays konnte nachgewiesen werden, dass SEA in Kolonepithelzellen *in vitro* genotoxischen Stress auslöst und letztendlich zu einer DNA-Schädigung führt.<sup>24</sup> Die Induktion sowohl von onkogenen Signalwegen als auch von DNA-Schäden ist ein

Anhaltspunkt für eine Involvement der *S. mansoni*-Eiantigene in der kolorektalen Karzinogenese.<sup>24</sup>



**Abbildung 2: Kenntnisstand zu aktivierten Signalwegen im Kolonepithel bei einer *Schistosoma mansoni*-Infektion zu Beginn der vorliegenden Arbeit.** (modifiziert nach Weglage, Wolters *et. al* 2020; erstellt mit BioRender) Ein Teil der *S. mansoni*-Eier bleibt bei der Passage ins Darmlumen im Kolongewebe stecken.<sup>13,24</sup> Die Eier sind bioaktiv und interagieren über lösliche Eiantigene (SEA, hier als rote Kreise) mit dem Gewebe.<sup>19,24</sup> Es resultiert eine Hyperplasie der Mukosa und die Entstehung von Granulomen um die Eier. SEA aktiviert in Enterozyten Signalwege (MAPK/ERK/JNK/c-Jun, WNT/β-Catenin), die mit der Entstehung eines KRK assoziiert sind. Dies kann die Proliferation der Zellen und DNA-Schäden induzieren. Diese molekularbiologischen Prozesse könnten die Mechanismen sein, durch die *S. mansoni* die Entstehung eines KRK begünstigt.<sup>24</sup> Bisher unklar ist, über welche Rezeptoren und weitere intrazellulären Signalwege SEA diese potentiell onkogenen Effekte vermittelt.

#### 1.4.1 Transkriptionsfaktor AP-1

Unter Transkription versteht man einen Prozess, bei dem DNA in RNA umgeschrieben wird. Transkriptionsfaktoren regulieren diesen Prozess, indem sie an spezifische DNA-Sequenzen binden und so die entsprechenden Zielgene aktivieren oder hemmen.<sup>92,93</sup> Bei AP-1 handelt es sich um einen Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktor.<sup>94</sup> AP-1 wirkt an der Regulation von zellulärem Wachstum und Differenzierung sowie der Reaktion auf extrazelluläre Signale mit.<sup>89,94</sup> Solche Signale können Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine und Hormone sein. Auch eine Vielzahl von Infektionen und chemischer oder physikalischer Stress, wie ROS, kommen in Betracht.<sup>95,96</sup> Je nach Kontext spielt AP-1 eine Rolle bei der Initiierung oder Blockierung von Immunantworten und der Entstehung von Entzündungsreaktionen.<sup>97,98</sup> Über seine Rolle in der Regulation der Apoptose und des Zellzyklus kann AP-1 in die Entstehung von Neoplasien involviert sein.<sup>97,98</sup> Der onkogene Effekt einer vermehrten oder dysregulierten AP-1-Aktivierung begründet sich somit über die Initiierung von

Zellwachstum, Angiogenese, Metastasierung und Resistenzen gegenüber Medikamenten.<sup>99</sup>

Bei AP-1-Transkriptionsfaktoren handelt sich um Dimere aus Proteinen der ATF-, MAF-, Jun- und Fos-Familien in unterschiedlicher Kombination.<sup>89</sup> Diese Proteine verfügen über eine bZIP-Domäne (basic leucine zipper domain). Über das Erkennen spezifischer Response-Elemente, wie 5'-TGAG/CTCA-3', binden sie mit dieser Domäne an die DNA-Sequenz.<sup>95,98</sup> Die Proteine der Fos- und Jun-Familien sind am besten untersucht.<sup>100</sup> Fos-Proteine können lediglich Heterodimere bilden, während Jun-Proteine sowohl Homo- als auch stabilere Fos-Jun-Heterodimere bilden können.<sup>98</sup> Unsere Arbeitsgruppe hat nachgewiesen, dass c-Jun bei einer *S. mansoni*-Infektion eine Proliferation in Hepatozyten bewirken kann, was ggf. regenerativ wirkt.<sup>74,75</sup> Je nach Kontext kann c-Jun auch die Expression und Funktion von Tumorsuppressorgenen, wie p53 oder p21, supprimieren.<sup>97,98</sup> Gleichzeitig wird durch c-Jun die Expression von Proteinen - wie z.B. Cyclin D1 -, die die onkogene Transformation begünstigen aktiviert.<sup>97,98</sup> c-Jun wird daher auch als Onkogen bezeichnet. Es ist unter anderem im KRK hochreguliert.<sup>96,98</sup> Ein weiteres Mitglied der Jun-Familie ist JunB. Indem JunB die Expression von Tumorsuppressorgenen verstärkt, hat es einen zu c-Jun gegenteiligen Effekt. Neben dem zellulären Kontext hat somit auch die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes einen entscheidenden Einfluss auf die ausgelösten Effekte.<sup>95,96</sup> Die AP-1-Aktivität wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen erfolgt als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli eine unterschiedliche Expression der AP-1-Proteine.<sup>97</sup> c-Jun beispielsweise liegt in vielen Zellen in geringen Mengen vor. Bei einer Exposition gegenüber Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder UV-Strahlung steigt die Konzentration von c-Jun an.<sup>94</sup> Auch der unterschiedliche Abbau der AP-1-Proteine und die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren beeinflussen die intrazelluläre AP-1-Aktivität.<sup>95</sup> Extrazelluläre Stimuli beeinflussen die AP-1-Aktivität darüber hinaus über posttranslationale Modifizierungen.<sup>95</sup> Beispielsweise kann durch Phosphorylierungen von c-Jun (Serinrest 63 und 73) oder c-Fos (Tyrosinrest 232) durch die MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK die transkriptionelle Aktivität von AP-1 potenziert werden.<sup>94</sup>

#### **1.4.2 MAP-Kinase-Signalkaskaden**

Unter physiologischen Bedingungen sind die MAPK-Signalkaskaden streng reguliert. Sie kontrollieren mitunter den Zellzyklus und wirken einer onkogenen Transformation entgegen.<sup>101</sup> Eine Dysregulation der MAPK-Signalwege begünstigt die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms.<sup>42</sup> MAP-Kinasen sind eine Familie von Serin-/Threonin-Kinasen. Sie sind für die zelluläre Antwort auf extrazelluläre Stimuli wichtig.<sup>102</sup> Beispiele

für MAP-Kinase-Kaskaden sind ERK (extrazellulär regulierte Signalkinase), JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) oder die p38 MAPK.<sup>102</sup>

Die JNK- und p38-MAPK-Kaskaden werden vor allem durch proinflammatorische Zytokine und genotoxischen Stress ausgelöst. Dieser genotoxische Stress wird durch mutagene Substanzen oder andere schädliche Einflüsse auf die DNA verursacht.<sup>95</sup> Dabei können die beiden Kaskaden synergistisch die Aktivierung von AP-1 bewirken. Häufig sind ihre Effekte jedoch gegensätzlich zueinander.<sup>103</sup> JNK wird über die MAPK-Kinasen 4 und 7 reguliert.<sup>102</sup> JNK phosphoryliert c-Jun und begünstigt so die Transkription. Auch kann JNK den c-Jun-Abbau hemmen und somit dessen Aktivität verstärken.<sup>94,96</sup> Die Regulation der p38-MAPK erfolgt über die MAPK-Kinasen 3 und 6.<sup>102</sup> p38 induziert sowohl c-Jun- als auch c-Fos-Gene.<sup>97</sup> Die Rolle der p38-MAPK ist komplex und wird je nach Zelltyp und Kontext unterschiedlich bewertet.<sup>103,104</sup> Manche Studien identifizierten p38 bei einer übermäßigen Aktivierung als proinflammatorischen Faktor. Über seine Rolle bei der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren könnte p38 zur Karzinogenese beitragen. Es wird diskutiert, ob p38 außerdem eine vermehrte Angiogenese oder Metastasierung begünstigt.<sup>103</sup> Andererseits gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass p38 als Tumorsuppressor wirkt.<sup>105,106</sup> Dieser Effekt wurde unter anderem auch für kolorektale Karzinomzellen beschrieben.<sup>104</sup> p38 ist in der Lage, die Menge bzw. Aktivität onkogener Cycline zu vermindern.<sup>102</sup> Die Expression von p53 und der Zellzyklusinhibitoren p15 und p21 sowie DNA-Reparaturen und die Apoptose können begünstigt werden.<sup>102,104,105</sup> Gleichzeitig kann p38 Entzündungsreaktionen über die Aktivierung antiinflammatorischer Zytokine auch limitieren.<sup>107</sup> Eine Vielzahl an Studien liefert Hinweise, dass p38 eine negative Regulation der karzinomassoziierten MAPK ERK und JNK bewirkt.<sup>102-104,106</sup> ERK ist der wichtigste Mediator in der Reaktion auf Wachstumsfaktoren.<sup>97</sup> ERK wird innerhalb des Ras-Raf-Signalwegs durch die Kinasen MEK 1 und 2 phosphoryliert und dadurch aktiviert.<sup>94</sup> ERK induziert über eine Phosphorylierung die Synthese von c-Fos.<sup>94</sup> Gleichzeitig wird die Transkription von c-Jun begünstigt. c-Jun liegt so stabil in erhöhter Konzentration vor.<sup>96</sup>

#### **1.4.3 Potentiell involvierte Hormon- und Wachstumsrezeptoren sowie Kinasen**

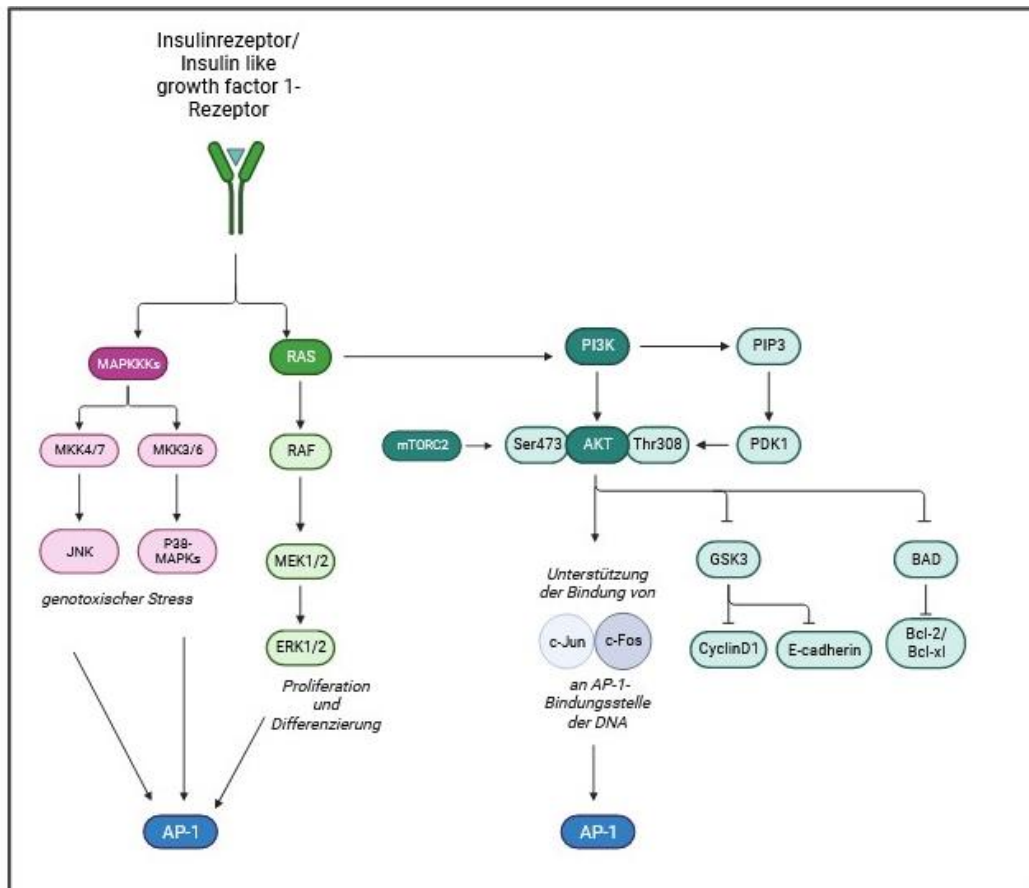
Hormon- und Wachstumsrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der physiologischen Regulation unter anderem des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose.<sup>108,109</sup> Bei einer übermäßigen Aktivierung oder einer Dysregulation können die Rezeptoren sowie ihre nachgeschalteten Signalwege und Kinasen jedoch auch zu einer onkogenen Transformation beitragen.<sup>66,110</sup> Sie sind daher eines der möglichen Ziele der Karzinomforschung und verschiedener Therapiestrategien.<sup>111,112</sup>

#### **1.4.3.1 Insulin- und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor**

Eine Hochregulierung der erwähnten MAPK-Signalwege erfolgt unter anderem auf Grund einer Überexpression oder abnormen Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs).<sup>101</sup> Eine RTK ist der Insulin- und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor.<sup>112</sup> Insulin und Insulin-like-growth-Faktoren (IGF) besitzen eine ähnliche Struktur. So erklärt sich, dass sich auch der Insulin-Rezeptor (IR) und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor (IGF1-R) strukturell sehr ähnlich sind.<sup>113</sup> Während Insulin vor allem in metabolische Prozesse eingreift, wirkt IGF auf das Wachstum, das Überleben und die Differenzierung von Zellen.<sup>113</sup> Eine übermäßige Aktivierung der IGF-Signalwege kann so die Entstehung, Weiterentwicklung und Metastasierung von Neoplasien unter anderem in epithelialen Geweben begünstigen.<sup>112</sup> Eine Inhibition der Aktivität des IGF1-R wird daher als mögliches Ziel in der Therapie von Malignomen diskutiert.<sup>112,114</sup> Neben dem MAPK-Signalweg spricht der Insulin- und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor auch den PI3K/Akt-Signalweg an. Studien zeigen, dass beide Signalwege simultan für eine Induktion der Zellproliferation aktiviert werden müssen.<sup>113</sup>

#### **1.4.3.2 PI3K/Akt-Signalweg**

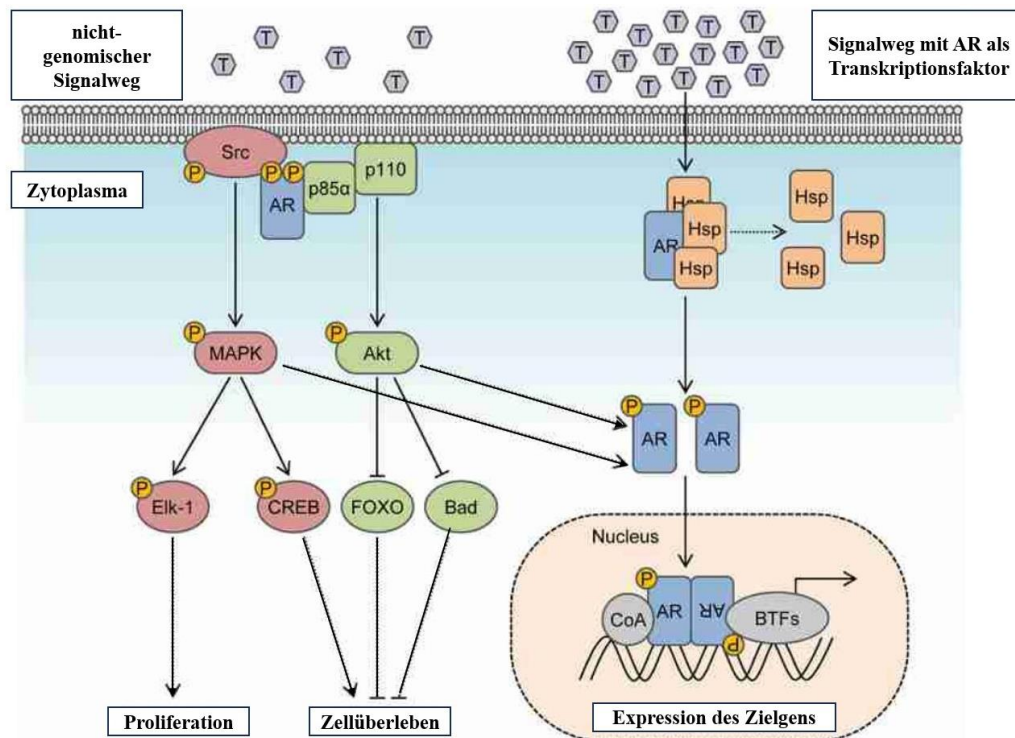
Der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für das Überleben und die Proliferation von maligne entarteten Zellen.<sup>102</sup> Innerhalb des Signalweges erfolgt eine Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub>. Dies führt zur Aktivierung der PDK1 (Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1). PDK1 phosphoryliert die Akt-Kinasen. Dies führt gemeinsam mit der zusätzlichen Phosphorylierung durch den Komplex mTORC2 zur Aktivierung der Akt/PKB-Kinase.<sup>113</sup> Akt ist auf vielfältige Weise in die Regulation des Zellwachstums, -überlebens, der Apoptose, der Metastasierung und der Angiogenese involviert.<sup>102</sup> Unter anderem inaktiviert Akt mittels einer Phosphorylierung GSK3, was zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges führt. Durch eine Phosphorylierung des Apoptoseregulators Bcl-2 wird das Zellüberleben begünstigt. p27 und das proapoptotische Protein Bad werden inaktiviert und so die Apoptose der Zelle verhindert.<sup>112</sup> Eine abnorme Aktivierung von PI3K führt derweil zur Hochregulation der MAPK-Signalwege.<sup>101</sup> Zusätzlich begünstigt Akt die Bindung von c-Jun und c-Fos an die DNA-Sequenz, die als spezifische Bindungsstelle für AP-1 dient.<sup>115</sup>



**Abbildung 3: Signalkaskaden, die durch eine Aktivierung des Insulin-/ IGF1-Rezeptors ausgelöst werden.** (zusammengestellt nach Hua, Kong *et al.* 2020; Hou, Hou *et al.* 2009; Lei, Teng *et al.* 2022; Vigneri, Tirrò *et al.* 2015; erstellt mit BioRender)

### 1.4.3.3 Androgenrezeptor

Es wird angenommen, dass eine Infektion mit Schistosomen den Hormonstatus des Wirts modifizieren kann. Dadurch können das Überleben und Wachstum sowie die Reproduktion der Schistosomen begünstigt werden.<sup>116</sup> Hormone sind einer der extrazellulären Stimuli, die Signalkaskaden und schließlich den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren.<sup>95</sup> In Prostatakarzinomzellen wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Androgenrezeptors (AR) und einer veränderten AP-1-Promotoraktivität gezeigt.<sup>117</sup> Auch beim KRK wird eine Involvierung des AR diskutiert.<sup>118,119</sup> Über einen nicht-genomischen Signalweg kann der aktivierte AR schnell Einfluss auf beispielsweise die Proliferation und Apoptose nehmen.<sup>120</sup> An sich gehört der AR jedoch zu der Familie der nukleären Rezeptoren.<sup>121</sup> So kann der aktivierte Rezeptor selbst als Transkriptionsfaktor fungieren.<sup>121</sup> Die Aktivierung kann durch Androgene oder Liganden-unabhängig erfolgen. Hierbei spielen Wachstumsfaktoren, Stress und Umweltfaktoren eine Rolle.<sup>120</sup> Auch die im nicht-genomischen Signalweg oder anderweitig aktivierten MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege können den AR beeinflussen.<sup>120</sup> Im Fokus der Karzinomforschung steht zusätzlich eine Induktion des Rezeptors durch Mutationen oder irreguläre Liganden.<sup>122</sup>



**Abbildung 4: Bei der Aktivierung des Androgenrezeptors involvierte Signalwege.** (modifiziert nach Leung, Sadar 2017) linke Seite: Der aktivierte Androgenrezeptor (AR) interagiert innerhalb des nicht-genomischen Signalwegs mit membranständigen Proteinen. Dies löst den MAPK- und PI3K/Akt-Signalweg aus. Z.B. spricht ERK so Transkriptionsfaktoren an, die unabhängig von einer direkten AR-Bindung sind. Insgesamt werden die Zellproliferation und die Apoptose reguliert. rechte Seite: Der AR befindet sich an Hitzeschockproteinen (Hsp) gebunden im Zytosol. Durch Bindung von Androgenen (T) an den Rezeptor wird eine Ablösung der Hsp begünstigt. Es erfolgt eine Konformationsänderung des AR zu einem Dimer. Der Androgenrezeptor transloziert in den Zellkern. Hier reguliert er die Expression der Zielgene. Die im nicht-genomischen Weg aktivierten MAPK und Akt können den AR beeinflussen.<sup>120</sup>

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Datenlage zur Interaktion der *S. mansoni*-Eiantigene mit dem Kolonepithel des Wirtes ist auf molekularer Ebene bisher unzureichend. Weiterhin fehlen Erkenntnisse zu der potentiellen Verbindung einer *S. mansoni*-Infektion und kolorektaler Malignität.<sup>19</sup> In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Roeb konnten bereits wichtige Erkenntnisse zu den Pathomechanismen einer *S. mansoni*-Infektion in der Leber und im Kolon gewonnen werden. In Hepatozyten waren unter dem Einfluss von *S. mansoni* die karzinomassoziierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT3 dauerhaft aktiviert.<sup>73</sup> Die Aktivierung karzinogener Signalwege ließ sich auch auf oxidativen Stress, der durch die Schistosomeneier im Leberparenchym ausgelöst wird, zurückführen.<sup>76</sup> Außerdem konnte gezeigt werden, dass *S. mansoni*-Eiantigene eine Zellproliferation induzieren.<sup>74,75</sup> Auch in Kolonepithelzellen führte die Stimulation mit Eiantigenen zu einer Erhöhung von Proliferationsmarkern wie Cyclin D1. Darüber hinaus kam es ebenfalls über den MAPK-Signalweg zu einer Aktivierung von c-Jun, genotoxischem

Stress und einer DNA-Schädigung.<sup>24</sup> c-Jun ist ein möglicher Bestandteil des AP-1-Transkriptionsfaktors.<sup>94</sup>

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein AP-1-Reportergen-Assay in humanen Kolonepithelzellen etabliert werden. Hiermit sollte untersucht werden, ob sich der AP-1-Promotor durch *S. mansoni*-Eiantigene aktivieren lässt. Die Induktion des AP-1-Promotors durch die Eiantigene sollte anschließend verwendet werden, um zu prüfen, welche weiteren Signalwege neben den bisher identifizierten bei einer Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigen eine Rolle spielen. Folgende Hypothesen sollten in der vorliegenden Arbeit geprüft werden:

**Hypothese 1:** Eine Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen (SEA) induziert die AP-1-Promotoraktivität in humanen Enterozyten.

Es sollte mittels Transfektion eines AP-1-Reportergens untersucht werden, ob eine *S. mansoni*-SEA-Stimulation die AP-1-Promotoraktivität in humanen Kolonepithelzellen (SW620-Zellen) induzieren kann. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob die AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA konzentrationsabhängig gesteigert werden kann.

**Hypothese 2:** Die AP-1-Promotoraktivität wird durch verschiedene Bestandteile im *S. mansoni*-SEA in unterschiedlicher Stärke induziert.

SEA setzt sich aus verschiedenen Glykoproteinen zusammen. Es sollte erforscht werden, welche Bestandteile im *S. mansoni*-SEA in welcher Intensität für eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität verantwortlich sind. Hierzu wurde SEA nach molekularer Größe aufgetrennt. Die Fraktionen wurden in Western Blot Analysen auf eine Expression und Aktivierung von c-Jun und im AP-1-Reportergen-Assay auf eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität hin untersucht.

**Hypothese 3:** Die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW60-Zellen lässt sich durch Hormon- und/ oder Wachstumsrezeptoren und/ oder deren nachgeschalteten Kinasen beeinflussen. Sie beruht außerdem teilweise auf oxidativem Stress.

Es sollte geprüft werden, ob Hormon- und/ oder Wachstumsrezeptoren sowie deren nachgeschaltete Kinasen die AP-1-Promotoraktivität induzieren oder inhibieren können. Zur Prüfung der Hypothese wurden SW620-Zellen vor einer SEA-Stimulation entweder mit Inhibitoren für verschiedene Rezeptoren oder Kinasen behandelt. Anschließend wurde die AP-1-Promotoraktivität im AP-1-Reportergen-Assay analysiert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das antioxidativ wirkende Glutathion die SEA-stimulierte AP-1-Promotoraktivität abmildern kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Instrumente und Geräte

Tabelle 1: Instrumente und Geräte

Instrument/ Gerät/ Produktnummer	Hersteller	Firmensitz
Biometra Fastblot™	Biometra-GmbH	Göttingen (Deutschland)
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Fisher Bioblock Scientific	Villeneuve-d'Ascq (Frankreich)
Eismaschine Scotsman AF 100	Hubbard Ice Systems	Suffolk (UK)
Electrophoresis Power Supply Consort EV #243	Fisher Bioblock Scientific	Villeneuve-d'Ascq (Frankreich)
FACSCOPE® B (Automatischer Zellzähler) #FSC141E-F2097	Curiosis Inc.	Seoul (Südkorea)
Gefrierschrank (-20 °C) #GNP3376	Liebherr-Werk Biberach	Biberach (Deutschland)
Gefrierschrank (-80 °C) #907	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
HERACELL 150 i CO2 Incubator	Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
Infinite M Plex (Multifunktions-Mikroplatten-Reader / Fluoreszenz)	Tecan Group Ltd.	Männedorf (Schweiz)
Kamera Nikon CoolHx540	Nikon Corporation	Tokio (Japan)
Kühlschrank Profi Line	Liebherr	Ochsenhausen (Deutschland)
LaminAir® HBB #2448	Heraeus Instruments GmbH	Hanau (Deutschland)
Lichtmikroskop #156585	Leica Microsystems	Wetzlar (Deutschland)
Magnetrührer #RCTB 00.084009	IKA Werke GmbH & Co. KG	Staufen (Deutschland)
MIKRO 120 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen (Deutschland)
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, Kalifornien (USA)
NanoQuant Plate™	Tecan Group Ltd.	Männedorf (Schweiz)
Pipette serologisch 10 mL #607180	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
Pipette serologische 5 mL #606180	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
Pipetten Abimed	International Labmate Ltd	St. Albans (Vereinigtes Königreich)
Pipetten Research plus	Eppendorf AG	Hamburg (Deutschland)
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt (Deutschland)
Rocking Platform	VWR International GmbH	Darmstadt (Deutschland)
Rüttler #444-0142	VWR International GmbH	Darmstadt (Deutschland)
Slamed 8-Kanal Pipette 20-200 µl #451833437	Ratiolab GmbH	Dreieich (Deutschland)
Stickstofftank #CFB-160	Taylor-Wharton Harsco GmbH	Husum-Mildstedt (Deutschland)

ThermoMixer #5436	Eppendorf AG	Hamburg (Deutschland)
Trans-Blot® Turbo™ System #690BR028141	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen (Deutschland)
Ultra TURRAX T3	IKA-Labortechnik	Staufen (Deutschland)
Vortex Schüttler VF2	IKA-Labortechnik	Staufen (Deutschland)
Vortex-Mixer 7-2020	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Waage Kern #440-47	KERN & SOHN GmbH	Albstadt (Deutschland)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Produktnummer	Hersteller	Firmensitz
Biosphere® Filter Tips	70.760.211	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
CELLSTAR® 24 Well Cell Culture Plate	662 160	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® 96 Well Cell Culture Plate	655098	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® TUBES, 15 mL	188 271	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® TUBES, 50 mL	227 261	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
CELLSTAR® Zellkultur Schale	664160	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster (Österreich)
C-Slide® Einweg-Zählkammer	CRCSD-NI50	Curiosis Inc.	Seoul (Südkorea)
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	612-1702	VWR International GmbH	Darmstadt (Deutschland)
Immobilon®-P Transfer Membrane	IPVH00010	Merck Millipore Limited, Tullagreen	Carrigtwohill ED (Irland)
Micro-Touch®	18074824DF	Ansell	Richmond (Australien)
Pipettenpitzen mit Filter 10 µL	70.1130	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter 1000 µL	70.762.010	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter 200 µL	70.760.012	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
Reagiergefäß 1,5 mL	72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
Reagiergefäß 2,0 mL	72.691	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
Vernichtungsbeutel	86.1197	SARSTEDT AG & Co. KG	Nümbrecht (Deutschland)
Whatman™ Gel Blot Paper	10426892	GE Healthcare Uk Limited	Buckinghamshire (UK)

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/ Reagenzien	Produktnummer	Hersteller	Firmensitz
1,4-Dithiothreitol (DTT)	6908	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Ampicillin	1090925	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA), pH=7	BSA-1T	Capricorn Scientific	Ebsdorfergrund (Deutschland)
Bromphenolblau	15375	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg (Deutschland)
Chlorwasserstoff (HCl)	30721-1L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
Dimethylsulfoxide ROTIPURAN® (DMSO)	4720.4	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	P030	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
DNase/RNase-free-Water	W1001-30	Zymo Research	Irvine, Kalifornien (USA)
Essigsäure (Eisessig) 100%	1.00063.1011	Merck KGaA	Darmstadt (Deutschland)
Ethanol ROTIPURAN®	9065.4	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Fetal Calf Serum (FCS)	AC-SM-01908	Anprotec	Bruckberg (Deutschland)
Glycin PUFFERAN®	3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Isopropanol	33539-2,5L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	HN02	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	3904.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
LB-Agar	X969.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
LB-Medium	X968.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Lipofectamin™ 3000 inkl. P 3000™ Reagent	L3000015	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
Luminol	123072	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
Methanol	32213-2.5L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
Milchpulver (Blotting grade)	T145.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	4360	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
Opti-MEM™ (serumreduziertes Medium)	31985-062	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)

Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
PBS (Phosphate Buffered Saline)	17-512F	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
p-Cumarsäure	C9008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	21059	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	35925	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg (Deutschland)
Tris base	77-86-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
TRIS PUFFERAN®	4855.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe (Deutschland)
TWEEN® 20	39796.01	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg (Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	216763	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	2 M Tris/HCl SDS (10 %) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	375 mL 10 mL 115 mL
5% BSA-Lösung	BSA TBS-T	2,5 g 50 mL
5% Milchpulverlösung	Milchpulver TBS-T	2,5 g 50 mL
HRP Entwicklungslösung (ECL)	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 2 M Tris Puffer pH 8,5 Luminol (250 mM) p-Cumarsäure (90 mM) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (unmittelbar vor Entwicklung) (37 %)	9500 µL 500 µL 50 µL 25 µL 2,6 µL
Kollagen II (50 µg/mL)	Essigsäure (20 mM) Kollagen I (3 mg/mL)	49,17 mL 833 µL
Lämmli-Puffer (Auftragspuffer)	Glycerin Dithiothreitol (DTT) SDS (8%) 0,25 M Tris HCl pH 6,8 Bromphenolblau  Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> bis zu einem Endvolumen von 50 mL	20 mL 3,09 4 g 6,25 mL 10 mg
10x Elektrophorese-Laufpuffer	SDS (35 mM) TRIS PUFFERAN Glycin Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> bis zu einem Endvolumen von 1000 mL	10 g 30 g 144 g

PBS-Puffer	Natriumchlorid (NaCl) (1,37 M) Kaliumchlorid (KCl) (27 mM) Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (18 mM) Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (81 mM) Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> bis zu einem Endvolumen von 1000 mL pH-Wert auf 7,4 einstellen 100 mL der Flüssigkeit in 900 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> lösen	80 g 2 g 2,45 g 11,5 g
Sammelgel (3 %) (für 2 Gele)	Polyacrylamid Gel (30 %) H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> Tris Puffer pH 6,8 APS (10 %) TEMED	330 µL 2130 µL 830 µL 40 µL 4 µL
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 2 M Tris pH 6,8 SDS (20 %)	365 mL 125 mL 10 mL
Bjerrum Schafer-Nielsen Puffer: Transferpuffer (pH 9,2)	Tris-gepuffert (48mM) Glycin (39 mM) in 500 mL H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> lösen Methanol (20%) Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> bis zu einem Endvolumen von 1000 mL	5,82 g 2,93 g 200 mL
Trenngel (10 %) (für 2 Gele)	Polyacrylamid Gel 30 SDS (10 %) 2 M Tris Puffer pH 8,8 H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> APS TEMED	3332 µL 100 µL 1950 µL 4550 µL 100 µL 10 µL
4x Tris/HCL Puffer (SDS-PAGE Trenngel)	2 M Tris/HCL pH 8,8 (1,5 M) 20 % SDS (0,4 %) Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> bis zu einem Endvolumen von 500 mL	375 mL 10 mL
TBS-T	Natriumchlorid (NaCl) (1,37 M) 2 M Tris pH 7,5 H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> TWEEN® 20	20 g 25 ml 2475 ml 2,5 ml

## 2.1.5 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

<b>SW620-Zellen</b>	
Produktnummer	300466
Hersteller	CLL Cell Lines Service GmbH
Firmensitz	Eppelheim (Deutschland)
Organismus	<i>Homo sapiens</i> (human)
Herkunft (Ethnie)	Kaukasus
Alter	51 Jahre
Geschlecht	männlich
Gewebe	Kolon
Morphologie	epithelial
Zelltyp	Adenokarzinom, kolorektal, Dukes Typ C
Wachstumseigenschaften	Einzelschicht, adhären

<b>MAX Efficiency™ DH5α kompetente Zellen</b>	
Produktnummer	18258012
Hersteller	Thermo Fisher Scientific
Firmensitz	Waltham, Massachusetts (USA)
Spezies	E. coli
Inhalt	Subcloning Efficiency DH5α-kompetente Zellen pUC19 DNA (0,01 µg/ml) S.O.C.-Medium

## 2.1.6 Medien und Zusatzstoffe

Tabelle 6: Medien und Zusatzstoffe

Medium/ Zusatzstoff	Produktnummer	Hersteller	Firmensitz
RPMI 1640 Medium	P04-16500	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach (Deutschland)
Trypsin/ EDTA	P10-0231 SP	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach (Deutschland)
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Mix	P06-07350	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach (Deutschland)
S.O.C. Medium	15544-034	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts (USA)
DPBS	17-512F	Lonza Group AG	Basel (Schweiz)
Gibco™ Collagen I, Rat Tail 20 ml	A10483-01	Life Technologies	Carlsbad (USA)
Trypan Blue Stain 0,4 %	15250	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach (Deutschland)

### 2.1.7 *Schistosoma mansoni*-Eier, SEA, IPSE und SEA-Fraktionen

Die *S. mansoni*-Eier stammten aus der Arbeitsgruppe Prof. Christoph Grevelding des Institutes für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die als Versuchstiere verwendeten Hamster wurden mit *S. mansoni* infiziert. Nach sechseinhalb Wochen wurden aus den Lebern der Versuchstiere *S. mansoni*-Eier gewonnen. Diese wurden mehrschrittig aufgereinigt und in M199 Medium (+ 10% Serum (NCS, newborn calf serum) + 1% P/S) überführt. Darüber hinaus wurde aus der Arbeitsgruppe SEA für die durchgeführten Stimulationsversuche zur Verfügung gestellt (SEA-Lieferung 05/2020, 2,66 mg/mL, steril filtriert, gelöst in PBS). Geschäftszeichen des Tierversuchsantrags: V 54-19c 20 15 h 02 GI 18/10 Nr.A 1/2014.

Weiteres SEA stammte aus einer Kooperation mit Dr. Gabriele Schramm vom Forschungszentrum Borstel-Leibniz-Lungenzentrum (FZB) (SEA-Lieferung 07/2020, Charge 69, 1,52 mg/mL, gelöst in PBS). Aus dieser Zusammenarbeit stammte auch das natürliche (n)IPSE/alpha-1. Dieses war in einem zweischrittigen Chromatographie-Verfahren aus SEA extrahiert, kontrolliert und in PBS aufgenommen worden (0,25 mg/mL). In 293 HEK-Zellen (human embryonic kidney-Zellen) wurde rekombinant HEK-IPSE hergestellt. Mittels des Expressionsvektors pSecTag2-IPSE erfolgte eine

Aufreinigung (0,46 mg/ mL). Nach erfolgter Kontrolle wurde HEK-IPSE zur Verfügung gestellt. Zur Gewinnung der SEA-Fractionen wurden im FZB ferner 250 µl SEA (1,42 mg/ mL, gelöst in PBS) per Größenausschlusschromatographie nach der Molekülgröße aufgetrennt. Dies erfolgte, dem Herstellerprotokoll folgend, mittels der Gelfiltrationssäule Superdex® 200 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Kleinere Moleküle laufen dabei langsamer durch das Agarose-Dextran-Gel der Säule als größere. Es wurde eine Laufrate von 0,4 µl/ Minute gewählt. Zuvor lief ein Marker für die Molekularmasse (low molecular weight marker, (1:16), 250 µl, PBS, 0,4 µl/ Minute) durch die Gelfiltrationssäule. An deren Auslass wurde mit einem UV-Detektor bei 280 nm jeweils ein Signal gemessen, das proportional zur Absorption der eluierenden Moleküle ist. Das Maß für die Absorption ist die optische Dichte. Angegeben wird sie in Absorptionseinheiten (AU) oder Milliabsorptionseinheiten (mAU). Laut persönlicher Kommunikation mit dem FZB war die Konzentration bei der Auftrennung zu niedrig für eine Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen.

### 2.1.8 Kommerzielle Kits

Tabelle 7: Kommerzielle Kits

Kit	Produktnummer	Hersteller	Firmensitz
Dual-Glo® Luciferase Assay System	E2940	Promega	Walldorf (Deutschland)
Plasmid Midi Kit	12143	QIAGEN®	Venlo (Niederlande)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	G7570	Promega	Walldorf (Deutschland)

### 2.1.9 Inhibitoren/ Stimulanzen

Tabelle 8: Inhibitoren/ Stimulanzen

Substanz	Produktnummer	Hersteller	Firmensitz
Akt (Akt 1/Akt 2/Akt 3)-Inhibitor (Capivasertib AZD 5363)	S8019	Selleck chemicals	Houston, Texas (USA)
Dualer IR/IGF1R-Inhibitor (BMS 536924)	4774	Tocris Bioscience	Bristol (UK)
EGFR und PDGFR-Kinase-Inhibitor (AG 18)	0493	Tocris Bioscience	Bristol (UK)
Endogener Östrogenrezeptor-Agonist (β-Estradiol)	2824	Tocris Bioscience	Bristol (UK)
Inverser Ghrelin Rezeptor-Agonist (PF-5190457)	HY-12584	MedChemExpress	Monmouth Junction, New Jersey (USA)
MEK 1/2-Inhibitor (U0126)	19-147	Merck KGaA	Darmstadt (Deutschland)
Nicht-steroidaler Androgenrezeptor-Antagonist (Bicalutamide)	3389	Tocris Bioscience	Bristol (UK)

Östrogenrezeptor-Antagonist (ICI 182,780)	1047	Tocris Bioscience	Bristol (UK)
p38 MAP-Kinase-Inhibitor (SB203580)	559389	Merck KGaA	Darmstadt (Deutschland)
Reduziertes L-Glutathion (GSH)	G6013-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (Deutschland)
TLR4-Inhibitor (TAK-242)	614316	Merck KGaA	Darmstadt (Deutschland)

## 2.1.10 Antikörper

Tabelle 9: Antikörper

Primärantikörper	Molekulargewicht	Produkt-nummer	Hersteller	Firmensitz
c-Jun (1:1000, Milch 5%) Rabbit monoclonal IgG	48 kDa	9165S	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts (USA)
GAPDH (1:10 000, BSA 5%) Mouse monoclonal IgG2b	36 kDa	60004-1-Ig	Proteintech Group	Rosemont, Illinois (USA)
Phospho-c-Jun (Ser73) (1:1000, BSA 5%) Rabbit monoclonal IgG	48 kDa	9164S	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts (USA)
Sekundärantikörper		Produkt-nummer	Hersteller	Firmensitz
Goat anti-rabbit IgG HRP-linked (1:5000, Milch 5%)		7074	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts (USA)
Horse anti-mouse IgG HRP-linked (1:5000, Milch 5%)		7076	Cell Signaling Technology	Danvers, Massachusetts (USA)

## 2.1.11 Software

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller	Firmensitz
IBM® SPSS® Statistics Version 29	SPSS Inc., IBM Corporation	Armonk, New York (USA)
i-control™ Microplate Reader Software Version 2.0.10.0	Tecan Group AG	Männedorf (Schweiz)
ImageJ V.1.52e	National Institute of Health	Bethesda, Maryland (USA)
Microsoft Excel® Version 16.0 (2016)	Microsoft Corporation	Redmond, Washington (USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur mit SW620-Zellen

Ein Gefäß der gefrorenen SW620-Zellen wurde aus einem Tank mit flüssigem Stickstoff (-196°C) entnommen. Es wurde in einem auf 37° Celsius temperierten Wasserbad angewärmt. Die verbleibende Zell-Eis-Masse wurde zum vollständigen Auftauen in eine Zellkulturschale transferiert. Diese Zellkulturschale war mit 10 mL frischem, erwärmten, serumhaltigem RPMI-Medium (+/+, 10% FSC und 1% Penicillin/ Streptomycin/

Amphotericin B Mix) vorbereitet worden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit.

Je nach Wachstumsdichte wurden die SW620-Zellen ein bis zwei Mal wöchentlich passagiert. Im Wasserbad wurde frisches Medium (RPMI +/+) auf 37°C erwärmt. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde der Überstand an Medium aus den Zellkulturschalen entfernt. Es erfolgte ein dreimaliges Reinigen mit DPBS und das Hinzufügen von 1 mL Trypsin-EDTA. Dann wurden die Zellen für ca. fünf Minuten inkubiert. Unterdessen wurden sterile Zellkulturschalen (58 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) mit 5 mL Kollagen II benetzt. Der entstehende Überstand wurde abgesaugt. Es wurden 10 mL frisches Medium vorgelegt. Nach der Inkubation erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen. Bei erfolgreicher Ablösung aller Zellen, wurde die Reaktion mit 9 mL frischem Medium (RPMI +/+) gestoppt. Jeweils 1 mL der entstandenen Suspension wurde in die vorbereiteten Zellkulturschalen gegeben.

#### Aussaat der Zellen in eine 96-Well-Platte

20 µl der beim Passagieren entstandenen Suspension wurden mit 20 µl Trypanblau versetzt. Im Zellzähler wurden 20 µl des entstandenen Gemischs analysiert. Anschließend wurde die Suspension soweit mit Medium (RPMI +/+) verdünnt, dass die für jedes Well verwendeten 100 µl des Endproduktes 40 000 Zellen enthielten.

$$\frac{\text{angestrebte Zellzahl (40 000)}}{\text{vorhandene Zellzahl (laut Cellcounter)}} \times \text{Volumen der Zellsuspension} = x \text{ (benötigtes Volumen)}$$

$$100\mu\text{l} - x = y \text{ (benötigtes Volumen an Medium)}$$

#### Aussaat der Zellen in eine 24-Well-Platte

Es wurde 1 mL der beim Passagieren entstandenen Suspension in einem sterilen Flacon mit 9 mL frischem Medium (RPMI +/+) gemischt. In jedes Well wurden 500 µl der entstandenen Zellsuspension transferiert, was zirka 100 000 Zellen/ Well entsprach. Beide Platten wurden am Folgetag sowie an jedem Versuchstag lichtmikroskopisch begutachtet. Es wurde kontrolliert, dass zirka 80 Prozent der Well-Oberfläche konfluent mit Zellen bewachsen waren und keine Kontamination vorlag. Die Stimulation und Inhibition der SW620-Zellen werden nachfolgend detailliert im Kapitel der jeweiligen Experimente erläutert.

### **2.2.2 Transformation und Plasmidgewinnung**

Die Transformation ist neben der Transduktion und Konjugation eine Variante des Gentransfers bei Prokaryoten. Es handelt sich um einen natürlichen Prozess, der es den Bakterien erlaubt, neue genetische Informationen zu gewinnen. Daraus entstehen

ihnen gewisse Vorteile, wie z.B. eine Antibiotikaresistenz.<sup>123,124</sup> Bei der Transformation macht man sich diesen Mechanismus zu Nutze. Rekombinante DNA wird in einem Vektor zu kompetenten Bakterienzellen transferiert und in diese aufgenommen. Bei der anschließenden Vervielfältigung der Bakterien wird auch die gewünschte DNA vermehrt.<sup>125,126</sup>

### **Transformation**

Für die Herstellung des Nährbodens wurden 25 g LB-Medium und 20 g LB-Agar in einem Liter H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> suspendiert. Zur vollständigen Lösung der beiden Pulver wurde das Gemisch unter permanentem Rühren zum Kochen gebracht. Dann wurde die Lösung bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Ein Gramm Ampicillin wurde in 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gelöst ( $\cong$  100 mg/ mL). 200 µl dieser Ampicillin-Lösung wurden mit 200 mL der auf 45°C abgekühlten Agarlösung versetzt. Dies entsprach einer Ampicillin-Konzentration von 100 µg/ mL Agar. Zum Aushärten wurde die entstandene Mischung gleichmäßig auf acht sterile Zellkulturplatten verteilt. Die steril verpackten Agarplatten wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

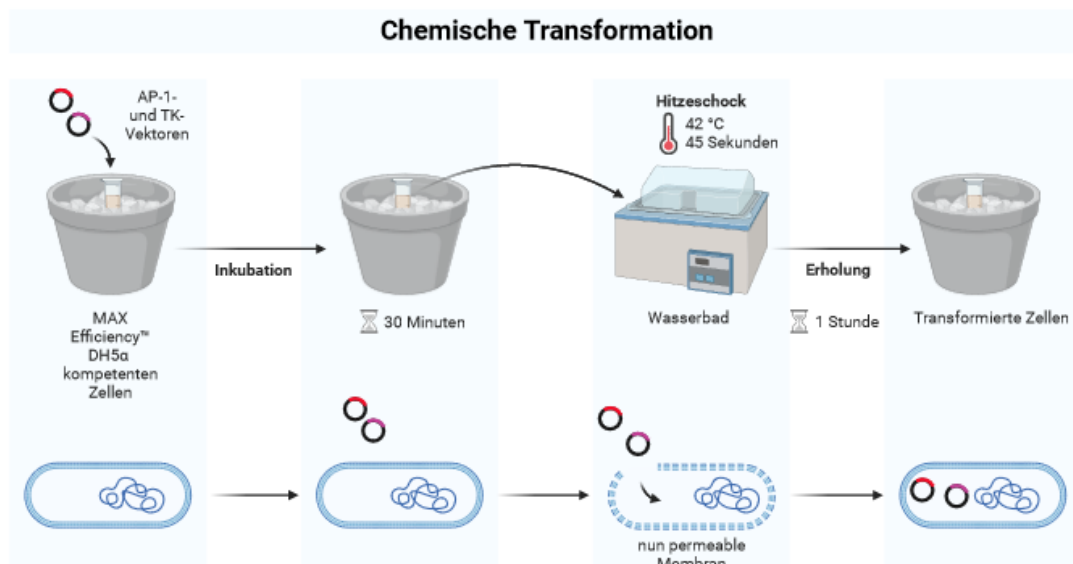
Es wurden kommerziell erhältliche Plasmide der Firma Promega (Walldorf, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Plasmide AP-1 ((pGI4.44 [luc2P/AP1 RE/Hygro]), Produktnummer E4111) und TK ((pGL4.74[hRluc/TK]), Produktnummer E6921) sind in den Abbildungen 24 und 25 im Anhang zu sehen.

Tabelle 11: Vektoren für die Transformation

Vektoren/ Negativkontrolle	Verwendung	Menge	gelöst in
AP-1 (pGI4.44 [luc2P/AP1 RE/Hygro]) 1:100 in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> $\cong$ 10 ng/1µl	Vektor, mit gewünschter genetischer Information	1 µl	je 100 µl MAX Efficiency™ DH5α kompetenten Zellen
TK (pGL4.74[hRluc/TK]) 1:100 in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> $\cong$ 10 ng/1µl	Kontrollvektor für Transfektion	1 µl	
pUC19 DNA 0,01 µg/ mL	Kontrollvektor für Transformationseffizienz	5 µl	
S.O.C Medium	Negativkontrolle zur Überprüfung der Sterilität	5 µl	100 µl Medium

Die Transformation wurde mittels eines Hitzeschockverfahrens durchgeführt. Dem Herstellerprotokoll folgend wurden alle vier Proben für 30 Minuten auf Eis gekühlt. Dann erfolgte im 42°C warmen Wasserbad eine 45-sekündige Erhitzung sowie eine zweiminütige Abkühlung auf Eis. Um die Viabilität der Zellen sicherzustellen und die Klonierungseffizienz zu steigern, folgte eine Erholungsphase. Hierfür wurde jeder Probe 900 µl S.O.C Medium zugesetzt. Bei 37°C und 225 rpm wurden die Zellen für

eine Stunde auf einem Wippschüttler inkubiert. Die pUC19 DNA-Probe wurde anschließend im Verhältnis 1:100 mit S.O.C Medium verdünnt. 100 µl der so entstandenen Suspension und jeweils 50 µl der restlichen Proben wurden unter sterilen Bedingungen auf den Agarplatten verteilt. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag zeigten sich Kolonien auf den Agarplatten mit den AP-1-, TK- und pUC19-Vektoren. Keine Kolonien waren auf der Platte mit der Negativkontrolle herangewachsen. Es wurde LB-Medium (25g LB-Medium/ 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) mit 100 µl Ampicillin versetzt. Kolonien jedes Vektors wurden in jeweils 100 mL dieses Mediums transferiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 160 rpm über Nacht. Jede Probe wurde am nächsten Tag in ein 50 mL Röhrchen aufgenommen und zentrifugiert (4°C, 6000g für 15 Minuten). Ein Teil des entstandenen Sediments wurde in Glycerol aufgenommen und bei -80°C gelagert.



**Abbildung 5: Arbeitsschritte der chemischen Transformation.** (nach dem Herstellerprotokoll erstellt mit BioRender)

### Plasmidgewinnung

Die Isolierung der Plasmide aus dem gewonnenen Sediment wurde laut Herstellerangaben mittels des QIAGEN® Plasmid Kits Midi durchgeführt.

### Bakterienlyse

Zunächst erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien. Dazu wurde jedes Pellet in je 4 mL des mitgelieferten Puffers P1 (bereits RNase A-Lösung enthaltend) transferiert. Nach Hinzugabe von 4 mL Puffer P2 erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 4 mL gekühlter Puffer P3 hinzugefügt. Es

folgte eine Separation durch Zentrifugation (4°C, 20 000 g für 30 Minuten, Extraktion des Pellets, dann erneute Zentrifugation für 15 Minuten).

### Gewinnung der DNA

Die Plasmid-DNA wurde mittels selektiver Bindung an einem Anionen-Austausch-Röhrchen extrahiert. Dafür wurde ein QUIAGEN-Röhrchen pro Probe mit je 4 ml Puffer QBT der Schwerkraft folgend austariert. Die zuvor vorbereiteten DNA-Proben wurden hinzugefügt. Zur Eliminierung von RNA, Proteinen und Verunreinigungen wurde das Röhrchen zweimalig mit je 10 mL Puffer QBT gewaschen. Mittels je 5 mL Puffer QF konnte die gereinigte DNA aus dem QUIAGEN-Röhrchen in ein steriles 15 mL Röhrchen gelöst werden. Die Proben wurden durch die Zugabe von je 3 mL raumtemperiertem Isopropanol konzentriert. Zur Gewinnung der DNA wurden die Proben zentrifugiert (4°C, 15 000 g für 30 Minuten), mit raumtemperiertem 70-prozentigem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C, 15 000 g für 10 Minuten). Nach zehninütiger Lufttrocknung wurde die DNA in 10mM Tris-Cl Puffer (pH 8,5) aufgenommen und bei – 20°C Grad gelagert.

### Konzentrationsbestimmung der DNA

Dem Herstellerprotokoll folgend, wurde die DNA-Konzentration mittels einer NanoQuant Plate™ bestimmt. Die DNA-Proben und Wells mit Blanking-Puffer wurden bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 310 nm im Infinite M Plex-Reader ausgelesen. 310 nm diente als Referenzwellenlänge. Die hier gemessenen Werte wurden von allen übrigen gemessenen Proben subtrahiert. Dann wurde von den zu bestimmenden DNA-Proben der zugehörige Blank-Wert abgezogen. Die Konzentration der DNA-Proben wurde anschließend wie folgt berechnet:

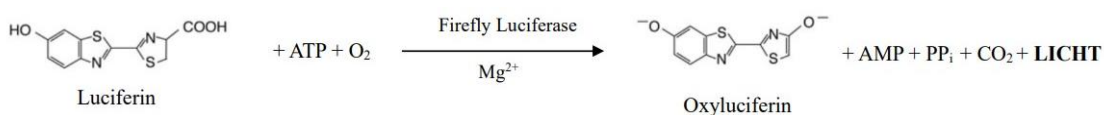
$$\text{Konz.DNA} = \text{Probe 260 Ref} \times 1000 \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

In  $\mu\text{g/}\mu\text{l}$  umgerechnet ergab sich eine DNA-Konzentration von 2,19  $\mu\text{g/}\mu\text{l}$  für die Probe des AP-1-Vektors und von 1,97  $\mu\text{g/}\mu\text{l}$  für die Probe des TK-Vektors. Bei einer späteren erneuten Plasmidgewinnung ergaben sich 1,48  $\mu\text{g/}\mu\text{l}$  (AP-1) und 1,66  $\mu\text{g/}\mu\text{l}$  (TK).

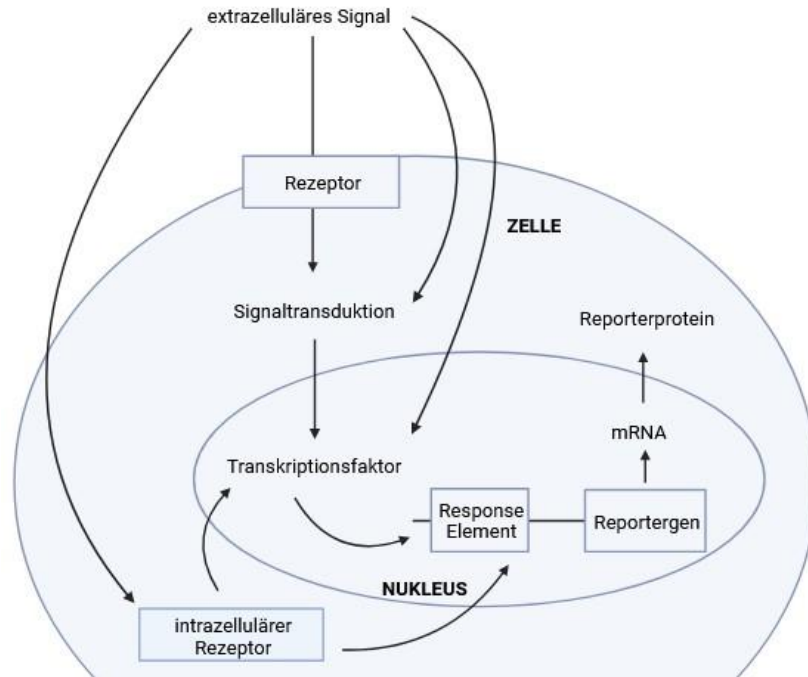
### **2.2.3 Reporteragen-Assay**

Extrazelluläre Stimuli interagieren mit intrazellulären und membranständigen Rezeptoren. Durch die anschließende Aktivierung verschiedener Wege der Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren greifen sie somit in die Genexpression der Zelle ein. Dabei wird die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren und Response Elementen in den Promotorregionen von bestimmten Zielgenen angeregt.<sup>127,128</sup> Gegenstand der Forschung ist es, die Beziehung zwischen der Inhibition oder

Aktivierung verschiedener Rezeptoren und Signalwege und der Genexpression besser zu verstehen.<sup>128</sup> Eine Methode, diese Mechanismen *in vitro* zu erforschen, sind Reporter-Gen-Assays.<sup>127</sup> Grundlage ist es, ein sogenanntes Reporter-Gen in das zu untersuchende Gen oder in den Promotor eines Gens einzubringen. Diesen Prozess nennt man Transfektion. Es wird ein Reporter-Gen verwendet, dessen Produkt sich im Verlauf des Experiments präzise nachweisen lässt.<sup>128</sup> Beispielsweise kann ein Produkt gewählt werden, das in Kombination mit einer entsprechenden Stimulanz in der Lage ist Biolumineszenz zu generieren. Dabei handelt es sich um Licht, das von einem lebenden Organismus mittels einer Oxidationsreaktion produziert wird.<sup>129</sup> Biolumineszenz kommt natürlicherweise bei einigen Mikroorganismen oder Meerestieren vor. Dahingegen produzieren Säugetiere selbst überhaupt keine Biolumineszenz. Jegliches gemessene Signal stammt daher von dem Reporter-Gen. Dies erklärt die hohe Sensitivität der Methode.<sup>130</sup> Verwendet wird beispielsweise die Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*). Sie wird aus einer biolumineszierenden Korallenart gewonnen.<sup>127</sup> Noch häufiger wird das Firefly-Luciferase-Gen (*Photinus pyralis*) aus Glühwürmchen verwendet. Wann immer das Zielgen oder der Zielpromotor aktiv sind, wird auch das Reporter-Gen aktiviert. Es entsteht Firefly-Luciferase. Diese generiert in zwei Schritten Biolumineszenz. Zunächst werden hinzugefügtes Luciferin und ATP zu Luciferin-Adenylat konvertiert. Unter dem Einfluss von Sauerstoff werden daraus anschließend Oxyluciferin, AMP und Licht. Die emittierte Lichtintensität wird gemessen.<sup>130</sup>



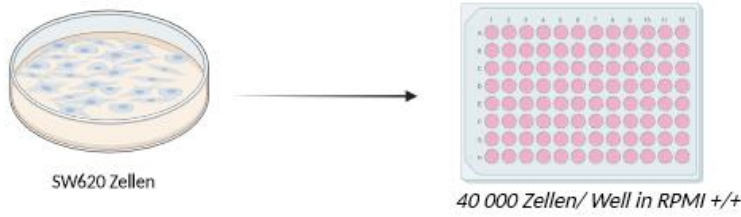
Werden experimentell ein involvierter Rezeptor oder ein Signalweg angesprochen, so werden das Ziel- und auch das Reporter-Gen aktiviert.<sup>127</sup> Über die gemessene Lichtemission lässt sich dann die Aktivität des Reporter-Gens bestimmen. Dies ermöglicht eine Quantifizierung der Aktivität des Zielgens oder des Promotors.<sup>130</sup>



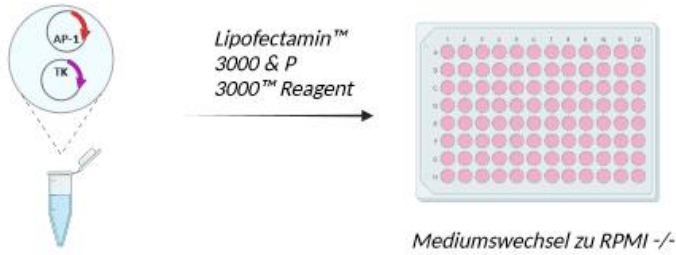
**Abbildung 6: Funktionsweise des Reportergen-Assays.** (modifiziert nach Naylor 1999; erstellt mit BioRender)

Insgesamt ist die Reportergen-Technologie eine vielfältige Methode, um intrazelluläre Signalwege und somit auch die molekularen Grundlagen von Erkrankungen zu verstehen.<sup>128</sup> Reproduzierbar und ressourcenschonend können große Mengen an Proben analysiert werden.<sup>127,128</sup> Die gelieferten Informationen zu Ligand-Rezeptor-Bindungen und Signalkaskaden könnten in dieser Art mitunter nicht durch konventionelle Rezeptorbindungs- und Second-Messenger-Assays gewonnen werden. Verwendung finden die Reportergen-Assays in der Grundlagenforschung. Auch werden sie in der Entwicklung neuer Medikamente oder der Überprüfung möglicher toxischer Substanzen eingesetzt.<sup>128</sup>

1. Schritt: Aussäen der Zellen

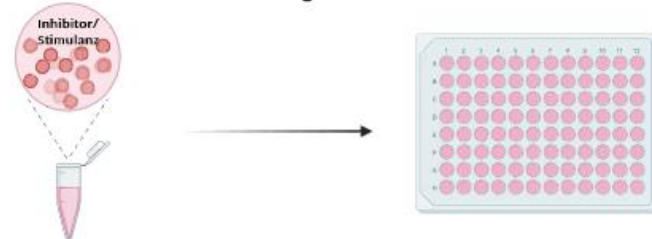


2. Schritt: Transfektion



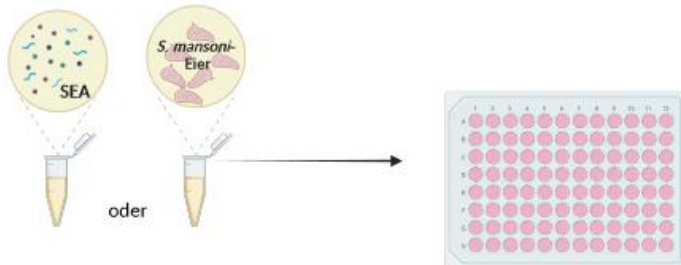
24 Stunden

optional:  
3. Schritt: Inhibition/Stimulierung



24 Stunden

4. Schritt: Stimulierung mit SEA/ SEA-Fraktionen/  
*S. mansoni*-Eiern



30 Minuten

5. Schritt: Messung des Lumineszenzsignals



24 Stunden

Abbildung 7: Arbeitsschritte des Reportergen-Assays. (erstellt mit BioRender)

### 2.2.3.1 Transfektion der SW620-Zellen

Die verwendeten 96-Well Platten wurden wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben vorbereitet. Das Medium wurde abgesaugt und durch 90 µl serumfreies Medium (RMPI -/-, ohne FCS und ohne Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B Mix) ersetzt.

Effekte wie die Zellgesundheit oder -zahl, die Transfektionseffizienz und unspezifische Zellantworten könnten Ergebnisse potentiell beeinflussen. Um eine Verfälschung durch solche Effekte zu minimieren, wurde der Kontrollvektor TK zur Normierung der Werte kotransfiziert. Als weitere Kontrollzellen wurden außerdem auf jeder Platte Zellen nicht transfiziert oder anderweitig bearbeitet. Die Transfektion der übrigen Zellen erfolgte anhand des Lipofectamin™ 3000 Reagenz Protokolls.

#### Mischung 1:

5 µl Opti – MEM™ *pro Well* + 0,6 µl Lipofectamin™ 3000 Reagenz *pro Well*

#### Mischung 2 a:

5 µl Opti – MEM™ *pro Well* + 0,1 µg AP – 1 DNA *pro Well* + 0,1 µg TK DNA *pro Well*

Die Berechnung des benötigten Volumens in µl zum Erreichen von 0,1 µg DNA, erfolgte auf Grundlage der in 2.2.2 bestimmten DNA-Konzentration.

#### Mischung 2 b:

*Mix 2a* + 0,4 µl P3000™ Reagenz *pro Well*

Mischung 1 und Mischung 2 b wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Es folgte eine Inkubation für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurde jedem Well 10 µl des entstandenen Gemischs zugefügt. Es schloss sich eine 24-stündige Inkubation der Zellen bei 37°C an. Am Folgetag wurde das Medium vor der weiteren Bearbeitung abgesaugt.

### 2.2.3.2 Stimulation und Inhibition der SW620-Zellen

Am Versuchstag wurden die Substanzen gemäß Tabelle 12 vorbereitet.

Tabelle 12: Vorbereitung der Inhibitoren/ Stimulanzen

Substanz	Konzentration Stock	Verdünnung in RPMI -/-	Endkonzentration
Akt (Akt 1/Akt 2/Akt 3)-Inhibitor (Capivasertib AZD 5363)	10 mM	1:2000	5 µM
BMS 536924 und Bicalutamide		1:1	BMS 536924: 1 µM Bicalutamide: 1 µM
Dualer IR/IGF1R-Inhibitor (BMS 536924)	10 mM	1: 10000	1 µM
EGFR und PDGFR-Kinase-Inhibitor (AG 18)	100 mM	1:1000	10 µM
Endogener Östrogenrezeptor-Agonist (β-Estradiol)	1 mM	1: 10000	100 nM

Inverser Ghrelin Rezeptor-Agonist (PF-5190457)	10 mM	1:1000	10 µM
MEK 1/2-Inhibitor (U0126)	20 mM	1:2000	10 µM
Nicht-steroidaler Androgenrezeptor-Antagonist (Bicalutamide)	1 mM	1:1000	1 µM
Östrogenrezeptor-Antagonist (ICI 182,780)	1 mM	1: 10000	100 nM
p38 MAP-Kinase-Inhibitor (SB203580)	10 mM	1:1000	10 µM
Reduziertes L-Glutathion (GSH)		3,07 mg: 1000	10 mM
TLR4-Inhibitor (TAK-242)	1 mg/ mL	1:1000	1 µg/ mL

Pro Well wurden 50 µl der jeweiligen Ansätze hinzu pipettiert. Die Stimulanzen und Inhibitoren waren in DMSO gelöst. DMSO wurde 1:1000 in RPMI +/- gelöst. Zur Kontrolle wurde eine Gruppe von Zellen mit 50 µl der entstandenen DMSO-Lösung versetzt. Diese Kontrolle sollte eine Missinterpretation der späteren Analyse ausschließen. So sollten keine Effekte, die schon durch die alleinige Behandlung der Zellen mit Lösungsmittel hervorgerufen wurden, als Ergebnis gedeutet werden. Dann wurden die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank vorinkubiert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde das bei -80°C gelagerte SEA (Dr. Schramm, Stock: 1,52 mg/ mL) aufgetaut. Zur Stimulation wurden pro Well je 0,5 µl SEA hinzugegeben (Endkonzentration 15 µg/ mL). Die Kontroll-Well wurden mit je 0,5 µl PBS versetzt. Es wurde das PBS genutzt, in dem das verwendete SEA gelöst war. Zur weiteren Kontrolle wurde eine Gruppe inhibiert und nur mit PBS stimuliert. Bei der Auswertung erfolgte ein Vergleich zur Kontrollgruppe, die ausschließlich mit den beiden Lösungsmitteln behandelt worden war (PBS + Inhibitor zu PBS+ DMSO). Dieser Vergleich sollte zeigen, ob alleine die Behandlung mit dem Inhibitor/ der Stimulanz schon einen Effekt im AP-1-Reporter-Gen-Assay induziert. In diesem Fall könnte hierzu der potentiell durch SEA-induzierte Effekt unvermindert hinzukommen. So könnte sich ein Ergebnis irrtümlicherweise als signifikante Verminderung des SEA-Effekts präsentieren. (siehe auch Abbildung 26 im Anhang für eine beispielhafte Plattenbelegung)

### 2.2.3.3 SEA-Konzentrationsreihen

Für die Konzentrationsreihen wurde das SEA (SEA 1 = Dr. Schramm (Stock: 1,52 mg/ mL) und SEA 2 = Prof. Grevelding (Stock: 2,66 mg/ mL)) zunächst wie folgt vorbereitet.

Tabelle 13: Vorbereitung Konzentrationsreihe SEA 1

SEA-Konzentration	1 µg/ mL	5 µg/ mL	10 µg/ mL	15 µg/ mL
Verdünnung in RPMI +/-	1: 1500	1: 300	1: 150	1: 100

Tabelle 14: Vorbereitung Konzentrationsreihe SEA 2

SEA-Konzentration	1 µg/ mL	5 µg/ mL	10 µg/ mL	15 µg/ mL
Verdünnung in RPMI -/-	1: 2660	1:531	1: 266	1:177

Pro Well wurden 50 µl der entstandenen Ansätze hinzugefügt. Auch hier diente das zugehörige PBS als Kontrolle. (PBS 1= Dr. Schramm 1:100 in RPMI -/-, PBS 2= Prof. Grevelding 1: 177 in RPMI -/-). (siehe Abbildung 27 im Anhang für eine beispielhafte Plattenbelegung)

#### 2.2.3.4 Stimulation mit nIPSE und HEK-IPSE

Zunächst erfolgte die Hinzugabe von 100 µl frischem RPMI -/- pro Well. Anschließend wurde eine Gruppe an SW620-Zellen mit 15 µg/ mL SEA (Stock: 1,52 mg/ mL) stimuliert. nIPSE (Stock: 0,25 mg/ mL) und HEK-IPSE (Stock: 0,46 mg/ mL) wurden je in einer Konzentration von 5 bzw. 10 µg/ mL verwendet. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem gleichen Volumen PBS versetzt, welches für SEA oder IPSE verwendet wurde.

#### 2.2.3.5 Kokultur mit *Schistosoma mansoni*-Eiern

Auch hier wurden zunächst 50 µl RPMI -/- pro Well hinzugegeben. Dann wurde die gewünschte Anzahl an *S. mansoni*-Eiern (30 bzw. 40) in 50 µl serumfreies Medium aufgenommen und zu den Zellen pipettiert. Als Kontrolle dienten mit 100 µl Medium versetzte Zellen. (siehe Abbildung 28 im Anhang für eine beispielhafte Plattenbelegung)



Abbildung 8: *S. mansoni*-Eier in Kokultur mit SW620-Zellen. (eigene Photographie)

#### 2.2.3.6 SEA-Fraktionen

In jedes Well wurden 50 µl serumfreies Medium (RPMI -/-) pipettiert. Je nach Versuchsaufbau wurden anschließend 5 µl bzw. 50 µl der einzelnen Fraktionen hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Proben, die mit SEA (Endkonzentration 15 µg/ mL) oder PBS stimuliert wurden. Es wurde das SEA beziehungsweise PBS verwendet, das auch zur Herstellung der Fraktionen genutzt worden war. (siehe Abbildung 29 im Anhang für eine beispielhafte Plattenbelegung)

### **2.2.3.7 Durchführung des Assays**

Es erfolgte für alle Versuchsaufbauten eine Inkubation über Nacht im Brutschrank. Am Folgetag wurden zunächst aus jedem Well das vorhandene Medium sowie ggf. die *S. mansoni*-Eier abgesaugt. Es wurde durch 50 µl frisches serumfreies Medium (RPMI -/-) ersetzt. Pro Well wurden 50 µl Luciferase-Reagenz hinzugefügt. Um das lichtempfindliche Reagenz zu schützen, wurde die Platte mit Aluminiumfolie umhüllt. Dann wurde sie zehn Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend konnte im Infinite M Plex-Reader die Firefly-Lumineszenz ausgelesen werden. Das Dual-Glo® Stop & Glo®-Reagenz wurde vorbereitet, indem das mitgelieferte Substrat und der Puffer in einem Verhältnis von 1:100 miteinander vermischt wurden. Es erfolgte die Hinzugabe von 50 µl Dual-Glo® Stop & Glo®- Reagenz pro Well. Die Platte wurde erneut in Aluminiumfolie verpackt und zehn Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde im Infinite M Plex- Reader die Renilla-Lumineszenz gemessen.

### **2.2.4 Bestimmung der Zellviabilität**

Zunächst wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.3.1-5 beschrieben behandelt. Am Folgetag erfolgte das CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (CTG). Dies sollte sicherstellen, dass die erhobenen Ergebnisse auf vitalen Zellen beruhten. Es wurden 100 µl frisches RPMI -/- pro Well hinzugefügt. Zur Zellyse wurden 100 µl CellTiter-Glo®-Reagenz in jedes Well gegeben. Die Platten wurden für zwei Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Das aus den Zellen freigesetzte ATP katalysierte eine Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin. Das Signal des Oxyluciferins konnte nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Infinite M Plex-Reader gemessen werden. Dieses Signal stand so proportional zum ATP-Gehalt der lysierten Zellen. Die Quantifizierung von ATP kann als Indikator für metabolisch aktive Zellen verwendet werden. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und nur mit Medium versetzte Wells.

### **2.2.5 Western Blot Analyse**

Die Western Blot Analyse ist eine semiquantitative Methode, um bestimmte Proteine in einer Probe zu identifizieren. Dazu werden mittels Gelelektrophorese die Proteine nach ihrer Größe und Ladung aufgeteilt. Es folgt die Übertragung auf eine Membran. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wird die Membran mit einer Blockierlösung behandelt. Dann erst erfolgt die Inkubation mit spezifischen Antikörpern. Diese binden an die zu identifizierenden Proteine. Die Verbindung aus Antikörpern und Proteinen kann nun chemisch detektiert werden.

### **2.2.5.1 Gewinnung von Lysaten**

Es wurden 24-Well-Platten wie in 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Am Tag nach der Aussaat der SW620-Zellen wurde das vorhandene Medium durch 500 µl serumfreies Minimalmedium (RPMI -/-) ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden im Inkubationsschrank wurde dieses wiederum durch frische 200 µl des Mediums (RPMI -/-) ersetzt. Pro Well wurden 2,14 µl SEA ( $\cong$  Konzentration von ca. 6 µg/ mL), zur Kontrolle 2,14 µl PBS oder je 20 µl der jeweiligen SEA-Fraktionen hinzugegeben. Verwendet wurden die Fraktionen C1 bis C9. Es erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation. Danach wurde der Überstand an Medium entfernt und die Zellen mit je 500 µl PBS gewaschen. Nun wurden die Proteine aus den Proben extrahiert. Jedem Well wurden 60 µl einfach konzentrierter Lämmli-Puffer hinzugefügt. Eine sterile Pipettenspitze wurde im vorderen Teil gekürzt. Mit der stumpfen Pipette wurden die SW620-Zellen gründlich abgelöst und lysiert. Die entstandenen Proben wurden für zehn Minuten bei 95°C in einem Heizblock erhitzt. Anschließend wurden sie bei -20°C aufbewahrt. Am Versuchstag wurden die Proben für fünf Minuten auf dem Heizblock erwärmt und bei 10 000 g für zehn Sekunden zentrifugiert.

### **2.2.5.2 Proteinseparation durch Gel-Elektrophorese**

Um die Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Diese wird auch SDS-Page genannt. Um etwaige Verunreinigungen zu minimieren, wurden zunächst zwei Glasplatten mit 70-prozentigem Ethanol gesäubert. Sie wurden in den bereitgestellten Elektrodenrahmen eingespannt. Dann wurde das Trenngel gemäß den in Tabelle 4 zu findenden Angaben vorbereitet. Mit der Zugabe der letzten beiden Zutaten, dem Ammoniumpersulfat (APS) und dem Tetramethylethylendiamin (TEMED), wurde die Polymerisation des Trenngels gestartet. Umgehend wurde es zwischen die Glasplatten gegeben. Der obere Teil wurde ausgespart und mit 100-prozentigem Ethanol aufgefüllt. Dies gewährleistete eine ebene Abschlusskante des Trenngels. Das Ethanol konnte nach einer zwanzigminütigen Polymerisationszeit abgegossen werden. Das Trenngel diente bei der folgenden Elektrophorese als eine Art molekulares Sieb. Es folgte eine Spülung mit destilliertem Wasser. Nun wurde auch das Sammelgel gemäß Tabelle 4 vorbereitet und auf das verfestigte Trenngel gegossen. Zur Formung der für die aufzutragenden Proben notwendigen Taschen wurde in das Sammelgel ein Kamm platziert. Dieser konnte nach 20 Minuten entfernt werden. Die Elektrodenrahmen mit dem fertiggestellten Gel wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese wurde mit Elektrophorese-Laufpuffer (s. Tabelle 4) gefüllt. Je 10 µl der in 2.2.5.1 gewonnenen Proben wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Zur Kontrolle wurden 7 µl eines Proteinbandenmarkers (Page Ruler™) verwendet. Dieser

trennt sich in vordefinierte Molekülmassen auf. Nun wurde auch der Elektrodenrahmen mit Puffer gefüllt und die Kammer verschlossen. Zur Auftrennung der Proteine in zwei Gelen wurden in den ersten zehn Minuten 100 V angelegt. Die Proteine erreichten so das Trenngel. Daraufhin wurde die Spannung auf 130 V angepasst. Die Gel-Elektrophorese war beendet, wenn der verwendete Marker das Ende des Gels erreicht hatte. Dies dauerte zirka zwischen 60 und 90 Minuten.

#### **2.2.5.3 Proteintransfer auf eine Trägermatrix**

Es folgte das Blotting der Proteine auf eine Trägermatrix aus Polyvinylidenfluorid. So wurde später die Bindung der Antikörper auf einer stabilen Oberfläche ermöglicht. Um die aufgetrennten Proteine auf die Membran übertragen zu können, musste diese für fünf Sekunden mittels eines Bades in Methanol aktiviert werden. Anschließend wurde die Membran mit destilliertem Wasser gespült. Vorsichtig wurde das verwendete Gel aus seiner Halterung gelöst und das Sammelgel entfernt. Das übrige Gel, sowie die vorbehandelte Membran und vorgelegtes Filterpapier wurden mit Transferpuffer (s. Tabelle 4) befeuchtet. Es wurden je drei Filterpapiere auf der Anodenplatte des Trans-Blot® Turbo™ Systems platziert. Darüber wurden blasenfrei die Membran, das Gel, drei Stück Filterpapier und der Deckel mit der Kathode geschichtet. Für 35 Minuten erfolgte nun bei 60 mA pro Membran das elektrophoretische Blotting. Dabei wanderten die durch das Detergens SDS negativ geladenen Proteine zur Anode.

#### **2.2.5.4 Immunchemischer Nachweis der spezifischen Proteine**

Auf der Membran mussten nun unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Dafür wurde sie für eine Stunde mit einer 5%-Milchpulverlösung (s. Tabelle 4) inkubiert. Die Inkubation in diesem und den folgenden Schritten erfolgte auf einem Kippschüttler. Für je zehn Minuten erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TBS-T (Tabelle 4). Der Nachweis der auf der Membran gebundenen Proteine verlief in zwei Schritten. Zunächst wurden die Primärantikörper laut Tabelle 9 vorbereitet. c-Jun-Antikörper wurde in eine 5%-Milchpulverlösung aufgenommen. Phospho-c-Jun-Antikörper sowie GAPDH-Antikörper wurden in einer 5%-BSA-Lösung (s. Tabelle 4) gelöst. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben mit TBS-T gewaschen. Es schloss sich eine einstündige Behandlung mit einem passenden, in 5%-Milchpulverlösung verdünnten Sekundärantikörper (Tabelle 9) an. An diese Sekundärantikörper war das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelt. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für eine Minute mit HRP-Entwicklerlösung (ECL, enhanced chemiluminescent, s. Tabelle 4) behandelt. Das so zugesetzte Luminol ist ein chemilumineszentes Substrat von HRP. Durch die ebenfalls erfolgte Zugabe von  $H_2O_2$  oxidiert HRP das Luminol. Es entsteht ein angeregtes Produkt, welches Lumineszenz absondert. Die Entwicklung erfolgte im ChemoStar ECL & Fluorescence

Imager®. Dieser ist in der Lage, Chemilumineszenzaufnahmen zu erstellen. Es schloss sich eine densitometrische Auswertung an. Diese erlaubt semiquantitative Rückschlüsse auf die Proteinmenge in den untersuchten Proben. Zur Kontrolle erfolgte für jeden der Western Blots eine Ladekontrolle mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dies sollte sicherstellen, dass in allen Proben die gleiche Proteinmenge vorhanden war und das Expressionslevel zu normalisieren. Dabei wurde GAPDH gewählt, da es in vielen Geweben auf einem hohen Level kontinuierlich exprimiert wird. Es sollte so in allen Proben in gleicher Menge vorliegen und die Banden gleich stark zu detektieren sein. Sollte ein anderer Primärantikörper auf derselben Membran getestet werden, wurde diese für 30 Minuten mit dem Restore™ Western Blot Stripping Puffer behandelt. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer, eine erneute Blockierung der Membran und wiederum dreimaliges Waschen.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Die Lumineszenzwerte im Reporter-Gen-Assay wurden mittels des Infinite M Plex-Readers gemessen. Die Werte wurden mit der Software Tecan i-control™ in Microsoft Excel® übernommen. Es wurde der Mittelwert der Lumineszenzwerte der unbehandelten Kontrollzellen gebildet. Dieser wurde von allen gemessenen Lumineszenzwerten subtrahiert. Zur anschließenden Normierung wurden die Werte des interessierenden Reporters AP-1 (Firefly-Lumineszenz) durch die des Kontrollreporters TK (Renilla-Lumineszenz) dividiert. In den durchgeführten Western Blots wurden Unterschiede in der Expression und Phosphorylierung von c-Jun analysiert. Dazu wurden die Chemilumineszenz-Aufnahmen densitometrisch mittels der Software ImageJ V.1.52e ausgewertet. Um die Ergebnisse mehrerer Western Blot Analysen miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Normierung. Hierzu wurde jeweils der Quotient des fraglichen Wertes und der Summe aller gemessenen Werte gebildet. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Werte ins Verhältnis zu den normierten Werten der Ladekontrolle GAPDH gebracht. So konnten mögliche Ungleichmäßigkeiten beim Auftragen der Proben ausgeglichen werden. Zur einheitlichen Darstellung der Ergebnisse und Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchstage wurden die für SEA beziehungsweise für PBS gemessenen Werte auf 1 gesetzt. Alle anderen Gruppen wurden als Vielfaches dargestellt. Für die Analyse der Zellvitalität wurden für die Ergebnisse des CTG-Mittelwerte gebildet. Die Lumineszenzintensität der Proben wurde mit denen der Kontrollen verglichen. So erhielt man die relative Vitalität der SW620-Zellen. Der Wert der Kontrollzellen wurde als 100 Prozent definiert. Alle anderen Ergebnisse wurden als Vielfaches dargestellt.

Die in den Analysen gewonnenen Daten wurden mittels der Software IBM® SPSS® Statistics Version 29 ausgewertet. Da auf Grund der kleinen Stichprobengröße nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde eine nicht parametrische Auswertung mittels des Kruskal-Wallis-Tests gewählt. Bei dieser Varianzanalyse lautet die Nullhypothese, dass die untersuchten Gruppen der gleichen Population entstammen und sich keine zentralen Unterschiede festmachen lassen. Das Signifikanzniveau lag bei  $p > 0,05$ . Bei einem Wert von  $p \leq 0,05$  wurde die Alternativhypothese angenommen. Diese besagt, dass die Gruppen sich unterscheiden. Die Software führte auch gleichzeitig paarweise Vergleiche und Signifikanzbestimmungen zwischen zwei Gruppen durch. Zur Vermeidung des  $\alpha$ -Fehlers wurde, wenn nicht anders angegeben, die Bonferroni-Holm-Korrektur für multiples Testen angewendet. In Einzelfällen wurde auf Grund des explorativen Charakters der vorliegenden Arbeit auf solch eine Korrektur verzichtet. Der p-Wert wird in dieser Arbeit auf die dritte Nachkommastelle gerundet angegeben.

Die normierten Mittelwerte der Ergebnisse der Viabilitätsanalyse wurden in einem Balkendiagramm präsentiert. Ebenso wurden für die AP-1-Reportergen-Assays der *S. mansoni*-Ei-Kokultur und der SEA-Fractionen verfahren. So ließen sich die zentralen Tendenzen der zu vergleichenden Proben veranschaulichen. Die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Effekte der SEA-Stimulation im AP-1-Reportergen-Assay wurden logarithmiert gezeigt. Dies diente der Darstellung des Wachstumstrends. Die übrigen Ergebnisse der AP-1-Reportergen-Assays und der Western Blot Analysen wurden in Box-Whisker-Plots veranschaulicht. Die Begrenzungen des Blots stehen dabei für das obere und untere Quartil. Die Box selbst stellt somit die mittleren 50 Prozent der Ergebnisse dar. Der Strich innerhalb des Blots entspricht dem Medianwert. Die vom Blot ausgehenden Whisker zeigen jeweils die Extremwerte, also den größten beziehungsweise den kleinsten gemessenen Wert. Durch Punkte und Sternchen werden etwaige Ausreißer aufgezeigt. Unter Ausreißern versteht man deutlich von den übrigen Ergebnissen abweichende Werte.

Es erfolgte eine statistische Beratung durch Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann, Leiter der Abteilung für medizinische Statistik des Instituts für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

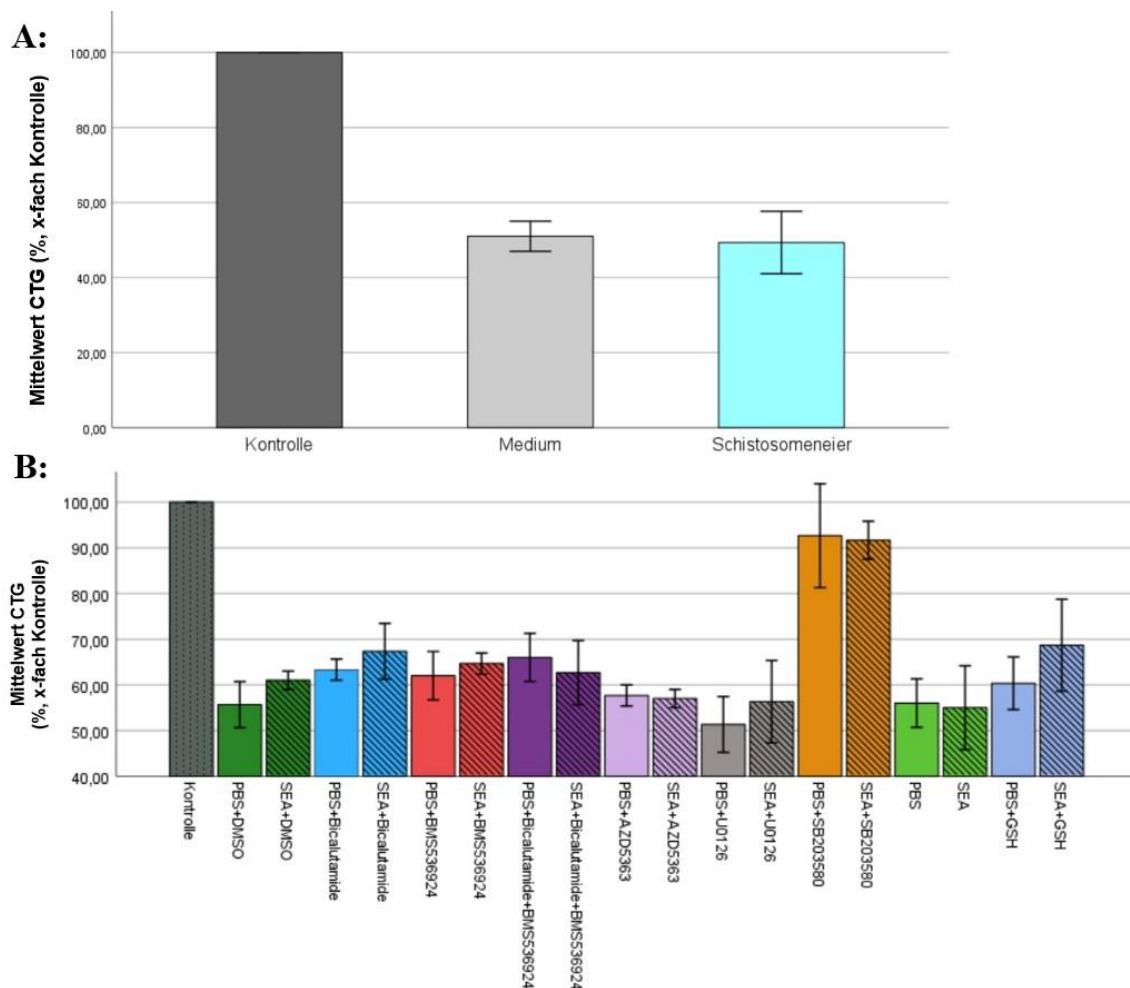
### **2.2.7 Abbildungen**

Die Abbildungen 1, 2, 3, 5, 6, 7, 23, 24 und 25 wurden selbst auf <https://biorender.com> erstellt und über die Laborlizenz der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Roeb exportiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss der Transfektion, Stimulanzen und *S. mansoni*-Eier auf die Vitalität der SW620-Zellen

Für die Versuchsdurchführung des Reportergen-Assays wurden SW620-Zellen mit den AP-1- und TK-Vektoren transfiziert. Je nach Versuchsanordnung wurden sie mit verschiedenen Inhibitoren oder Stimulanzen behandelt. Anschließend erfolgte die Stimulierung mit SEA beziehungsweise Bestandteilen von SEA und *S. mansoni*-Eiern. Mittels eines Viabilitätsassays (Cell titer glow, Promega) wurde überprüft, inwieweit die Zellvitalität durch die verwendeten Substanzen beeinträchtigt wird. So sollte ausgeschlossen werden, dass eine Veränderung der AP-1-Promotoraktivität lediglich durch eine verminderte Zellvitalität bedingt war. Die Zellen wurden zunächst dem Versuchsaufbau des Reportergen-Assays entsprechend behandelt und dann am Folgetag im CTG-Assay analysiert. Eine detailliertere Beschreibung des Versuchs findet sich in 2.2.4.



**Abbildung 9: Einfluss der Transfektion und Stimulanzen auf die Vitalität der SW620-Zellen.** SW620-Zellen wurden am Tag nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen für 24 Stunden mit den verschiedenen Inhibitoren und mit SEA oder PBS behandelt. Anschließend

erfolgte die Analyse mittels des CTG-Assays. Hierbei wird anhand der Messung eines Äquivalents von ATP die Zellviabilität bestimmt. **A)** Keine Verminderung der Zellviabilität durch die Transfektion, Stimulation mit Medium und Kokultur mit *S. mansoni*-Eiern. **B)** Abnahme der Zellviabilität auf ca. 60 % durch die Transfektion und Behandlung mit Lösungsmitteln. Keine weitere Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren und Stimulanzen. **A)** und **B)** n=3. Es erfolgte die Darstellung der relativen Viabilität. Hierfür wurden die jeweiligen CTG-Werte als Vielfaches der Kontrollwerte für die statistische Analyse mittels des Kruskal-Wallis-Test verwendet und als Mittelwerte in einem Balkendiagramm dargestellt. Es wurde die Standardabweichung (+/- 2 SD) abgebildet. Zur Gewährleistung der Übersichtlichkeit sind die p-Werte dem zugehörigen Text zu entnehmen.

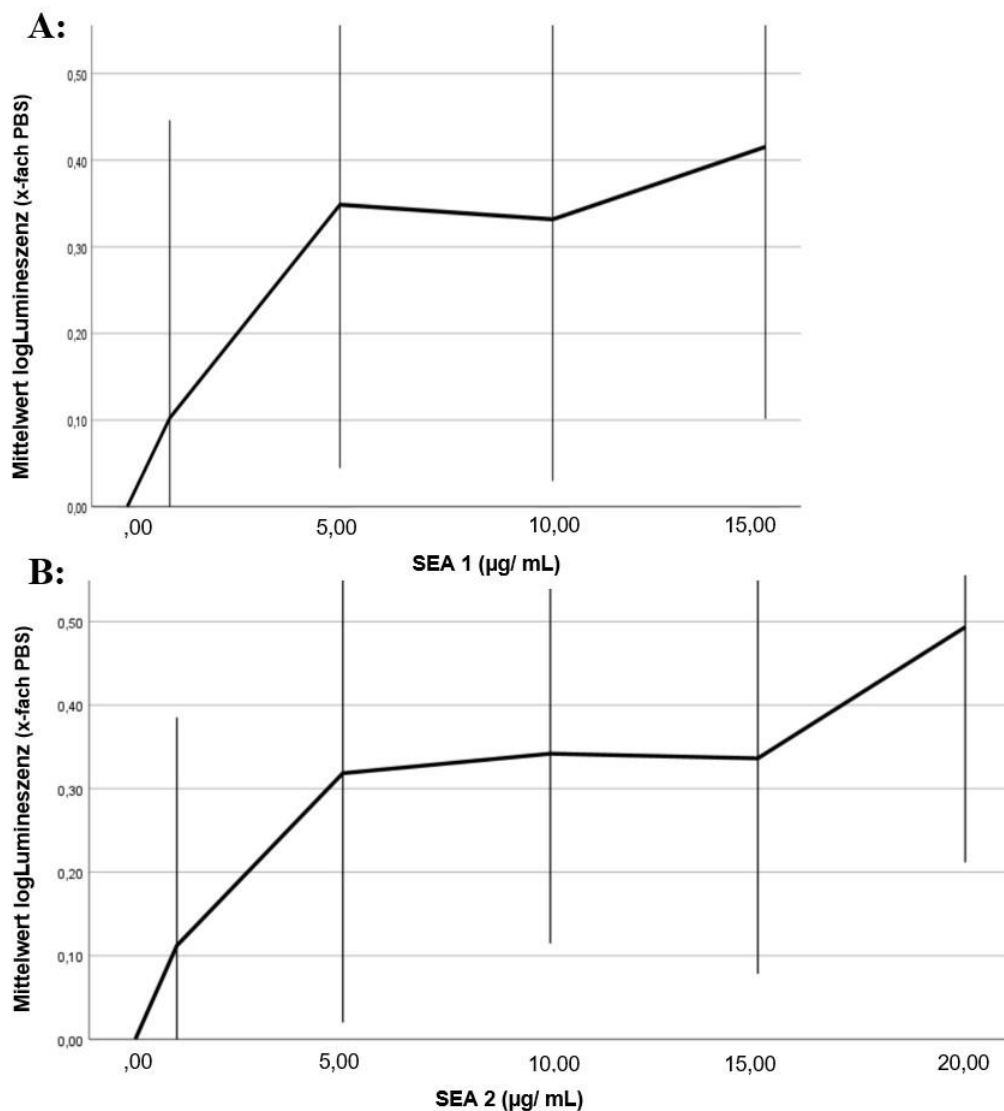
Die Grafiken in Abbildung 9 zeigen den Einfluss von Transfektion, Lösungsmitteln (Medium der Schistosomeneier, DMSO, PBS) und Stimulationsreagenzien (SEA, Schistosomeneier und Inhibitoren) auf SW620-Zellen. Die Werte sind zu den Ergebnissen von unbehandelten SW620-Zellen, die als Kontrolle dienten, in Bezug gesetzt. Abbildung 9 A zeigt, dass sich die Zellvitalität der Kontrollzellen statistisch nicht von der Zellvitalität nach einer Transfektion und Behandlung mit Medium bzw. mit *S. mansoni*-Eiern unterscheidet (p=0,055; Kontrolle zu Medium: p=0,207; Kontrolle zu Schistosomeneiern: p=0,069; Medium zu Schistosomeneiern: 1,000). In Abbildung 9 B zeigt sich, dass die Zellvitalität nach der Transfektion und der Behandlung mit Lösungsmitteln abnimmt (Kontrolle zu PBS + DMSO: p=0,011; Kontrolle zu PBS: p=0,017). Bei der Auswertung des Reporter-Gen-Assays werden die Werte der Kontrollzellen (mit Lösungsmitteln behandelt) mit denen der stimulierten Zellen verglichen. Daher war von Interesse, ob sich durch eine Stimulation die Zellviabilität zusätzlich signifikant reduziert. Im Vergleich zu mit Lösungsmitteln behandelten Zellen zeigt sich hier im Assay eine gleichbleibende Zellviabilität. Zur erleichterten Zuordnung wird hier das gleiche Farbschema für die verschiedenen Inhibitoren und Stimulanzen verwendet, wie in den folgenden Grafiken.

### **3.2 Untersuchung der Auswirkung von *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen auf die AP-1-Promotoraktivität in Kolonepithelzellen**

Für die nun folgenden Auswertungen gilt, dass die SW620-Zellen zur Bestimmung der AP-1-Promotoraktivität mit dem AP-1-Reporter-Gen transfiziert wurden. Zusätzlich erfolgte am nächsten Tag für 24 Stunden, wie in den folgenden Abschnitten jeweils angegeben, eine Stimulation mit SEA, *S. mansoni*-Eiern oder Bestandteilen von SEA. Zur Kontrolle erfolgte eine Stimulation mit dem PBS, in dem das jeweilige SEA gelöst war. Für die Stimulationsversuche mit den *S. mansoni*-Eiern wurde das Medium als Kontrolle verwendet, in dem die Eier aufgenommen worden waren.

### 3.2.1 Konzentrationsabhängige Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit SEA aus verschiedenen *S. mansoni*-Eisolationen

Es wurde untersucht, ob die Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen die AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen induzieren kann. Als Grundlage dienten bereits vorhandene Erkenntnisse aus Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe. In Western Blot Analysen mit SEA stimulierten SW620-Zellen war eine von der SEA-Konzentration abhängige, gesteigerte Expression von c-Jun nachgewiesen worden.<sup>24</sup> c-Jun ist ein möglicher Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1.<sup>96</sup> Auf der Basis dieser Ergebnisse sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob die Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen konzentrationsabhängig durch SEA gesteigert werden kann.



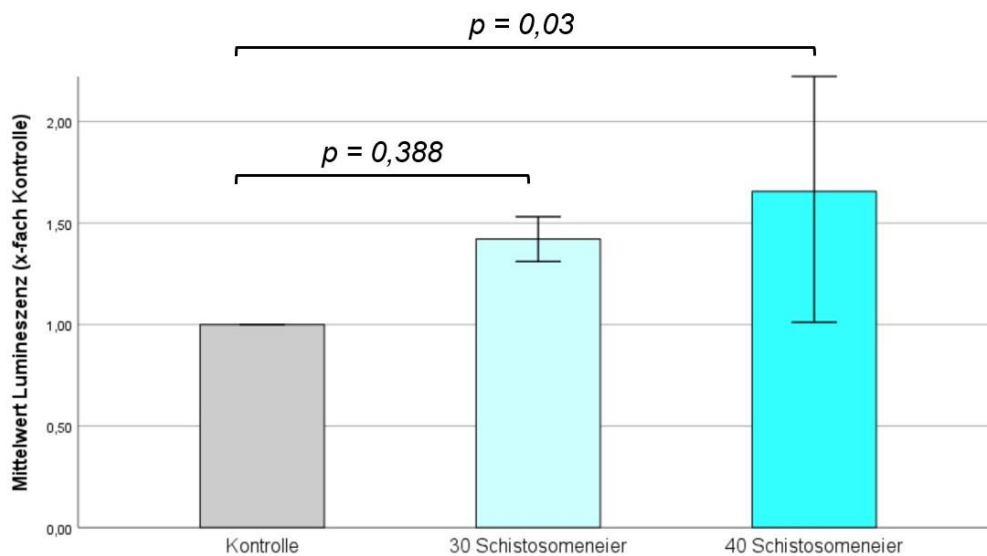
**Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch Stimulation mit unterschiedlichen SEA-Chargen.** SW620-Zellen wurden am Tag nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Chargen von SEA

oder PBS behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter-Gen-Assays. **A)** Konzentrationsreihe mit 1 µg/ mL, 5 µg/ mL, 10 µg/ mL und 15 µg/ mL SEA 1 (n=3). **B)** Konzentrationsreihe mit 1 µg/ mL, 5 µg/ mL, 10 µg/ mL, 15 µg/ mL und 20 µg/ mL SEA 2 (n=3-5). Zur grafischen Darstellung wurden die Mittelwerte der normierten und logarithmierten Lumineszenzwerte abgebildet. Es wurde die Standardabweichung (+/- 2 SD) abgebildet.

Die Grafiken in Abbildung 10 zeigen die konzentrationsabhängige Induktion des AP-1-Promotors durch unterschiedliche SEA-Chargen in SW620-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit SEA aus verschiedenen Chargen stimuliert. Als Kontrolle wurden SW620-Zellen mit PBS behandelt. Die Stimulation mit SEA 1 (Abbildung 10 A) erfolgte in einer Konzentration von 1 µg/ mL, 5 µg/ mL, 10 µg/ mL oder 15 µg/ mL. Die Zellen in Abbildung 10 B wurden mit SEA 2 in den gleichen Konzentrationen behandelt. Zusätzlich wurde für SEA 2 noch eine Konzentration von 20 µg/ mL getestet. Die Ergebnisse des am nächsten Tag erfolgten Reporter-Gen-Assays wurden auf die der Kontrollgruppe (PBS) normiert und als Vielfaches logarithmiert. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte dieser Werte. Für beide SEA-Präparationen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Induktion der AP-1-Promotoraktivität.

### 3.2.2 Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit *Schistosoma mansoni*-Eiern

SEA ist ein Extrakt aus homogenisierten *S. mansoni*-Eiern.<sup>29</sup> Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass SEA in der Lage ist, die AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen konzentrationsabhängig zu induzieren. Anschließend wurde untersucht, ob *S. mansoni*-Eier ebenfalls die AP-1-Promotoraktivität induzieren können.



**Abbildung 11: *S. mansoni*-Eier induzieren die AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen.** SW620-Zellen wurden mit dem AP-1-Reporter-Gen transfiziert und am Folgetag für 24 Stunden mit einer unterschiedlichen Anzahl von *Schistosoma mansoni*-Eiern kokultiviert. Zur Kontrolle erfolgte eine Stimulation mit dem Medium, in das die Schistosomeneier zuvor aufgenommen

worden waren. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reportergen-Assays (n=3). Bei einer Kokultivierung von 40 Schistosomeneiern zeigte sich eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität. Die Mittelwerte der jeweiligen Lumineszenz in Bezug auf die Kontrolle wurden für die statistische Analyse mittels des Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Die p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet. Es wurde die Standardabweichung (+/- 2 SD) abgebildet.

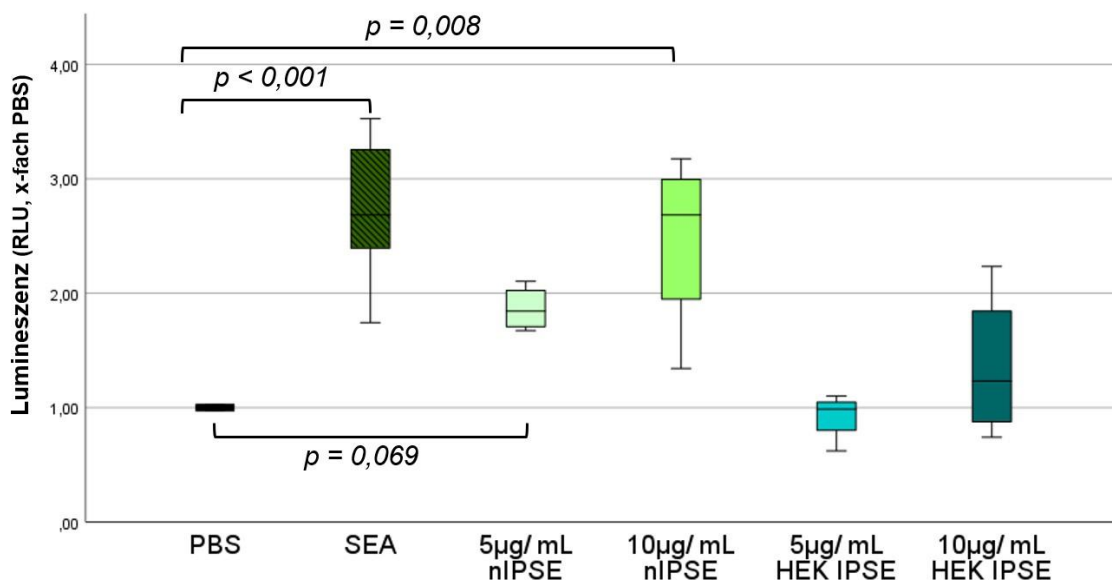
Die Abbildung 11 zeigt die Mittelwerte der im Reportergen-Assay mit SW620-Zellen gemessenen Lumineszenz als Vielfaches der Kontrollwerte. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit 30 beziehungsweise 40 *S. mansoni*-Eiern stimuliert. Zur Kontrolle erfolgte eine Stimulation mit dem Medium, in das die *S. mansoni*-Eier zuvor aufgenommen worden waren. Die sich ergebenden normierten Lumineszenzwerte wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests ausgewertet. Die Mittelwerte wurden graphisch in einem Balkendiagramm dargestellt. Für die gemessene Lumineszenz der Kontrollgruppe und der beiden stimulierten Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p=0,035$ ). Folglich wurde die Nullhypothese, die besagt, dass die Verteilung der Lumineszenz zwischen den Gruppen identisch ist, verworfen. Die Stimulation mit 30 Eiern löste noch keine Induktion der AP-1-Promotoraktivität aus ( $p=0,388$ ). Mittels der Behandlung der SW620-Zellen mit 40 *S. mansoni*-Eiern ( $p=0,030$ ) konnte hingegen eine signifikante Induktion erzielt werden.

### 3.3 Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit Bestandteilen von *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen

Bei SEA handelt es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Glykoproteinen, die sich in ihrer Auswirkung auf den Wirt unterscheiden.<sup>30</sup> Es konnte bereits gezeigt werden, dass SEA eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität auslösen kann. Daher sollte nun untersucht werden, ob auch einzelne Bestandteile des SEA-Gemisches einen Effekt auf die AP-1-Promotoraktivität haben.

#### 3.3.1 Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit IPSE

Ein intensiv erforschter Bestandteil von SEA ist IPSE.<sup>32</sup> Für die Experimente wurde sowohl natürliches (n)IPSE als auch rekombinant hergestelltes HEK-IPSE verwendet.



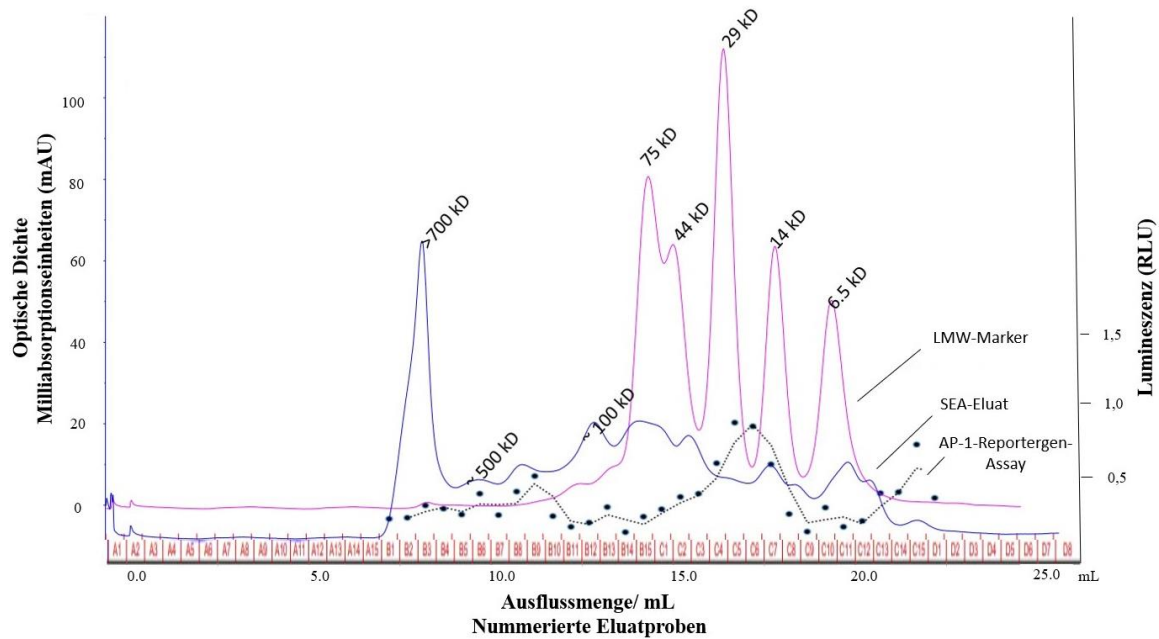
**Abbildung 12: Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch Stimulation mit SEA, nIPSE und HEK-IPSE.** SW620-Zellen wurden am Tag nach der Transfektion mit dem AP-1-Reporter gen für 24 Stunden mit SEA, PBS und verschiedenen Konzentrationen von natürlichem (n)IPSE und rekombinant hergestelltem HEK-IPSE behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter gen-Assays (n=6). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Es wurde auf Grund des explorativen Charakters der Arbeit in diesem Fall auf die Bonferroni-Holm-Korrektur verzichtet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

Die Abbildung 12 zeigt die Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch die Stimulation mit SEA, natürlichem (n)IPSE und HEK-IPSE in SW620-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit 15 µg/ mL SEA, bzw. 5 µg/ mL oder 10 µg/ mL nIPSE oder HEK-IPSE stimuliert. Zur Kontrolle wurde mit dem PBS stimuliert, in dem SEA, nIPSE und HEK-IPSE gelöst waren. Die sich ergebenden Lumineszenzwerte der stimulierten Gruppen wurden als Vielfaches der Kontrollgruppe (PBS) dargestellt. Die

statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Dargestellt wurden die Ergebnisse in einem Box-Whisker-Plot. Für die gemessene Lumineszenz der Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p=0,001$ ). So wurde die Nullhypothese, die besagt, dass die Verteilung der Lumineszenz zwischen den Gruppen identisch ist, verworfen. Im paarweisen Vergleich zwischen PBS und SEA zeigte sich eine signifikante Induktion der AP-1-Promotoraktivität ( $p<0,001$ ). Auch die Stimulation mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nIPSE führte zu einer Induktion der AP-1-Promotoraktivität ( $p=0,008$ ). Auch wenn in der Grafik optische Unterschiede zu erkennen sind, unterschied sich diese nIPSE-bedingte Induktion statistisch nicht von dem SEA-induzierten Effekt ( $p=0,740$ ). Für die Gruppen mit 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nIPSE und 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HEK-IPSE-Behandlung lässt sich jeweils, im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der Grafik eine leichte Induktion der AP-1-Promotoraktivität erkennen. Diese lag jedoch bei der statistischen Auswertung nicht im signifikanten Bereich (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nIPSE:  $p=0,069$ ; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HEK-IPSE:  $p=0,421$ ). Auch bei der Stimulation mit 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HEK-IPSE blieb die AP-1-Promotoraktivität konstant zur Kontrollgruppe ( $p=0,636$ ).

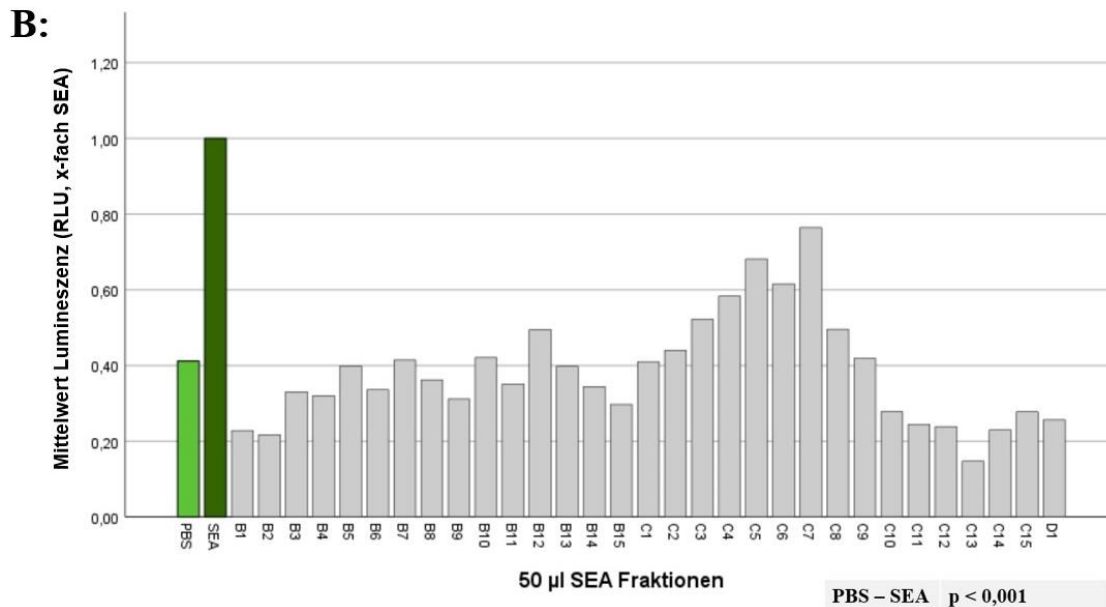
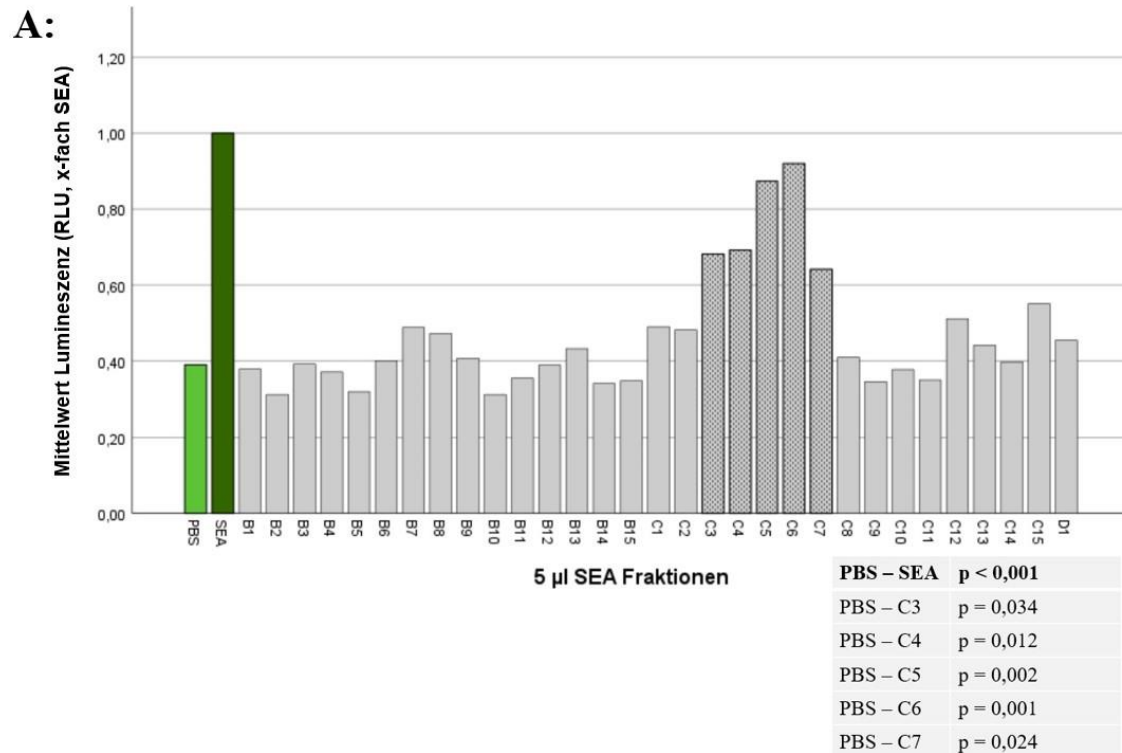
### **3.3.2 Molekülmassen-spezifische Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Stimulation mit fraktionierten *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen**

Die einzelnen Glykoproteine, die von *S. mansoni*-Eiern abgesondert werden, lassen sich auch anhand ihrer Molekülmasse voneinander unterscheiden.<sup>30</sup> SEA wurde für diesen Versuch in der Arbeitsgruppe Dr. Schramm per Größenausschluss-Chromatographie in Fraktionen aufgetrennt. Hierbei werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei zunächst die großen Proteine eluiert werden und anschließend die kleineren. Mittels eines UV-Detektors wird ein Signal erhoben, welches proportional zur Absorption der eluierenden Moleküle ist. Dieses Signal wurde hier in einem Chromatogramm dargestellt. Die Peaks repräsentieren die eluierenden Moleküle. In einem vorherigen Durchlauf wurde ein Marker für die Molekülmasse (LMW-Marker) verwendet. Dadurch war es möglich eine Kalibrierungskurve zu erstellen. Diese erlaubt es, Rückschlüsse von der Eluatfraktion auf die Molekülmasse zu ziehen. Die daraus resultierende Grafik wurde freundlicherweise von Frau Dr. Schramm zur Verwendung in dieser Arbeit freigegeben. Die Abbildung 13 zeigt eine modifizierte Version, die außerdem um unsere Ergebnisse des AP-1-Reporterassays mit stimulierten SW620-Zellen erweitert wurde. Diese Resultate sind im Detail der Abbildung 14 zu entnehmen.



**Abbildung 13: Gegenüberstellung der SEA- und LMW-Marker-Eluationskurven sowie der Ergebnisse des AP-1-Reportergen-Assays.** Die Ergebnisse der Größenausschluss-Chromatographie wurden jeweils in einer Eluationskurve abgebildet. Die Kurve der SEA-Probe wurde in blau dargestellt, die des LMW-Markers in rosa. Auf der Ordinate wurde in Milliabsorptionseinheiten (mAU) die optische Dichte, das Maß für die Absorption, aufgetragen. Auf der Abszisse wurde die Abflussmenge in Millilitern angegeben. Zusätzlich wurden die gewonnenen Eluatproben von A1 bis D8 nummeriert und eingezeichnet. In unserer Arbeitsgruppe wurden SW620-Zellen mit dem AP-1-Reportergen transfiziert und am Folgetag für 24 Stunden mit je 5  $\mu$ l der Fraktionen B1 bis D1 und SEA stimuliert. Die Ergebnisse der anschließenden Analyse mittels des Reportergen-Assays wurden als Vielfaches von SEA in schwarz eingezeichnet. Hierfür ist dieser Grafik eine zweite Ordinate, die die Lumineszenz (RLU) zeigt, hinzugefügt worden. Details zu den Resultaten des Reportergen-Assays wurden in Abbildung 14 dargestellt.

Mittels der SEA-Fractionen sollte untersucht werden, welche in SEA enthaltenen Proteine besonders für die Induktion der AP-1-Promotoraktivität verantwortlich sind.



**Abbildung 14: Einfluss von SEA-Fractionen auf die Induktion des AP-1-Promotors.** SW620-Zellen wurden mit dem AP-1-Reporter gen transfiziert. Am Folgetag wurden sie für 24 Stunden mit SEA, PBS und 31 nach der Molekülmasse aufgetrennten Fraktionen von SEA behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter gen-Assays. **A)** Die Stimulation erfolgte mit SEA (Konzentration von 15 µg/ mL), bzw. 5 µl der jeweiligen Fraktion (n=6). **B)** Die Stimulation erfolgte mit SEA (Konzentration von 15 µg/ mL) bzw. 50 µl der jeweiligen Fraktion (n=3). **A)** und **B)** Die stärkste Induktion des AP-1-Promotors wurde durch die Stimulation mit SEA erreicht. Im Bereich von ca. 36 kDa bis 10 kDa (C3-C7) zeigte sich ebenfalls eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität. Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Es wurde auf Grund des explorativen Charakters der Arbeit in diesem Fall auf die Bonferroni-Holm-Korrektur verzichtet.

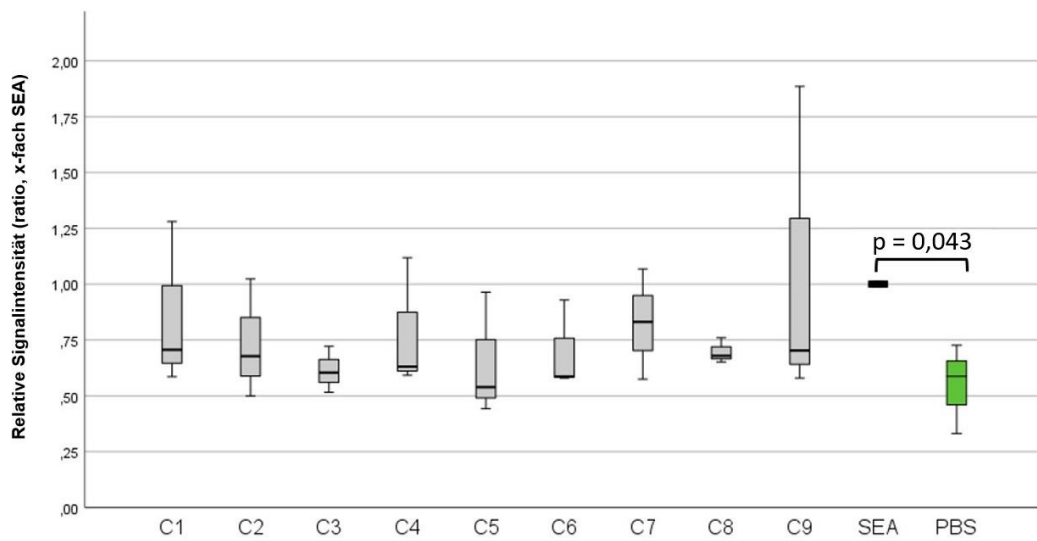
Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Balkendiagramm dargestellt. Zur Gewährleistung der Übersichtlichkeit wurde auf das Einzeichnen der p-Werte verzichtet. Die Balken der SEA-Fractionen, die zu einer signifikanten Induktion der AP-1-Promotoraktivität führten, wurden mittels eines Musters (C3-C7) hervorgehoben. Alle signifikanten p-Werte sind den jeweiligen Tabellen der Abbildungen zu entnehmen.

In der Abbildung 14 ist die Beeinflussung der AP-1-Promotoraktivität durch die Stimulation mit SEA-Fractionen in SW620-Zellen zu sehen. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit SEA oder einer der 31 SEA-Fractionen behandelt. Zur Kontrolle wurde mit PBS stimuliert. Die Ergebnisse der mit SEA-Fractionen oder PBS behandelten Gruppen wurden als Vielfaches der SEA-stimulierten Gruppe dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests mit anschließender Darstellung der Ergebnisse in einem Balkendiagramm.

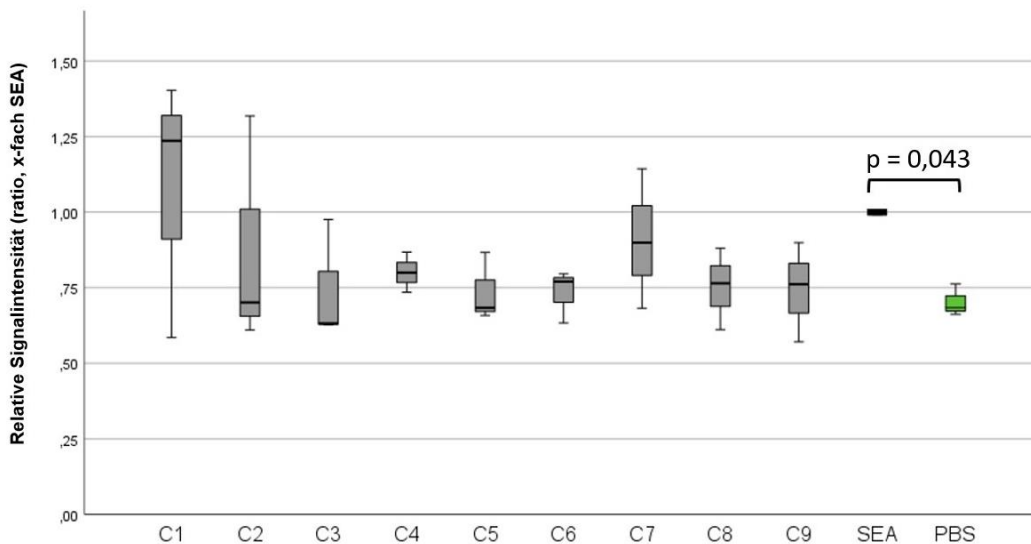
In Abbildung 14 A ist die Auswertung von SW620-Zellen zu sehen, die mit SEA (Konzentration von 15 µg/ mL), beziehungsweise je 5 µl einer der SEA-Fractionen behandelt worden waren. Die Verteilung der Lumineszenz über die Gruppen war nicht identisch ( $p < 0,001$ ). Wie auch zuvor führte die Stimulation der SW620-Zellen mit SEA im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Induktion der AP-1-Promotoraktivität ( $p < 0,001$ ). Auch für die Gruppen C3 bis C7 ergab sich eine signifikante Veränderung der AP-1-Promotoraktivität. (C3 ( $p = 0,034$ ), C4 ( $p = 0,012$ ), C5 ( $p = 0,002$ ), C6 ( $p = 0,001$ ), C7 ( $p = 0,024$ )). Trotz des Anscheins in der Grafik unterschieden sich diese SEA-Fractionen statistisch nicht von dem SEA-induzierten Effekt. Die Molekülmassen dieser Fractionen lagen zwischen zirka 36 kDa (C3) und 10 kDa (C7). Die übrigen Fractionen ergaben hingegen keine signifikante Induktion der AP-1-Promotoraktivität.

Die Abbildung 14 B zeigt die Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen, die mit SEA (Konzentration von 15 µg/ mL) beziehungsweise je 50 µl der Fractionen stimuliert worden waren. Auch hier wurde die Nullhypothese verworfen, die Verteilung über die Gruppen unterschied sich signifikant ( $p < 0,001$ ). Im paarweisen Vergleich induzierte SEA die AP-1-Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,021$ ). In der Grafik 14 B lässt sich für die Fractionen C3 bis C7 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine leichte Induktion der AP-1-Promotoraktivität erkennen. Diese befand sich in der statistischen Auswertung nicht im signifikanten Bereich. Es bestand jedoch auch kein statistischer Unterschied zur SEA-stimulierten Gruppe. Trotz einer zehnfach höheren Konzentration bewirkte die Stimulation mit 50 µl-Fractionen (Abbildung 14 B) - auch im direkten Vergleich ohne eine Darstellung als x-faches von SEA - eine weniger hohe Induktion der AP-1-Promotoraktivität als die Stimulation mit 5 µl-Fractionen (Abbildung 14 A).

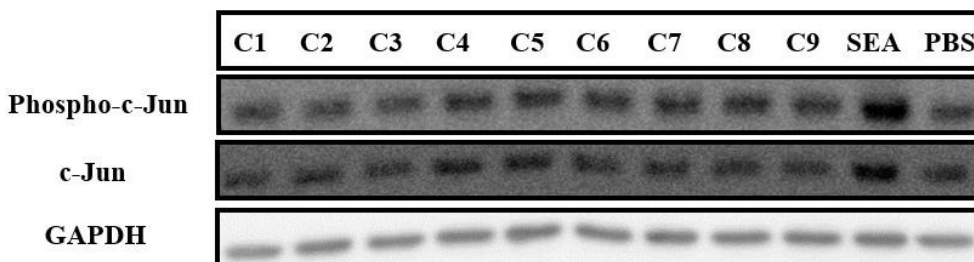
### A: Phospho-c-Jun/ GAPDH



### B: c-Jun/ GAPDH



### C:



**Abbildung 15: Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von c-Jun nach 24-stündiger Stimulation mit SEA und SEA-Fractionen.** c-Jun ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1. Mittels einer Phosphorylierung wird c-Jun zu aktiviertem Phospho-c-Jun.<sup>94</sup> SW620-Zellen wurden für 24 Stunden mit 2,14 µl SEA (Konzentration von 6 µg/ mL), PBS oder jeweils 20 µl der SEA-Fractionen stimuliert. Es wurden u.a. die Fractionen untersucht, die im Reporteragen-Assay eine Induktion erzielten. Anschließend wurden die Zelllysate mittels Western Blot Analysen auf ihre c-Jun-Proteinexpression und -Aktivierung untersucht. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. **A)** und **B)** Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von c-Jun und der c-Jun-Expression in SEA-stimulierten Zellen. Die

Stimulation mit den Fraktionen C1 bis C9 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Expression und Aktivierung von c-Jun. Es erfolgte eine densitometrische und statistische Auswertungen der Western Blot Analysen. Verwendet wurde der Kruskal-Wallis-Test. Es wurde auf Grund des explorativen Charakters der Arbeit in diesem Fall auf die Bonferroni-Holm-Korrektur verzichtet. Die Ergebnisse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Signifikante p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet. **C)** Western Blot mit Phospho-c-Jun, c-Jun und der zugehörigen Ladekontrolle GAPDH (n=3, gezeigt wird ein repräsentativer Western Blot). Mit Hilfe des mitgeführten Proteinmarkers konnten die Proteine abgelesen werden: c-Jun und Phospho-c-Jun jeweils bei 48 kDa, GAPDH bei 35 kDa.

Um die Ergebnisse des Reportergen-Assays (Abbildung 14) auf Proteinebene zu verifizieren, erfolgte eine Western Blot Analyse. Hierzu wurden SW620-Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 6 µl/ mL), PBS oder 20 µl SEA-Fraktion (C1-C9) stimuliert. Mittels einer Phosphorylierung wird c-Jun zu aktiviertem Phospho-c-Jun, transloziert in den Kern und aktiviert dort die Genexpression von Zielgenen.<sup>89,94,96</sup> Die Abbildung 15 C zeigt die Western Blot Analysen der Expression und Phosphorylierung von c-Jun. Die Ergebnisse wurden densitometrisch ausgewertet, normiert und als Vielfaches der SEA-stimulierten Gruppe analysiert (Abbildung 15 A und B). Es wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Anschließend erfolgte die Darstellung in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm.

Weder die Phosphorylierung von c-Jun, noch die Expression war über die jeweiligen Gruppen identisch, weshalb die Nullhypothesen abgelehnt wurden. Durch die Stimulation mit SEA zeigte sich eine signifikant erhöhte Phosphorylierung von c-Jun ( $p=0,043$ ). Auch ergab sich eine signifikant erhöhte Expression von c-Jun durch SEA im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $p=0,043$ ). Für die mit den SEA-Fraktionen stimulierten Gruppen unterschied sich die Expression und die Phosphorylierung von c-Jun nicht, also weder im Vergleich zu den SEA-stimulierten Zellen noch zu den PBS-stimulierten Kontrollen. Die hohen Standardabweichungen in den einzelnen Fraktionen waren hier sicher ein ungünstiger Faktor.

### **3.4 Wachstums- und Hormonrezeptoren beeinflussen die durch *Schistosoma mansoni*-Eiantigene induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen**

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits in Kolonzellen aktivierte Signalwege nach einer Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen aufgezeigt werden.<sup>24</sup> Aus diesen Ergebnissen und denen dieser Arbeit resultierte die Frage, inwieweit Wachstums- und Hormonrezeptoren die SEA-vermittelten Effekte in Enterozyten beeinflussen könnten. Dieser Frage wurde sich mittels eines Screenings angenähert. Für alle Versuche des Screenings und die spätere weitere Untersuchung der dort identifizierten Rezeptoren wurde ein einheitliches Vorgehen gewählt. Die SW620-Zellen wurden mit dem AP-1-Reporter gen und mit dem TK-Kontrollvektor transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 30 Minuten mit den angegebenen Inhibitoren

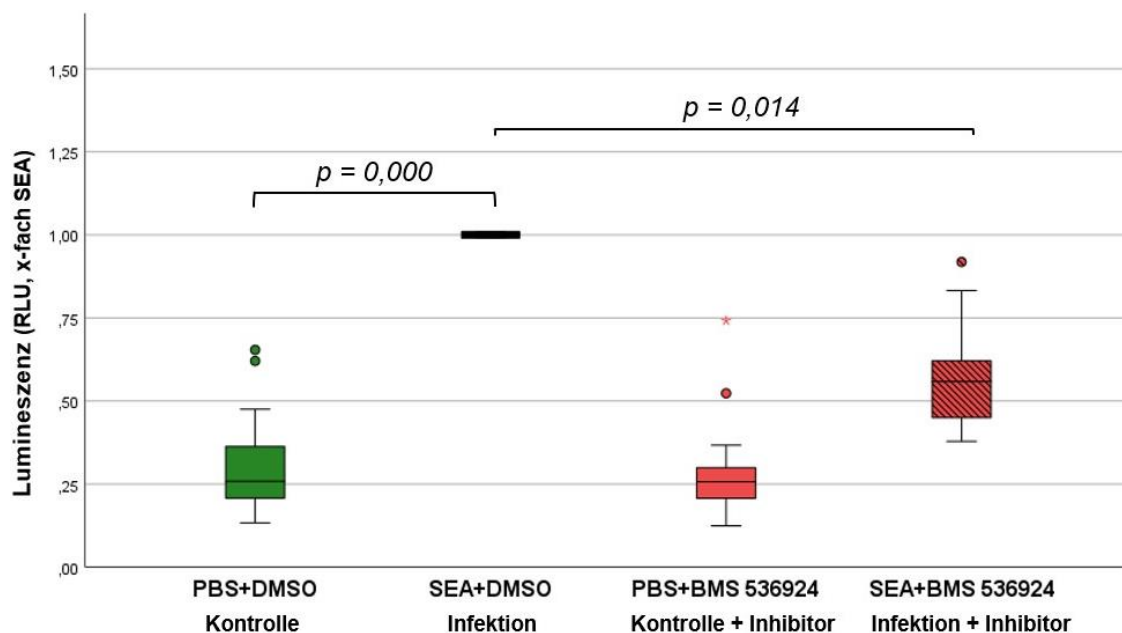
oder Stimulanzen vorinkubiert. Die Inhibitoren waren jeweils in dem Lösungsmittel DMSO gelöst. Um auszuschließen, dass dieses einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte, wurden zur Kontrolle SW620-Zellen für 30 Minuten mit der gleichen Menge DMSO vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA in einer Konzentration von 15 µg/ mL stimuliert. Die Kontrollzellen wurden mit PBS behandelt. Eine weitere Kontrollgruppe wurde nur mit dem Inhibitor und PBS behandelt. So sollte gewährleistet werden, dass ein gemessener Effekt wirklich eine Inhibitorbedingte Beeinflussung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität darstellt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass bereits in unstimulierten Zellen das Signal durch den Inhibitor signifikant verändert wurde. Daraus ergaben sich folgende vier Gruppen: eine Kontrollgruppe, die mit PBS und DMSO behandelt worden war, eine mit SEA und DMSO stimulierte Gruppe, eine mit PBS und dem Inhibitor und eine mit SEA und dem Inhibitor behandelte Gruppe. Am nächsten Tag erfolgte die Durchführung des Reportergen-Assays. Die hier gemessenen Werte wurden auf die SEA + DMSO-Gruppe normiert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte jeweils mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Die Nullhypothese lautete, dass die Verteilung über die Gruppen identisch ist. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird durch eine Vielzahl von extrazellulären Signalen, wie Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zytokinen oder ROS, angesprochen.<sup>95,96</sup> Mittels einer Literaturrecherche wurden Wachstums- und Hormonrezeptoren identifiziert, die von den genannten extrazellulären Signalen aktiviert werden bzw. den Transkriptionsfaktor AP-1 oder MAPK-Signalwege induzieren. Da über einen Zusammenhang einer Schistosomiasis und der Entstehung von KRK diskutiert wird,<sup>80</sup> wurden auch in der Karzinogenese involvierte Rezeptoren in Betracht gezogen.

Es erfolgte ein Screening mit verschiedenen Inhibitoren und Stimulanzen. Verwendet wurden ein endogener Östrogenrezeptor-Agonist, der Östrogenrezeptor-Antagonist ICI 182,780, der inverse Ghrelin Rezeptor-Agonist PF-5190457, der EGFR und PDGFR-Kinase-Inhibitor AG 18 und der TLR4-Inhibitor TAK-242. Hier ließ sich durch die Inhibition oder Stimulation keine veränderte Induktion der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität feststellen. Die genauen Endkonzentrationen der verwendeten Substanzen und die resultierenden Ergebnisse sind der Abbildung 30 im Anhang zu entnehmen. Es konnten zwei weitere Inhibitoren, BMS 536924 und Bicalutamid, identifiziert werden, die zu einer signifikanten Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität führten. Die folgenden Grafiken zeigen deren Ergebnisse der AP-1-Reportergen-Analysen in SW620-Zellen.

### 3.4.1 Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung des Insulinrezeptors/ Insulin-like growth factor 1-Rezeptors

Die IR/ IGF1R-Signalkaskade steht sowohl mit metabolischen Prozessen als auch mit der Entstehung von Neoplasien in Verbindung.<sup>112,131</sup> Nach Bindung der Liganden Insulin beziehungsweise IGF-1 an den IR/IGF1R erfolgt die Aktivierung der entsprechenden Rezeptor-Tyrosinkinasen. Unter anderem wird somit über eine Induktion der MAP-Kinase-Signalkaskade der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert.<sup>101,112</sup> Im Folgenden wurde untersucht, ob der IR/ IGF1R an der *S. mansoni*-Eiantigen-bedingten Induktion des AP-1-Promotors beteiligt ist. Hierzu wurden AP-1-Reporter-gen-transfizierte SW620-Zellen in Gegenwart von SEA mit dem IR/ IGF1R Inhibitor BMS 536924 behandelt.



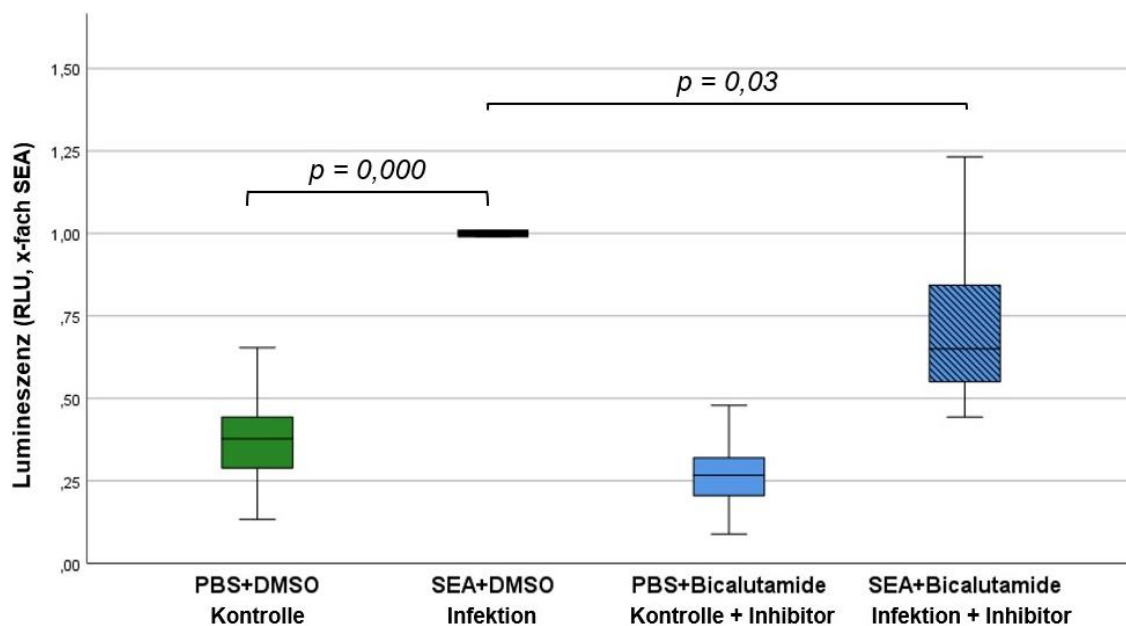
**Abbildung 16: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition des Insulinrezeptors/ Insulin-like growth factor 1-Rezeptors.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reporter-gen mit 1  $\mu$ M des dualen IR/IGF1R-Inhibitors BMS 536924 behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15  $\mu$ l/ mL; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter-gen-Assays (n=6). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

Die Abbildung 16 zeigt den Einfluss des Insulin-/ IGF-1-Rezeptor-Inhibitors BMS 536924 auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität. Für die Verteilung der gemessenen Lumineszenz über die Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p=0,000$ ), weshalb die Nullhypothese verworfen wurde. Im paarweisen Vergleich zwischen PBS und SEA zeigte sich eine signifikante Induktion der AP-1-Promotoraktivität ( $p=0,000$ ). Dieser durch SEA erzielte Effekt konnte signifikant durch

die Behandlung mit dem IR/ IGF1R-Inhibitor BMS 536924 vermindert werden ( $p=0,014$ ). BMS 536924 alleine (PBS + BMS 536924) führte im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS + DMSO) nicht zu einer veränderten Induktion der AP-1-Promotoraktivität ( $p=0,701$ ). Somit konnte sichergestellt werden, dass der gemessene Wert eine Beeinflussung des SEA-induzierten Effekts ist. Der SEA-induzierte Effekt konnte derweil interessanterweise nicht komplett durch die Inhibition aufgehoben werden. So zeigte sich weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen der mit SEA und dem Inhibitor behandelten Gruppe (SEA + BMS 536924) und der Kontrollgruppe (PBS + BMS 536924) ( $p=0,008$ ).

### 3.4.2 Verminderte Induktion der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung des Androgenrezeptors

Es wird über eine Rolle des Androgenrezeptors (AR) in der Entstehung von Malignomen diskutiert.<sup>117,121</sup> Darüber hinaus steht der AR über die MAPK-Kaskade im Zusammenhang mit dem AP-1-Transkriptionsfaktor. Der MAPK-Signalweg verbindet den AR zu bereits in der AG Roeb analysierten Effekten von *S. mansoni*-Eiantigenen im Kolonepithel.<sup>24,120</sup>

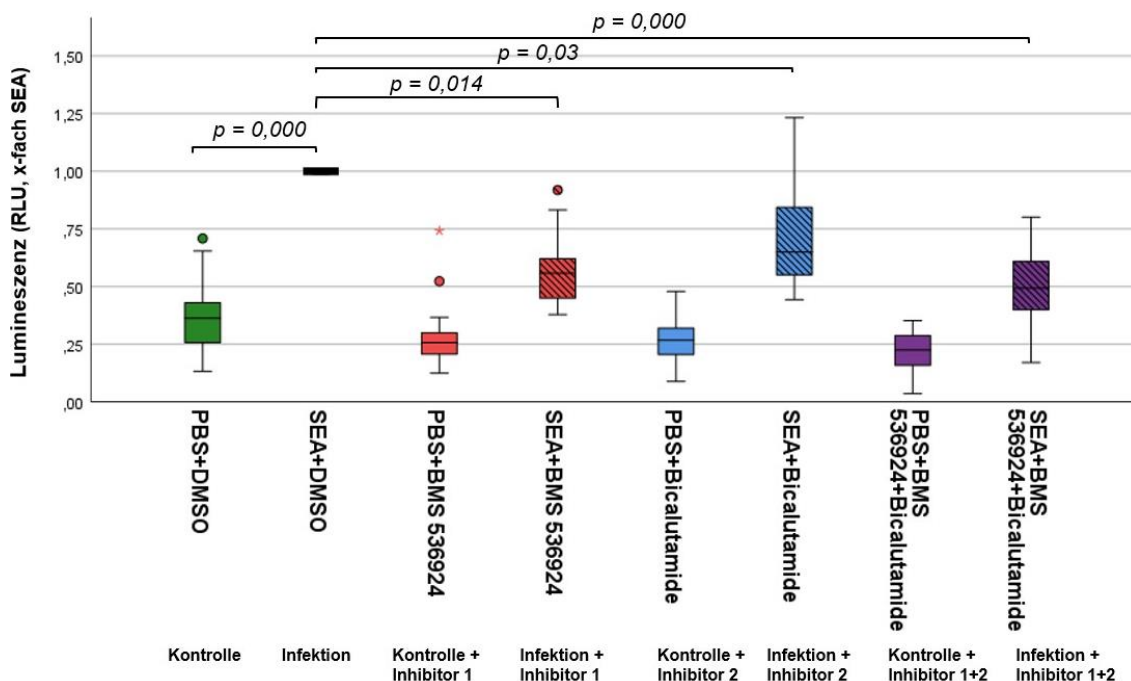


**Abbildung 17: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition des Androgenrezeptors.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reporter gen mit  $1 \mu\text{M}$  des nicht-steroidalen Androgenrezeptor-Antagonisten Bicalutamide behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von  $15 \mu\text{l/ mL}$ ; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“). Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter gen-Assays ( $n=9$ ). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

Die Abbildung 17 zeigt den Einfluss des nicht-steroidalen Androgenrezeptor-Antagonisten Bicalutamide auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität. Die Verteilung der Lumineszenz war über die Gruppen nicht identisch ( $p=0,000$ ). Die Nullhypothese wurde abgelehnt. Es folgten paarweise Vergleiche. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch SEA ( $p=0,000$ ). Diese Induktion konnte durch die Verwendung von Bicalutamide signifikant vermindert werden ( $p=0,030$ ). Auch in diesem Fall konnte durch die Verwendung von Bicalutamid die SEA-ausgelöste AP-1-Promotoraktivität nicht vollständig inhibiert werden. Es wurde weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen der mit SEA und Bicalutamide behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (PBS + Bicalutamide) festgestellt ( $p=0,000$ ). Im Vergleich der beiden Kontrollgruppen (PBS + DMSO und PBS + Bicalutamid) fand sich keine veränderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität ( $p=0,651$ ).

### 3.4.3 Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch kombinierte Inhibition des Insulin-/ IGF-1- und des Androgenrezeptors

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des IR/IGF1R und des AR zu einer Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen führte. Jedoch führte keiner der beiden Inhibitoren zu einer vollständigen Inhibition der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität (Abbildungen 16 und 17). Daraus ergab sich die Frage, ob die kombinierte Inhibition beider Rezeptoren synergistisch wirkt und die SEA-vermittelte Induktion der AP-1-Promotoraktivität vollständig inhibieren kann.



**Abbildung 18: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition des Insulin-/ IGF-1-Rezeptors und des Androgenrezeptors.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen mit sowohl 1  $\mu$ M des dualen IR/IGF1R-Inhibitor BMS 536924 als auch 1  $\mu$ M des nicht-steroidalen Androgenrezeptor-Antagonisten Bicalutamide behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel der Inhibitoren. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15  $\mu$ l/ mL; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“). Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter-gen-Assays (n=7). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

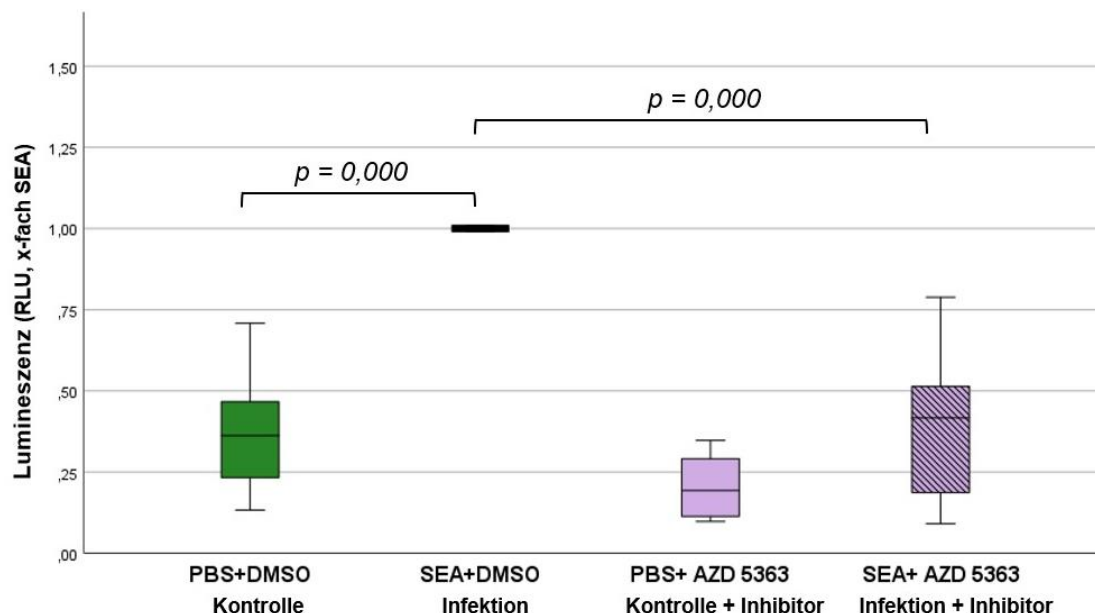
Die Abbildung 18 zeigt den Einfluss des dualen IR/IGF1R-Inhibitors BMS 536924 und des nicht-steroidalen Androgenrezeptor-Antagonisten Bicalutamide auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität. Die Nullhypothese wurde abgelehnt, da die Verteilung der Lumineszenz über alle Gruppen nicht identisch ( $p < 0,001$ ) war. Im paarweisen Vergleich wurde zunächst die Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch SEA verifiziert ( $p = 0,000$ ). Die kombinierte Inhibition mit BMS 536924 und Bicalutamide konnte die SEA-vermittelte Induktion der AP-1-Promotoraktivität mit einem kleineren p-Wert als in den Vorexperimenten vermindern ( $p = 0,000$ ). Die beiden Kontrollgruppen (PBS + DMSO und PBS + BMS 536924 + Bicalutamid) unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p = 0,357$ ), was sicherstellte, dass die Inhibitoren tatsächlich den SEA-Effekt verminderten. Auch durch die Kombination der beiden Inhibitoren ließ sich die SEA-vermittelte AP-1-Promotoraktivität nicht vollständig aufheben. Im Vergleich der inhibierten und SEA-stimulierten Zellen (lilafarbener, schraffierter Balken) zu der nur inhibierten Gruppe (lilafarbener Balken) zeigten sich weiterhin signifikante Unterschiede ( $p = 0,004$ ). Optisch lässt sich in der Grafik für die zweifach inhibierte, SEA-stimulierte Gruppe (lilafarbener, schraffierter Balken) im Vergleich zu den einfach inhibierten, SEA-stimulierten Gruppen (BMS 536924: roter, schraffierter Balken, Bicalutamide: blauer, schraffierter Balken) eine weitere Verminderung der AP-1-Promotoraktivität erkennen. Diese befand sich in der statistischen Auswertung nicht im signifikanten Bereich. (SEA+ BMS 536924 + Bicalutamide zu SEA (lila) zu SEA + BMS 536924 (rot):  $p = 1,000$ ; SEA + BMS 536924 + Bicalutamide (lila) zu SEA + Bicalutamide (blau):  $p = 0,867$ ).

### 3.5 Kinasen beeinflussen die *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen

Die Versuche wurden wie in 3.4 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Statt der Inhibition verschiedener Rezeptoren erfolgte nun die Inhibition spezifischer Kinasen. Dabei wurden Kinasen ausgewählt, die einerseits mit der Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors und andererseits mit dem Insulin-/ IGF-1- und dem Androgenrezeptor in Zusammenhang stehen. Die Grafiken zeigen jeweils die Ergebnisse der AP-1-Reportergen-Analyse in SW620-Zellen.

#### 3.5.1 PI3K/Akt-Signalweg: Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung der Akt 1/2/3-Kinase

Die Aktivierung des IR/ IGF1R induziert unter anderem die PI3K/Akt-Signalkaskade.<sup>113</sup> Die Akt-Kinase ist im genomischen und nicht-genomischen Signalweg des AR in dessen Aktivierung involviert oder wird durch diesen aktiviert.<sup>120</sup> Des Weiteren fördert die Akt-Kinase die Bindung von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie an passende DNA-Sequenzen. Dies ist entscheidend für die Funktionalität der Transkriptionsfaktoren.<sup>115</sup> Die Akt-Kinase ist vielfältig in verschiedene zelluläre Prozesse involviert, die unter anderem das Überleben und die Proliferation von maligne entarteten Zellen begünstigen.<sup>102</sup> In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Akt-Kinase auch bei der *S. mansoni*-Eiantigen-induzierten Induktion der AP-1-Promotoraktivität beteiligt ist.



**Abbildung 19: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition der Akt 1/2/3-Kinase.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen mit 5  $\mu$ M des Akt 1/2/3-Inhibitors Capivasertib AZD 5363 behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15  $\mu$ l/ mL; =

„Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter-Gen-Assays (n=5). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

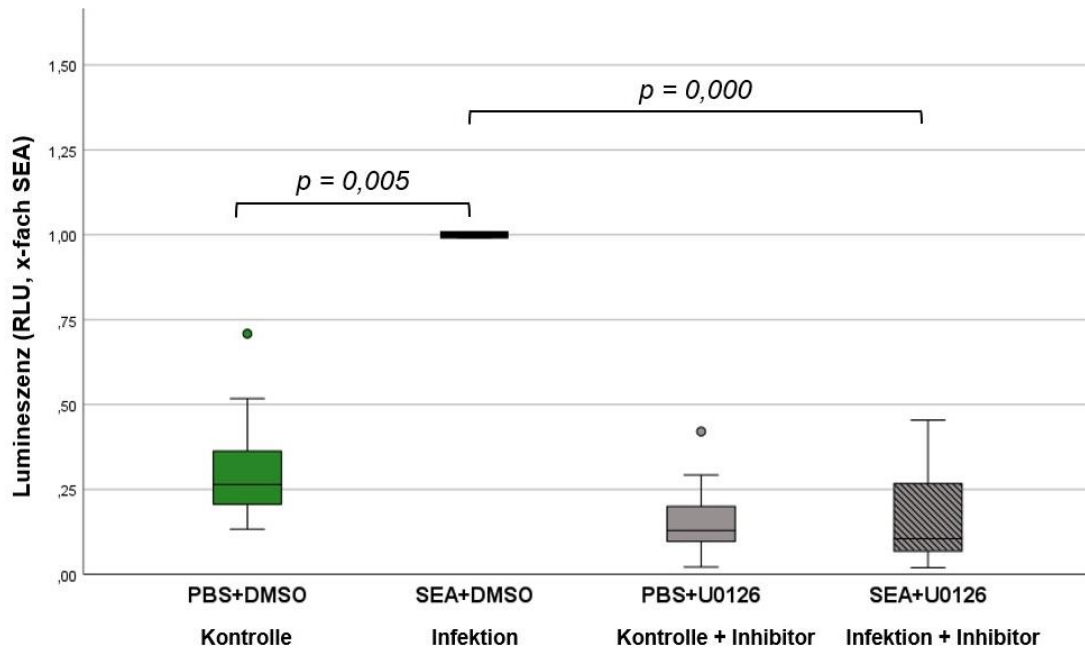
In Abbildung 19 ist der Einfluss des Akt 1/2/3-Inhibitors Capivasertib AZD 5363 auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität zu sehen. Die Verteilung der Lumineszenz über die vier Gruppen stellte sich als nicht identisch ( $p=0,000$ ) heraus. So wurde die Nullhypothese abgelehnt. Im Anschluss wurden paarweise Vergleiche unternommen. Ausgangslage war wieder die Bestätigung, dass SEA im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Induktion der AP-1-Promotoraktivität bewirkt ( $p=0,000$ ). Diese Induktion konnte durch die Verwendung von AZD 5363 signifikant vermindert werden ( $p=0,000$ ). Die beiden Kontrollgruppen (PBS + DMSO und PBS + AZD 5363) unterschieden sich derweil nicht ( $p=0,339$ ). Interessanterweise gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PBS + AZD 5363) und den inhibierten und SEA-stimulierten Zellen ( $p=0,395$ ).

### **3.5.2 MAP-Kinase-Signalkaskaden**

Ist eine Zelle extrazellulären Stimuli ausgesetzt, so wird der Transkriptionsfaktor AP-1 mitunter über die MAP-Kinase-Signalkaskaden JNK, ERK und p38 aktiviert.<sup>94</sup> Diese Signalkaskaden werden ebenfalls aktiviert nachdem der IR/ IGF1R angesprochen wird.<sup>113</sup> Auch in der Aktivierung des AR spielen sie eine Rolle.<sup>120</sup>

#### **3.5.2.1 Verminderte Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch Inhibierung der MEK 1/2-Kinase**

Über den Ras-Raf-Signalweg wird die MEK 1/2-Kinase aktiviert. Diese führt wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK und schlussendlich zur Aktivierung von AP-1.<sup>94</sup> Bei der Reaktion auf Wachstumsfaktoren ist ERK der wichtigste Mediator.<sup>97</sup> Eine Involvierung von MEK 1/2 bei der zellulären Antwort auf *S. mansoni*-Eiantigene wurde in der AG Roeb bereits in Western Blot Analysen gezeigt.<sup>24</sup> In dieser Arbeit sollte nun mittels des neu etablierten Reporter-Gen-Assays die Rolle der Kinase MEK 1/2 bei einer SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität untersucht und quantifiziert werden.

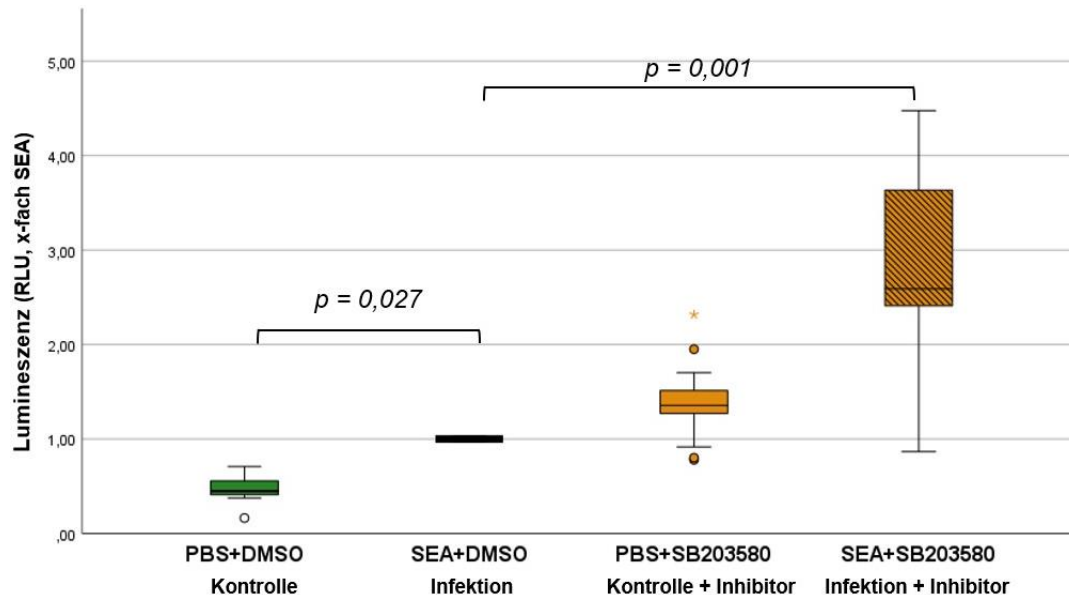


**Abbildung 20: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition der MEK 1/2-Kinase.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reporter gen mit 10  $\mu$ M des MEK 1 und 2-Inhibitors U0126 behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15  $\mu$ l/ mL; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reporter gen-Assays (n=5). Die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Test. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

Die Abbildung 20 zeigt den Einfluss des MEK 1/2-Inhibitors U0126 auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität. Die Nullhypothese wurde abgelehnt. Die Verteilung der Lumineszenz war nicht identisch ( $p=0,000$ ). Die signifikante Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch SEA ( $p=0,005$ ) konnte durch die Behandlung mit dem MEK 1/2-Inhibitor vermindert werden ( $p=0,000$ ). Zur Kontrolle erfolgte die Bestätigung, dass sich die beiden Kontrollgruppen (PBS + DMSO und PBS + U0126) nicht bereits signifikant voneinander unterschieden ( $p=0,243$ ). Hervorzuheben ist, dass auch in diesem Fall der SEA-induzierte Effekt so weit inhibiert wurde, dass sich die zusätzlich stimulierte Gruppe (SEA + U0126) nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe (PBS + U0126) unterschied ( $p=1,000$ ).

### 3.5.2.2 Synergistische Induktion der AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen durch SEA und gleichzeitige Inhibition der p38 MAP-Kinase

Die Rolle der p38 MAPK wird unterschiedlich bewertet. Es wird diskutiert, ob sie je nach Umstand die Tumorprogression begünstigt oder einschränkt.<sup>102</sup> In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welcher Weise die p38 MAP-Kinase einen Einfluss auf die SEA-vermittelte AP-1-Promotoraktivität in Enterozyten hat.

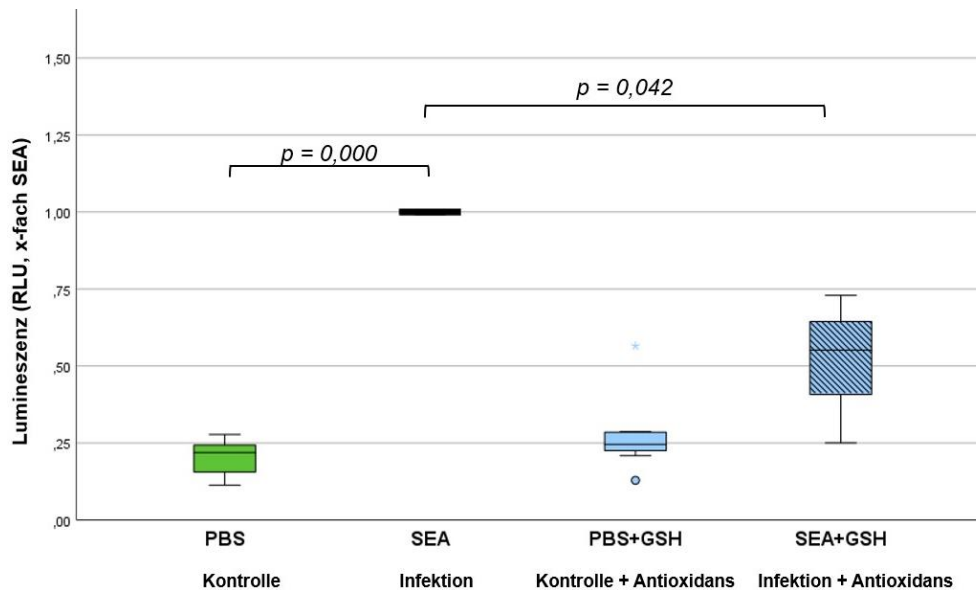


**Abbildung 21: Steigerung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition der p38 MAP-Kinase.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen mit 10  $\mu$ M des p38 MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15  $\mu$ l/mL; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reportergen-Assays (n=5). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

In Abbildung 21 ist der Einfluss des p38 MAP-Kinase-Inhibitors SB203580 auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität zu sehen. Die Nullhypothese wurde abgelehnt. Die Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch SEA ( $p=0,027$ ) war signifikant. Die Inhibition der p38 Kinase führte zu einer signifikanten Verstärkung der SEA-vermittelten AP-1-Promotoraktivität ( $p=0,001$ ). Die basale AP-1-Promotoraktivität wurde in diesem Fall bereits signifikant durch den Inhibitor erhöht (PBS + DMSO zu PBS + SB203580:  $p=0,000$ ). Graphisch liegt diese Erhöhung zwischen den Ergebnissen der SEA-stimulierten und der SEA-stimulierten und inhibierten Gruppe. Statistisch zeigten sich hier jeweils keine Unterschiede (SEA + DMSO zu PBS + SB203580:  $p=0,938$ ; SEA + SB203580 zu PBS + SB203580:  $p=0,103$ ).

### 3.6 Glutathion vermindert die *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierte AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen

In der AG Roeb konnte bereits gezeigt werden, dass *S. mansoni* zu oxidativem Stress im Leberparenchym führt.<sup>76</sup> Die hieraus resultierenden DNA-Schäden und die c-Jun-Aktivierung ließen sich durch das antioxidativ wirkende reduzierte Glutathion abmildern.<sup>76</sup> Daraus ergab sich die Frage, ob sich die durch SEA-induzierte Induktion des AP-1-Promotors im Kolonepithel ebenfalls durch die Behandlung mit dem Antioxidans L-Glutathion abmildern lässt.



**Abbildung 22: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Behandlung mit dem Antioxidans GSH.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen mit GSH in einer Konzentration von 10 mM behandelt. GSH war lediglich in Medium gelöst, weshalb eine Stimulation mit einem zweiten Lösungsmittel zur Kontrolle nicht notwendig war. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15 µl/ mL; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reportergen-Assays (n=3). Für die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Es wurde auf Grund des explorativen Charakters der Arbeit in diesem Fall auf die Bonferroni-Holm-Korrektur verzichtet. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. Ausgewählte p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

In Abbildung 22 ist der Einfluss von GSH auf die SEA-induzierte AP-1-Promotoraktivität zu sehen. Da die Lumineszenzverteilung nicht identisch war ( $p=0,000$ ), wurde die Nullhypothese abgelehnt. Die SEA-Stimulation induzierte die AP-1-Promotoraktivität signifikant ( $p=0,000$ ). Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Behandlung mit GSH signifikant vermindert werden ( $p=0,042$ ). Die beiden Kontrollgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,367$ ). Durch die Verwendung des Antioxidans konnte die SEA-ausgelöste Induktion des AP-1-Promotors nicht gänzlich aufgehoben werden. Im paarweisen Vergleich wurde weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen der SEA und GSH behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (PBS + GSH) festgestellt ( $p=0,047$ ).

## 4 Diskussion

Die parasitäre Erkrankung Schistosomiasis zählt zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten. Weltweit sind zirka 240 Millionen Menschen an ihr erkrankt.<sup>3</sup> Die Endemiegebiete erstrecken sich größtenteils auf die Tropen und Subtropen. Nichtsdestotrotz wird auch in gemäßigten Breiten auf Grund des Klimawandels, von Migration und Reisen eine Ansiedlung des Parasiten potentiell begünstigt. Ein Ausbruch der Schistosomiasis in Korsika verdeutlicht die Relevanz der Erkrankung auch für die europäische Population.<sup>9,10</sup> In heute schon stark betroffenen Gebieten kommt es zu wirtschaftlichen Schäden in Milliardenhöhe und zu einer erheblichen Krankheitslast der Betroffenen.<sup>1</sup> Ein Grund dafür ist die immunologische Umstellung des Wirts durch die Parasiten. Bei der intestinalen Schistosomiasis können darüber hinaus in der Leber und im Kolon fixierte Eier und ihre abgesonderten Eiantigene zu einer erheblichen Morbidität führen.<sup>3,4,22,25</sup> Gleichzeitig wird über eine mögliche Assoziation einer Schistosomiasis und der Karzinomentstehung diskutiert.<sup>12,19,60,71,86,132</sup> Für die durch *S. haematobium* ausgelöste urogenitale Variante der Erkrankung gilt eine solche Kausalität als bestätigt.<sup>60</sup> Die Beweislage für eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* hingegen ist diesbezüglich noch unzureichend. Es bleibt die Frage, ob und wie *S. mansoni* die Ausbildung von hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen beeinflussen oder begünstigen könnte.<sup>19</sup> Zahlreiche experimentelle und Fallstudien unserer<sup>19,24,73,74,76,133</sup> wie auch anderer Arbeitsgruppen<sup>49,67,79,80,82–85,134</sup> erarbeiten Hinweise zu dieser Thematik. Dabei werden Mechanismen diskutiert, die bereits für die Karzinogenese bei einer *S. haematobium*-Infektion bekannt sind. Diese sind die andauernde Beschädigung des Gewebes, der ausgelöste oxidative Stress, die vermehrten DNA-Schäden sowie die mangelnde zelluläre Überwachung und Apoptose bei Immunsuppression.<sup>12,61,62,65–67</sup> Daraus resultiert eine Dysregulation von onkogenen Signalwegen, was schließlich zu Neoplasien führen kann.<sup>12,68</sup>

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Roeb konnten wir hierzu schlüssige Resultate erzielen. So konnte gezeigt werden, dass in Hepatozyten karzinomassoziierte Signalwege, wie die MAP-Kinase-Kaskaden und die Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT3, dauerhaft aktiviert werden. Gleichzeitig werden bei einer Stimulation mit SEA, unter anderem durch oxidativen Stress, DNA-Schäden ausgelöst. Dies könnte potentiell hepatozelluläre Neoplasien auslösen.<sup>73,76</sup> Die hier vorliegende Arbeit knüpft an Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe an, welche im Kolon erhoben wurden. Diese lieferten wichtige Anhaltspunkte für eine Involvierung einer *S. mansoni*-Infektion bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen. Es konnte die Induktion des karzinomassoziierten Signalwegs Wnt/ $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Die Auswertungen von verschiedenen Assays und Markern ergaben eine erhöhte

Proliferation sowie vermehrte DNA-Schäden und -Reparaturen. Darüber hinaus zeigte sich über aktivierende MAP-Kinase-Signalkaskaden eine vermehrte Expression und Aktivierung des Protoonkogens c-Jun.<sup>24</sup> c-Jun ist ein potentieller Teil des Transkriptionsfaktors AP-1.<sup>89</sup> Die übermäßige Aktivierung von AP-1 kann unter anderem proinflammatorische und onkogene Effekte haben.<sup>98,99</sup> Aus diesen Erkenntnissen resultierte die Frage, inwiefern *S. mansoni*-Eiantigene (SEA) einen Effekt auf den AP-1-Transkriptionsfaktor in Enterozyten haben. Auch galt es zu untersuchen, inwiefern Rezeptoren einen solchen SEA-vermittelten Effekt beeinflussen könnten. Weitere Signalkaskaden sollten auf ihre Involvierung untersucht werden. Ein Zusammenhang zwischen einer *S. mansoni*-Infektion und oxidativem Stress wurde in Hepatozyten bereits belegt.<sup>76</sup> Von Interesse war, ob sich Hinweise dafür finden, dass oxidativer Stress auch in SEA-stimulierten Enterozyten auftritt. Zur Erforschung dieser Fragen wurde zunächst in Zellkulturversuchen mit SW620-Zellen ein AP-1-Reportergen-Assay etabliert und dann zur Analyse verwendet. Über das Reportergen lässt sich sensitiv die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors quantifizieren.<sup>94,130</sup>

Aus der vorliegenden Arbeit können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Durch Stimulation mit *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen wird der Transkriptionsfaktor AP-1 in Kolonepithelzellen funktionell und konzentrationsabhängig aktiviert.
- Gewisse Bestandteile von *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen spielen bei der funktionellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 eine besondere Rolle.
- Der Insulin-/ Insulin-like growth factor 1- und der Androgenrezeptor sind bei der *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-vermittelten, funktionellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 involviert.
- Der MAP-Kinase-Signalweg ERK und der PI3K/Akt-Signalweg sind bei der *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-vermittelten, funktionellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 involviert.
- Die MAP-Kinase p38 wirkt bei einer Stimulation mit *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in Enterozyten entgegen.
- Die *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierte, funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 beruht vermutlich teilweise auf oxidativem Stress. Sie kann durch die Behandlung mit dem antioxidativ wirkenden reduzierten Glutathion vermindert werden.

#### **4.1 *Schistosoma mansoni* und kolorektale Karzinogenese**

Der Zusammenhang zwischen einer *S. mansoni*-Kolitis und der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms wird vielfältig diskutiert.<sup>80</sup> Allgemein entwickeln sich kolorektale Karzinome häufig aus präkanzerösen adenomatösen Polypen.<sup>48,49</sup> Im Rahmen einer intestinalen *S. mansoni*-Infektion können im Kolon sogenannte Pseudopolypen entstehen. Es wird angenommen, dass diese auf Grund der chronischen Infektion potentiell maligne entarten können. Dabei wird eine Analogie zu der Karzinogenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermutet.<sup>49</sup> Jedoch ist die Datenlage bislang unzureichend.<sup>19</sup> Es mangelt an einer umfangreichen Studie auf Bevölkerungsebene zu der Korrelation einer *S. mansoni*-Infektion und KRK. Einzelne kleinere klinische Studien fanden bereits Hinweise, dass eine *S. mansoni*-Infektion zu einem früheren Auftreten eines kolorektalen Karzinoms führt. Ferner präsentierten sich diese Karzinome vermehrt multizentrisch (synchrone Karzinome im Kolon) und hatten eine schlechtere Prognose.<sup>82,83</sup> Auf molekularer Ebene gelang es im Kontext einer *S. mansoni*-Kolitis bereits, verschiedene potentiell karzinogene Mechanismen zu identifizieren. Generell sind die molekularbiologischen Mechanismen bei einer KRK-Entstehung vor allem DNA-Schäden, genetische Instabilität sowie Inflammation und oxidativer Stress.<sup>42,45,46,50</sup> Dazu passend gibt es Hinweise darauf, dass es im Kolonepithel bei einer *S. mansoni*-Infektion zu genetischer Instabilität und einer Dysregulation der Apoptose kommt.<sup>82,84,85</sup> Daran anknüpfend konnte unsere Arbeitsgruppe eine Aktivierung der karzinomassoziierten Wnt/ $\beta$ -Catenin- und MAPK/ERK/JNK/c-Jun-Signalwege nachweisen, die zu einer Induktion von Proliferationsmarkern und DNA-Schäden in Kolonepithelzellen führen.<sup>24</sup>

##### **4.1.1 Beeinflussung der AP-1-Promotoraktivität in Kolonepithelzellen durch *Schistosoma mansoni*-Eiantigene**

c-Jun ist ein möglicher Bestandteil des Aktivator Proteins-1 (AP-1).<sup>89</sup> AP-1 umfasst eine Familie an Transkriptionsfaktoren.<sup>83</sup> Auf extrazelluläre Stimuli ergeben sich, abhängig von den Komponenten, aus denen sich das AP-1-Dimer zusammensetzt, verschiedene Reaktionsmechanismen.<sup>135</sup> Die Aktivierung von AP-1 reguliert bzw. initiiert so je nach Zelltyp und Umgebung Immunantworten, Entzündungsreaktionen oder Prozesse, die im Zusammenhang mit der Apoptose und der Neoplasieinduktion stehen.<sup>89,97,98,135</sup> In der vorliegenden Studie wurde erfolgreich ein AP-1-Reportergen-Assay in humanen Kolonepithelzellen etabliert. Mit Hilfe dieser Methodik gelang es nachzuweisen, dass *S. mansoni*-Eiantigene in Enterozyten die AP-1-Promotoraktivität induzieren. Im Kontext des kolorektalen Karzinoms fördert AP-1 die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen.<sup>99</sup> Die funktionelle Aktivierung von AP-1 könnte einer der Mechanismen sein, die

bei einer Schistosomiasis die Entstehung eines KRK begünstigen könnten. Diese Annahme erfolgt für den Fall, dass sich die *in vitro*-Ergebnisse auch auf eine Infektion mit *S. mansoni in vivo* übertragen lassen. Dies sollte in weiterführenden Studien verifiziert werden.

Potentiell könnte im Zusammenhang mit *S. mansoni* so auch eine Inhibition von AP-1 als Ziel pharmakologischer Strategien erforscht werden. Eine solche Inhibition wird bereits als Therapieansatz oder zur Prävention bei inflammatorischen Erkrankungen, wie einer Kolitis und bei kolorektalen und anderen Karzinomen diskutiert.<sup>98,135–137</sup> Jedoch ist ein entsprechender Effekt in klinischen Studien bislang nur limitiert feststellbar. Zu beachten ist, dass verschiedene Komponenten von AP-1 in verschiedenen pathologischen Zuständen unterschiedliche Funktionen haben.<sup>98</sup> Auf Grund der vielfältigen Effekte von AP-1 liegt prinzipiell im Rahmen des KRK, der Kolitis und gegebenenfalls auch der Schistosomiasis ein therapeutisches Potential vor. Um dieses auszuschöpfen, bedarf es jedoch zunächst einer Erweiterung des Wissens zur Rolle des Transkriptionsfaktors und seiner Bestandteile im Zusammenhang mit Karzinogenese und Inflammation. Auf dieser Grundlage wird weitere Forschung zu darauf aufbauenden Therapiestrategien und möglichen Nebenwirkungen benötigt.<sup>98</sup>

Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels Western Blot Analysen bereits zeigen, dass die Stimulation mit rekombinanten oder natürlichem IPSE die Expression und Aktivierung von c-Jun konzentrationsabhängig induziert. IPSE ist ein Bestandteil von SEA.<sup>24</sup> Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass auch die funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 von der verwendeten SEA-Konzentration abhängt (Abbildung 10). Eine höhere Konzentration birgt somit auch potentiell einen größeren onkogenen Effekt. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch eine Stimulation mit *Schistosoma mansoni*-Eiern den AP-1-Transkriptionsfaktor funktionell aktiviert (Abbildung 11). Dieser Effekt war ab einer Stimulation mit 40 Schistosomeneiern, das heißt einer relativ hohen Konzentration, zu beobachten. Analog zur SEA-Konzentration-abhängigen Induktion von AP-1 deutet dies darauf hin, dass eine höhere Anzahl von Eiern stärkere Effekte bedingt. Eine höhere Krankheitslast, beispielsweise bei einer chronischen oder rezidivierenden Schistosomiasis, könnte so eher ein Risiko für die Induktion von potentiell onkogenen Mechanismen bedeuten.

Insgesamt liefert diese Studie konkludente und weiterführende Hinweise zu den vorherigen Publikationen unserer Arbeitsgruppe. Es wird gezeigt, dass bei einer Stimulation *S. mansoni*-Eiantigenen molekularbiologische Faktoren aktiviert werden, die potentiell eine karzinogene Wirkung haben. Gleichzeitig gibt es aktuell Diskussionen über einen möglichen präventiven Effekt von Helminthen. Grundlage für

diese Überlegungen ist die geringere Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und anderer Immunpathologien in den Endemiegebieten der Parasiten.<sup>138</sup> So erforschen zahlreiche Studien das mögliche antiinflammatorische therapeutische Potential der parasitären Antigene im Kontext der CED.<sup>139–141</sup> Die in unserer Arbeitsgruppe gezeigten möglichen onkogenen Effekte der *S. mansoni*-Eiantigene sollten innerhalb dieser Diskussionen dringend berücksichtigt werden.<sup>24</sup>

#### **4.1.2 Funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Bestandteile der *Schistosoma mansoni*-Eiantigene**

SEA ist ein äußerst komplexes Gemisch aus vielen verschiedenen Glykoproteinen.<sup>30</sup> Seit vielen Jahren schon ist die Charakterisierung der einzelnen Komponenten und deren Auswirkungen auf den Organismus in zahlreichen Studien Gegenstand der Forschung.<sup>29,30,32,33,38,39,142</sup>

##### **4.1.2.1 Auswirkungen von IPSE auf den Transkriptionsfaktor AP-1**

Eines der am besten erforschten Antigene innerhalb des SEA-Gemisches ist IPSE.<sup>32</sup> In dem von uns verwendeten SEA sind zirka ein bis zwei Prozent IPSE enthalten.<sup>24</sup> In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits publiziert, dass IPSE in Enterozyten onkogene Faktoren induziert. So wurden erhöhte Marker für DNA-Schäden, Zellproliferation und eine vermehrte Expression von c-Jun festgestellt.<sup>24</sup> Die vorliegende Arbeit zeigt nun, dass eine Stimulation mit natürlichem (n)IPSE den Transkriptionsfaktor AP-1 in Enterozyten funktionell aktiviert (Abbildung 12). Interessanterweise war bei einer Behandlung mit rekombinant hergestelltem HEK-IPSE kein dementsprechend eindeutiger Effekt zu messen. Dies könnte für zukünftige Arbeiten vermuten lassen, dass eine Stimulation mit nIPSE wenn möglich bevorzugt werden sollte. Auch ließ sich ein größerer Effekt in Abhängigkeit von einer höheren Konzentration des verwendeten Antigens beobachten. Statistisch ließ sich kein Unterschied zwischen der Intensität des SEA-induzierten und des nIPSE-induzierten Signals messen. Dies charakterisiert IPSE als wichtigen Faktor in den potentiell onkogenen Effekten der *S. mansoni*-Eiantigene. Diese Hypothese wird durch die von Mbanefo *et al.* erhobenen Ergebnisse zu der definitiv karzinogen wirkenden Unterart *S. haematobium* gestützt. Auch die Eier von *S. haematobium* sondern das Antigen IPSE ab. Mittels eines *in vivo*-Modells konnte an Mäusen gezeigt werden, dass IPSE vermutlich einen Schlüsselfaktor für karzinogene Prozesse bei einer *S. haematobium*-Infektion darstellt.<sup>143</sup> Im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe induziert SEA interessanterweise eine stärkere AP-1-Aktivierung als IPSE (Abbildung 12). Es ergibt sich somit die Hypothese, dass noch weitere Faktoren -

neben IPSE - einen Beitrag zur funktionellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors bei SEA-Stimulation leisten.

#### **4.1.2.2 Annäherung an weitere Eiantigene, die den Transkriptionsfaktor AP-1 funktionell aktivieren**

Insgesamt besteht SEA aus mindestens 30 Glykoproteinen. Einige dieser Proteine, wie IPSE, sind zumindest teilweise gut erforscht. Zu anderen fehlen noch belastbare Daten oder sie wurden noch nicht identifiziert.<sup>29,30,32</sup> Aus den bisherigen Ergebnissen ergab sich die Frage, welche Antigene neben IPSE eine funktionelle Aktivierung von AP-1 in stimulierten Enterozyten auslösen können. Wir haben uns zu Nutze gemacht, dass sich die Antigene auf Grund ihrer Molekülmasse voneinander unterscheiden lassen.<sup>30</sup> Durch unsere Kooperationspartnerin wurde uns nach der Molekülmasse fraktioniertes SEA zur Verfügung gestellt. So wurde gewährleistet, dass nicht nur bereits bekannte SEA-Bestandteile auf ihren Effekt auf den AP-1-Transkriptionsfaktor überprüft wurden. Vielmehr konnte auch eine potentielle Involvierung von bisher weniger oder gar nicht erforschten Antigenen untersucht werden. Konkurrent zu den Ergebnissen der IPSE-Stimulation zeigte sich, dass die potentiell onkogenen Effekte ein Zusammenspiel aus den Einzeleffekten der unterschiedlichen Bestandteile sind. So konnten gleich mehrere Fraktionen (C3-C7) eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität bewirken. Diese unterschieden sich statistisch nicht von dem SEA-vermittelten Wert (Abbildung 16). Die betreffenden Fraktionen enthielten Antigene, deren Molekularmassen in einem Bereich von zirka 10 bis 36 kDa liegen. Grafisch und im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe lässt sich jedoch erkennen, dass SEA den stärksten Effekt induzierte. Interessanterweise führte eine zehnfach höhere Stimulation mit den SEA-Fraktionen zu einer niedrigeren Induktion der AP-1-Promotoraktivität. Ob diese Beobachtung sich durch die Auswirkung einer solch hohen SEA-Konzentration auf die Zellvitalität erklären könnte, bleibt Spekulation. Zur Verifizierung der Ergebnisse auf Proteinebene erfolgten Western Blot Analysen. Enterozyten wurden hierfür mit den betreffenden Fraktionen stimuliert. Die Expression und Aktivierung von c-Jun lag hierbei jeweils ohne signifikanten Unterschied zwischen den Werten der Kontrollgruppe und der SEA-stimulierten Gruppe (Abbildung 15). Dies könnte als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass viele verschiedene Antigene das Protoonkogen c-Jun gemeinsam beeinflussen.

In dem Bereich von 10 bis 36 kDa, für den eine funktionelle Aktivierung von AP-1 gemessen wurde, liegt zum einen das bereits näher erläuterte IPSE (Molekülmasse: ca. 33 bis 35 kDa). Ein weiteres in SEA enthaltenes Glykoprotein mit einer Molekülmasse in diesem Bereich ist omega-1 (Molekülmasse: 31 kDa).<sup>29</sup> Bisher ergaben Studien,

dass omega-1 die Immunantwort<sup>144</sup> und somit die Morbidität modifiziert, da es ein Hauptfaktor der Stimulation einer Th2-Antwort ist.<sup>145-147</sup> Durch die immunmodulierenden Eigenschaften gilt omega-1 als ein Schlüsselfaktor für von *S. mansoni*-Eiern provozierte, pathologische Veränderungen des Gewebes.<sup>148</sup> Nach aktuellem Kenntnisstand liegen derzeit keine Daten zu einer möglichen Beziehung zwischen omega-1 und kolorektaler Karzinogenese vor. Omega-1 ist ein *S. mansoni* spezifisches Antigen.<sup>29</sup> Im Gegensatz zu IPSE ist es daher nicht möglich, von einer *S. haematobium*-Infektion Rückschlüsse auf mögliche Effekte von omega-1 zu ziehen. Die hier präsentierten Ergebnisse führen zu der Spekulation, dass omega-1 in besonderem Maße an der Induktion der AP-1-Promotoraktivität mitwirkt. Dies würde bedeuten, dass omega-1 potentiell die Entstehung von Malignomen begünstigt. Diese Ergebnisse könnten die Grundlage für weitere Versuche sein, die die Beziehung zwischen omega-1 und karzinomassoziierten Signalwegen sowie induzierten DNA-Schäden in Enterozyten untersuchen. Gleichzeitig wurden bereits weitere Antigene mit einer Molekülmasse von 25 kDa (Sm-p25) und 29 kDa (Sm-GST29) identifiziert und bisher vor allem auf ihre Auswirkung auf spezifische T-Zellen hin untersucht.<sup>30</sup> Auch für diese Antigene ergibt sich aus den vorliegenden Ergebnissen potentiell eine Rolle in der funktionellen Aktivierung von AP-1. So zeigt die vorliegende Studie, dass dem Antigen omega-1 in den molekularbiologischen Signalkaskaden bei einer Schistosomiasis möglicherweise noch eine weitere Rolle zukommen könnte. Andererseits wird aufgezeigt, dass eventuell auch andere, noch nicht weitergehend erforschte Antigene die potentiell onkogenen Signalwege in Enterozyten begünstigen könnten.

In Zusammenschau unterstreichen die Resultate dieser Arbeit die Komplexität der durch *S. mansoni*-Eier abgesonderten Antigene. Bisher deuten die erzielten Ergebnisse zu den Bestandteilen der *S. mansoni*-Eiantigene darauf hin, dass verschiedene Antigene an der funktionellen Aktivierung von AP-1 beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IPSE an einer solchen karzinomassoziierten Induktion mitwirkt. Darüber hinaus konnten Hinweise auf die Molekülmasse der am stärksten beteiligten Faktoren gesammelt werden. Um welche Antigene es sich genau handelt, muss in weiterführenden Studien überprüft werden.

### **4.1.3 *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierte Signalwege im Kolonepithel**

#### **4.1.3.1 Wachstums- und Hormonrezeptoren beeinflussen die *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierte AP-1-Aktivität in Enterozyten**

Die bisherigen Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe und die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass im Kolon durch *S. mansoni* molekularbiologische Faktoren aktiviert werden, die potentiell eine karzinogene Wirkung haben. Bisher fehlten Erkenntnisse darüber, auf welche Weise SEA Signale in die Zellen vermittelt.<sup>24</sup> AP-1 reagiert als Transkriptionsfaktor auf eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli, indem es die Expression seiner Zielgene reguliert.<sup>89</sup> Solche Signale, die AP-1 ansprechen, sind unter anderem Infektionen, proinflammatorische Zytokine oder auch Wachstumsfaktoren und Hormone.<sup>95,96</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte die daraus resultierende Hypothese, dass in der SEA-induzierten AP-1-Aktivierung Hormonrezeptoren oder Wachstumsrezeptoren involviert sein könnten, bestätigt werden.

#### Funktionelle Aktivierung des Insulin- und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptors bei Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen in Enterozyten

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Insulin- und Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor zu den Rezeptoren gehören, die bei der Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen in Enterozyten involviert sind. Die Rezeptoren werden vermutlich durch das extrazellulär vorliegende SEA funktionell aktiviert. Dies kann über die intrazelluläre Aktivierung der MAP-Kinase- und PI3K/Akt-Kaskade zu einer Induktion von AP-1 führen. Interessanterweise spielt das Insulin-/IGF-System eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Weiterentwicklung verschiedener Karzinome, wie auch dem KRK.<sup>149,150</sup> Der IGF1R ist häufig in Karzinomzellen, besonders in solchen mit einer höheren Metastasierungstendenz, überexprimiert.<sup>149</sup> Seine Aktivierung stimuliert das Zellwachstum, die Proliferation, die Angiogenese und verhindert die Apoptose von Zellen. So werden das Wachstum und die maligne Transformation von adenomatösen Polypen im Kolon vorangetrieben.<sup>150–152</sup> Auch der IR ist, neben seiner Rolle im Energiehaushalt der Zelle, an der Proliferation von Zellen beteiligt. In verschiedenen Karzinomen ist er hochreguliert, so auch im KRK.<sup>153</sup> Abbruzzese *et al.* schlussfolgern aus ihrer Studie aus dem Jahr 2015, dass ein aktivierter IR vor allem in den frühen Stadien einer KRK-Entstehung eine wichtige Rolle spielt.<sup>154</sup> Die beschriebene Aktivierung des IR und IGF1R liefert somit einen weiteren Hinweis, auf welche Weise die *S. mansoni*-Eiantigene auf molekularer Ebene die Prädisposition für ein KRK begünstigen könnten.

Besonders interessant ist dies im Hinblick auf die Diskussion, ob *S. mansoni*-Eiantigene einen therapeutischen Nutzen bei metabolischen Störungen haben könnten.<sup>155</sup> Es wird debattiert, ob Adipositas die KRK-Entstehung im Frühstadium fördert oder das Adenomwachstum anregt. Als ursächlicher Mechanismus wird die Hyperinsulinämie bei einem metabolischen Syndrom vermutet. Das übermäßig ausgeschüttete Insulin sowie der aktivierte IGF-1 besitzen mitogene Eigenschaften. Der erhöhten Insulin- und IGF-1-Signalgebung wird ein onkogener Effekt zugeschrieben.<sup>131</sup> Gleichzeitig konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass eine chronische *S. mansoni*-Infektion oder eine SEA-Behandlung bei Adipositas vor der Entwicklung eines metabolischen Syndroms schützt. Es wird vermutet, dass die parasitär ausgelöste Th2-Immunantwort die Insulinresistenz vermindert und die Glukosetoleranz erhöht.<sup>155</sup> Verschiedene Studien diskutieren auch beim Menschen eine inverse Assoziation einer *S. mansoni*-Infektion und der Entstehung eines metabolischen Syndroms.<sup>156–158</sup> Es könnte so spekuliert werden, dass eine *S. mansoni*-Infektion in Bezug auf die Entstehung eines KRK sogar protektiv wirkt. Die hier vorliegende Arbeit zeigt allerdings, dass trotz der möglichen Vermeidung einer Hyperinsulinämie im Verlauf der Erkrankung die IR/IGF-1-R-Signalwege im Kontext der Schistosomiasis potentiell stärker angesprochen werden. Dies sollte berücksichtigt werden, wenn über den möglichen therapeutischen Nutzen von *S. mansoni*-Eiantigenen auf die Auswirkungen eines metabolischen Syndroms gesprochen wird. Die Manipulation des Rezeptors wird derweil als potentielles Therapieziel oder hinsichtlich der Prävention des KRK diskutiert. Weitere Studien hierzu stehen aus.<sup>149</sup> Ferner schlagen Abbruzzese *et al.* in ihrer Publikation vor, die Menge des aktivierten Insulinrezeptors als prognostischen Parameter beim kolorektalen Karzinom in Betracht zu ziehen.<sup>154</sup> Die Rolle des IR/IGF1R im Kontext einer *S. mansoni*-Infektion sollte mittels weiterer *in vivo*-Versuche verifiziert werden. Potentiell könnte der Rezeptor darauf aufbauend zur Findung neuer therapeutischer und diagnostischer Optionen erforscht werden. Interessanterweise zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe trotz der Inhibition des IR/IGF1R keine vollständige Inhibition der Induktion des AP-1-Promotors. (Abbildung 18). Es lässt sich die Vermutung aufstellen, dass neben dem IR/IGF1R weitere Rezeptoren in die Vermittlung der SEA-induzierten Effekte involviert sein müssen.

#### Funktionelle Aktivierung des Androgenrezeptors bei Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen in Enterozyten

Die Erkenntnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass es im Kolonepithel bei einer SEA-Stimulation auch zu einer funktionellen Aktivierung des Androgenrezeptors

kommt (Abbildung 19). Konsekutiv wird der Transkriptionsfaktor AP-1 induziert. Die Aktivierung und die Effekte des AR werden über einen genomischen und einen nicht-genomischen Weg erreicht. Es bestehen zahlreiche intrazelluläre Wechselwirkungen.<sup>120</sup> So kann spekuliert werden, ob die SEA-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen und Akt den AR auf einem der beiden Wege induziert. Auch könnte wiederum eine irreguläre Rezeptoraktivierung durch SEA die MAPK- und Akt-Signalkaskaden induzieren. Die weitergehende Bearbeitung dieser Signalkaskaden und die Verifizierung der Ergebnisse im *in vivo*-Modell sollten in Zukunft erfolgen.

Zu beachten ist, dass die Aktivierung des Androgenrezeptors durch irreguläre Bindungspartner oder eine Mutation im Zusammenhang mit Karzinomen erforscht wird.<sup>122</sup> Im Kontext des KRK wird angenommen, dass Androgene vor allem im Frühstadium die Entwicklung von Adenomen fördern könnten.<sup>159</sup> In einer klinischen Studie von Albasri *et al.* aus dem Jahr 2019 wurden Hinweise dafür präsentiert, dass eine höhere Expression des AR zu einer schlechteren Prognose bei KRK führt. So zeigte sich in den untersuchten Proben eine positive Korrelation der AR-Expression des Gewebes unter anderem in Bezug auf die Größe, Differenzierung, Invasivität und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms.<sup>118</sup> Die Involvierung des AR bei der Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen liefert somit einen weiteren Hinweis auf die Auslösung von potentiellen onkogenen Signalkaskaden im Kolonepithel. Refaat *et al.* konnten kürzlich eine erhöhte Expression des AR im maligne entarteten Kolangewebe in Abhängigkeit von Geschlecht und Tumorstadium nachweisen.<sup>119</sup> Es wird daher vorgeschlagen, die Expression des AR als prognostischen Marker beim KRK oder seine Blockierung als Therapieansatz zu nutzen.<sup>118,119</sup> Diese Ansätze und der darauf aufbauende potentielle Nutzen bei einer Infektion mit *S. mansoni* könnten in Zukunft von Bedeutung sein. Auch bei einer Blockade des AR wird die funktionelle Aktivierung von AP-1 nicht vollständig gehemmt (Abbildung 17). Hier bestätigt sich, dass nicht nur ein einzelner Rezeptor bei einer Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen angesprochen wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur kombinierten Betrachtung beider Rezeptoren deuten darauf hin, dass die Aktivierung des IR/ IGF1R sowie des AR synergistisch eine Induktion der AP-1-Promotoraktivität bewirken. Interessanterweise zeigt sich, dass auch bei gleichzeitiger Blockade beider Rezeptoren noch immer eine funktionelle Restaktivierung von AP-1 bleibt (Abbildung 18). Auf Grund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass noch weitere Rezeptoren oder Mechanismen bei der *S. mansoni*-Eiantigen-induzierten Signalübertragung in Enterozyten beteiligt sind.

#### 4.1.3.2 Kinasen beeinflussen die *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierte AP-1-Aktivität in Enterozyten

Der MAP-Kinase-Signalweg ERK und der PI3K/Akt-Signalweg vermitteln die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bei einer Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen

Die Entstehung des KKR wird durch die veränderte Aktivierung verschiedener Signalwege begünstigt. Die am häufigsten betroffenen sind die Wnt-, MAP-Kinase- und PI3K/Akt-Signalwege.<sup>42</sup> Dabei ist auch die Wechselwirkung dieser Signalwege entscheidend für eine vermehrte Proliferation und Therapieresistenz.<sup>101</sup> Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Roeb konnte in vorherigen Studien zeigen, dass die *S. mansoni*-Infektion beziehungsweise eine SEA-Stimulation die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in Enterozyten induziert.<sup>24</sup> Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des Protoonkogens c-Jun durch die MAP-Kinasen JNK und MEK 1/2 vermittelt wird.<sup>24</sup> Die Kinasen MEK 1 und 2 aktivieren innerhalb des Ras-Raf-Signalweges die Kinase ERK.<sup>94</sup> Innerhalb physiologischer zellulärer Prozesse sind die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs und daraus folgende Interaktionen streng reguliert.<sup>101</sup> Über die Beeinflussung des Zellzyklus dient diese Aktivierung unter anderem der Tumorsuppression. Bei einer Dysregulation begünstigt die Aktivierung Zellüberleben, Metastasierungen und Resistenzentwicklungen gegenüber Therapeutika.<sup>101</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Kinasen MEK 1 und 2 bei der durch *S. mansoni*-Eiantigene induzierten, funktionellen Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors mitwirken. Interessanterweise konnte die AP-1-Promotoraktivität bei einer Inhibierung der Kinasen auf ein Level gesenkt werden, welches sich nicht mehr signifikant von dem der Kontrollgruppen unterschied. So deuten die quantitativen Daten des Reporteragen-Assays darauf hin, dass MEK 1 und 2 eine entscheidende Rolle bei diesem karzinomassoziierten Prozess durch die SEA-Stimulation spielen. Eine solche Hochregulierung des MAPK/ERK-Signalweges kann durch die abnorme Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen oder des *downstream*-Ziels PI3K erfolgen.<sup>101</sup> Hier ergibt sich eine Verbindung zu der zuvor erläuterten Aktivierung des IR/IGF1R. Gleichzeitig besteht über Ras eine Verbindung zum PI3K/Akt-Signalweg.<sup>102</sup>

Akt ist vielfältig an der Regulation des Zellwachstums, -überlebens, der Apoptose und anderen karzinogenen Prozessen beteiligt.<sup>102</sup> Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass auch Akt entscheidend an der Induktion der AP-1-Promotoraktivität in Enterozyten nach SEA-Stimulation mitwirkt. Die Inhibition von Akt führte zu einer AP-1-Promotoaktivität, die sich nicht mehr von der Kontrollgruppe unterschied. Hier besteht ein Zusammenhang zu den bisherigen Resultaten unserer Arbeitsgruppe. So

begünstigt Akt unter anderem auch die Aktivierung des Wnt-Signalweges.<sup>112</sup> Des Weiteren stellen Zalata *et al.* in ihrer Publikation eine Hypothese zum Zusammenspiel der Schistosomen-Eiantigene und der Entstehung eines KRK auf. So könnte eine veränderte Expression des Proteins Bcl-2 zu einer Dysregulation der Apoptose führen.<sup>84</sup> Akt kann derweil durch eine Phosphorylierung von Bcl-2 dessen Aktivität steigern.<sup>112</sup> Die in dieser Arbeit erkannte wichtige Rolle von Akt bei der funktionellen Aktivierung von AP-1 ergibt somit zusammen mit den bisherigen Ergebnissen ein schlüssiges Bild. Auch die Ergebnisse der Kinasen sollten im *in vivo*-Modell verifiziert werden.

Es ist bekannt, dass bei einer kolitisassoziierten kolorektalen Karzinogenese die onkogenen Ras/ERK- und PI3K/Akt-Signalwege synergistisch wirken.<sup>160</sup> Vielfältig werden therapeutische Optionen diskutiert und erforscht, um diese parallelen Signalwege optimal zu unterdrücken.<sup>101,160,161</sup> Es gilt zu bedenken, dass den Signalkaskaden auch wichtige physiologische Aufgaben zukommen. Daher müssen mögliche Nebenwirkungen genau erforscht werden.<sup>101</sup> Gegebenenfalls könnten auf dieser Grundlage jedoch ähnliche Strategien für die Therapie bei einer *S. mansoni*-Infektion untersucht werden.

#### Die MAP-Kinase p38 wirkt einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bei der Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen in Enterozyten entgegen

Im Kontext der Karzinogenese ist die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade p38 häufig eine Reaktion auf genotoxischen Stress.<sup>95</sup> Die Rolle der p38 MAPK wird in der Literatur je nach Zelltyp und Kontext verschieden bewertet. Es wird diskutiert, ob p38 als proinflammatorischer und onkogener Faktor wirkt. Andererseits wird p38 als Tumorsuppressor beschrieben, der die Apoptose begünstigt.<sup>105,106</sup> Im Kontext des KRK wurde solch eine protektive Rolle von p38 beschrieben.<sup>104</sup> Diese Effekte könnten über eine negative Regulation der karzinomassoziierten MAPK ERK und JNK bewirkt werden.<sup>102–104,106</sup> Die Resultate dieser und anderer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die MAPK ERK und JNK bei einer *S. mansoni*-Infektion oder einer SEA-Stimulation karzinomassoziierte Signalwege in Enterozyten aktivieren.<sup>24</sup> Innerhalb der Zelle existiert eine komplexe Wechselwirkung von onkogenen und tumorsuppressiven Signalwegen.<sup>162</sup> Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass p38 bei einer Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen antagonistisch zu den MAPK ERK und JNK wirkt. So konnte nachgewiesen werden, dass SEA und die Inhibition von p38 synergistisch die AP-1-Promotoraktivität induzieren. Bei einer Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen könnte p38 somit die AP-1-Promotoraktivität herunterregulieren.

Dies könnte ein Hinweis auf eine tumorsuppressive Wirkung von p38 im Kontext einer *S. mansoni*-Infektion sein.

Eine Bestätigung der Ergebnisse mittels *in vivo*-Versuchen ließe Spekulationen über eine therapeutische Verwendung der Kinase bei einer *S. mansoni*-Infektion zu. Dabei gilt es allerdings die komplexe Wirkung von p38 zu berücksichtigen. Die MAPK p38 wird bereits als Ziel einer pharmakologischen Therapie von inflammatorischen und Karzinomkrankungen diskutiert.<sup>106</sup> Wie in dieser Arbeit gezeigt, kann p38 potentiell die Aktivität onkogener Signalkaskaden reduzieren. So werden therapeutische Optionen diskutiert, die darauf abzielen über die Aktivierung von p38 die Apoptose von suspekten Zellen voranzutreiben.<sup>103</sup> Diese Effekte sollten bei den gleichzeitig geführten Diskussionen über eine therapeutische Inhibition berücksichtigt werden. Außerdem könnte es durch den Wegfall der p38-induzierten Herunterregulierung zu einer Überaktivierung beispielsweise des JNK-Signalwegs kommen.<sup>107</sup> Allerdings gibt es auch Hinweise auf den Nutzen einer p38-Inhibition. So sind die durch p38 begünstigten proinflammatorischen Zytokine und chronischen Entzündungen an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt.<sup>103,107</sup> Insgesamt werden weitere molekularbiologische Ergebnisse zur Rolle von p38 in der Karzinogenese benötigt. Die vielfältigen Mechanismen von p38 sollten für eine mögliche therapeutische Nutzung, im Kontext des KRK und gegebenenfalls der Schistosomiasis, weitergehend erforscht werden. Potentielle Nebenwirkungen müssten dringend berücksichtigt werden.<sup>103,163</sup>

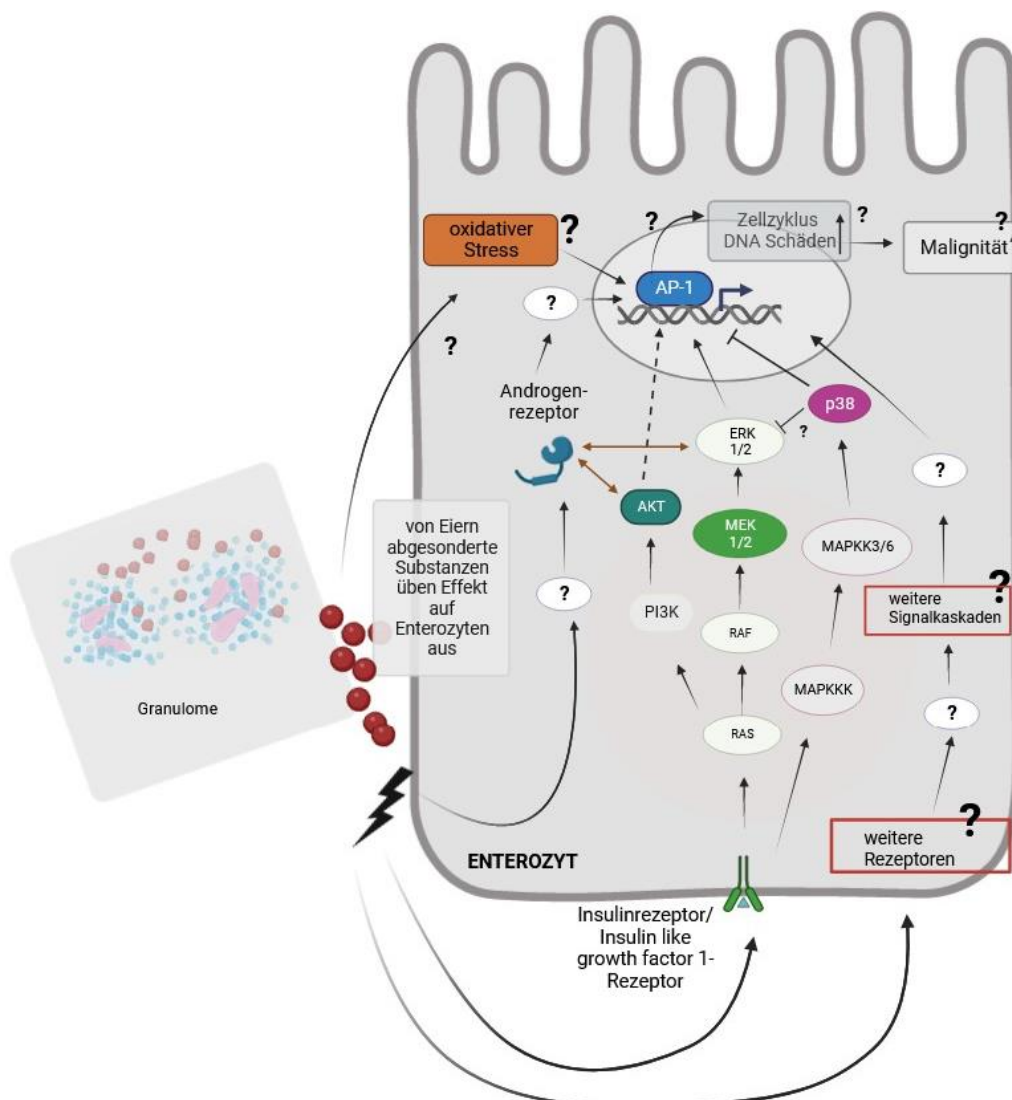
#### 4.1.4 Hinweise auf *Schistosoma mansoni*-Eiantigen-induzierten oxidativen Stress im Kolonepithel

Extrazelluläre Signale, welche den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren können, sind unter anderem auch hochreaktive Sauerstoffspezies (ROS).<sup>52,95,96</sup> Diese ROS entstehen physiologisch, wie bei der Energiegewinnung der Zelle, oder unter pathologischen Bedingungen, unter denen sie beispielsweise von Entzündungszellen abgesondert werden.<sup>46,52</sup> Der Körper benötigt die ROS für verschiedene physiologische Funktionen, wie die Abwehr von Mikroorganismen oder um die Signaltransduktion zu kontrollieren.<sup>56</sup> Durch eine erhöhte Produktion und einen verminderten Abbau von ROS kann es jedoch zu einem Ungleichgewicht des Redox-Systems kommen.<sup>56</sup> Als Abwehrmechanismus aktivieren die Zellen antioxidativ wirkende Enzyme.<sup>164</sup> Überschreitet das Ungleichgewicht die antioxidativen Kapazitäten der Zelle, spricht man von oxidativem Stress.<sup>58</sup> Oxidativer Stress ist eng mit chronischer Inflammation assoziiert. So spielt er beispielsweise auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle.<sup>164</sup> Hervorzuheben ist, dass oxidativer Stress in verschiedenen Organen zu DNA-Schäden, Mutationen, genetischer Instabilität und der Aktivierung von karzinomassoziierten Signalwegen führen kann.<sup>17,46,52,56,165</sup> Verschiedene Forschungsarbeiten zeigen in Tierversuchen und an humanen Proben, dass oxidativer Stress durch Parasiten ausgelöst werden kann.<sup>166–168</sup> In Bezug auf Schistosomiasis wird davon ausgegangen, dass die ROS zunächst zur Dekonstruktion der parasitären Eier produziert werden. Schließlich werden die ROS allerdings ein Teil der Faktoren, die Pathologien auslösen und vorantreiben.<sup>17</sup> Für *S. haematobium*-assoziierte Karzinome wurde bereits eine Korrelation zu erhöhtem oxidativem Stress und DNA-Schäden festgestellt.<sup>169</sup> Das hepatische Redox-Ungleichgewicht bei einer *S. mansoni*-Infektion kann durch Immunzellen<sup>79</sup> und, wie in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Roeb gezeigt wurde, durch eine metabolische Umprogrammierung und Ausbeutung des Leberparenchyms bedingt sein.<sup>76</sup> Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin nachweisen, dass die Behandlung mit antioxidativ wirkendem reduziertem Glutathion den resultierenden oxidativen Stress mindern kann. Darüber hinaus konnten durch das Glutathion auch DNA-Schäden, die Zellproliferation und die Aktivierung onkogener Signalwege vermindert werden.<sup>74,76</sup> Auch im Kolon von *S. mansoni*-infizierten Tieren oder SEA-stimulierten Kolonepithelzellen konnten erhöhte Marker oder direkt eine DNA-Schädigung nachgewiesen werden.<sup>24</sup> Über potentiellen *S. mansoni*-induzierten oxidativen Stress im Kolon ist derweil bisher wenig bekannt.<sup>79</sup> Die durch *S. mansoni*-Eiantigene induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 konnte in der vorliegenden Arbeit mittels der Zugabe von reduziertem Glutathion vermindert werden (Abbildung 22). Dies deutet darauf hin, dass im SEA-stimulierten

Kolonepithel potentiell oxidativer Stress eine Rolle bei der Aktivierung karzinomassoziierter Signalwege spielt. Über verschiedene Mechanismen sind oxidativer Stress und das Versagen antioxidativer Mechanismen bei der Initiierung und Weiterentwicklung von KRK beteiligt.<sup>164</sup> Zu den von oxidativem Stress induzierten Signalwegen gehören die Akt- und die ERK-assoziierten Kaskaden.<sup>165,170</sup> Oxidativer Stress könnte somit auch an der zuvor in dieser Arbeit gezeigten Induktion der Kinasen Akt und MEK 1/2 sowie der konsekutiven funktionellen Aktivierung von AP-1 mitwirken. Interessanterweise zeigen Studien außerdem, dass reaktive Sauerstoffspezies die MAPK p38 inhibieren und so eine JNK-Aktivierung begünstigen.<sup>102</sup> So könnte oxidativer Stress auch im Kontext der SEA-Stimulation die vermeintlich tumorsuppressive Wirkung von p38 vermindern. Vergleichbar zu Ergebnissen in der Leber könnte oxidativer Stress möglicherweise auch in Enterozyten ein Faktor sein, der DNA-Schäden<sup>24</sup> begünstigt. Dies sollte in weiterführenden Studien überprüft werden. Diese Erkenntnis bietet potentiell Anhaltspunkte für neue diagnostische Verfahren im Kontext der Schistosomiasis. So schlagen Pascal *et al.* auf Grundlage einer klinischen Studie vor, Serummarker für oxidativen Stress als diagnostische Parameter für die Schwere von *S. mansoni*-Infektionen zu prüfen.<sup>171</sup> Auch Forschungsergebnisse bezüglich oxidativem Stress als diagnostisches Werkzeug bei KRK werden kontrovers diskutiert.<sup>164</sup> Die mit oxidativem Stress zusammenhängenden Marker könnten genutzt werden, um den Behandlungserfolg gewisser Medikamente einzuschätzen.<sup>165</sup> Gleichzeitig werden solche Marker selbst als Ziel der pharmakologischen KRK-Therapie diskutiert.<sup>164,165</sup> Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass GSH dazu beitragen kann, die Aktivität onkogener Signalgebung zu normalisieren. Potentiell können auf diese Weise präventiv Mutationen verhindert werden. In der gastrointestinalen Schleimhaut ist Glutathion einer der wichtigsten nicht-enzymatischen Radikalfänger, der direkt oder indirekt antioxidativ wirkt.<sup>172</sup> Eine Studie von Loguercio *et al.* konnte am Tiermodell zeigen, dass Glutathion Schäden durch oxidativen Stress in experimentell erzeugter Kolitis abmildert.<sup>173</sup> Während antioxidativ wirkende Mittel im Kontext von KRK oxidativen Stress senken konnten, konnte keine Studie bisher konkrete Heilungserfolge nachweisen.<sup>164</sup> Insgesamt besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf zur Klärung des Zusammenhangs von oxidativem Stress, Kolitis, kolorektaler Karzinogenese sowie der Rolle von Antioxidantien in diesem Kontext.<sup>164</sup> Eine Überprüfung, ob sich die hier erbrachten *in vitro*-Ergebnisse auf ein *in vivo*-Modell übertragen lassen, steht aktuell noch aus. Gegebenenfalls ließe dies die Spekulation zu, ob GSH ergänzend als therapeutisches Mittel bei einer *S. mansoni*-Infektion des Kolons genutzt werden könnte.

#### 4.1.5 Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse für die potentielle Beziehung zwischen einer *Schistosoma mansoni*-Infektion und kolorektaler Karzinogenese

Verschiedene Publikationen geben bereits Hinweise darauf, wie eine Infektion mit *Schistosoma mansoni* oder die Behandlung mit *S. mansoni*-Eiantigenen auf molekularer Ebene prädisponierend für ein kolorektales Karzinom sein könnten.<sup>24,49,67,80,82–85,134,174</sup> Der bisherige Forschungsstand unserer Arbeitsgruppe ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Abbildung 23 konzentriert sich auf die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse.



**Abbildung 23: Erkenntnisse dieser Arbeit zu Signalkaskaden im Kolonepithel nach Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen.** Bei einer Stimulation von Kolonepithelzellen mit *Schistosoma mansoni*-Eiantigenen wird der Insulinrezeptor/ Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor funktionell aktiviert. Dadurch werden verschiedene MAPK-Signalkaskaden initiiert. Über den Raf-Ras-Signalweg wird die Kinase MEK 1/2 aktiviert. Diese phosphoryliert ERK 1/2. Es resultiert eine Induktion des AP-1-Transkriptionsfaktors. Über die Förderung des Zellwachstums, der Angiogenese, der Metastasierung und der Resistenz gegen Medikamente, kann AP-1 Malignome begünstigen.<sup>99</sup> Ergebnisse der AG Roeb zeigen bereits, dass die MAPK JNK an der Aktivierung von c-Jun und somit AP-1 beteiligt ist.<sup>24</sup> Die Aktivierung der MAPK p38

führt hingegen zu einer geringeren Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors. p38 wirkt potentiell als Gegenspieler der MAPK JNK und ERK und tumorsuppressiv.<sup>103,106</sup> Über Ras wird auch PI3K und somit Akt aktiviert. Akt kann wiederum die Expression von Bcl-2 fördern und dadurch die Apoptose vermindern.<sup>84,112</sup> Gleichzeitig kann Akt den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren, welcher eine Schlüsselrolle bei der Proliferation von Epithelzellen spielt.<sup>88,112</sup> Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges durch SEA ist ebenfalls bereits in früheren Arbeiten unsere Arbeitsgruppe gezeigt worden.<sup>24</sup> Darüber hinaus kann durch Akt die Bindung von AP-1-Komponenten an die spezifische Bindungsstelle der DNA begünstigt werden.<sup>115</sup> Bei einer SEA-Stimulation wird außerdem der Androgenrezeptor im Kolonepithel funktionell aktiviert. Dieser steht in Wechselwirkung zu den Kinasen MAPK ERK 1/2 und Akt.<sup>120</sup> Schlussendlich führt auch die Aktivierung des AR zu einer Induktion der AP-1-Promotoraktivität. Die hier präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass noch weitere Rezeptoren und Signalkaskaden durch die *S. mansoni*-Eiantigene aktiviert werden. Gleichzeitig kann vermutet werden, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 teilweise auf oxidativem Stress beruht. Konfirmatorische Versuche hierzu und zur Verifizierung der Ergebnisse *in vivo* stehen aus.

## 4.2 Nutzen und Vorteile des Reporter-gen-Assays als Screening Tool

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich mit Hilfe des AP-1-Reporter-gen-Assays der Effekt verschiedener Chargen von *S. mansoni*-Eiantigenen vergleichen und überprüfen lässt. In Zukunft lässt sich so gewährleisten, dass auch mit verschiedenen SEA-Isolationen erzielte Ergebnisse untereinander vergleichbar sind. Auf Grund der aufwendigen Gewinnung von SEA ist eine Ressourcenschonung unumgänglich. Demgegenüber steht, dass zur Erzielung eines Effekts eine gewisse Menge SEA zur Stimulation genutzt werden muss. Die in dieser Arbeit präsentierten Konzentrationskurven (Abbildung 10) bieten einen Anhaltspunkt dafür, welche Konzentration von SEA in dieser Kosten-Nutzen-Analyse verwendet werden sollte. In den hier gezeigten Ergebnissen konnte ferner ein Effekt durch die Stimulation mit *S. mansoni*-Eiern gezeigt werden (Abbildung 11). Hier bietet sich die Möglichkeit, in der Zukunft auch Experimente direkt mit *S. mansoni*-Eiern durchzuführen.

Über die Erkenntnisse dieser Arbeit hinaus bleiben noch viele potentiell karzinogene Signalwege unerforscht, die durch eine *S. mansoni*-Eiantigen-Stimulation ausgelöst werden könnten. Im Reporter-gen-Assay lassen sich eine Vielzahl an Proben parallel und zeiteffizient auswerten. Somit ist diese Methode für die erforderliche weitere Forschung ein vielversprechendes Screening Tool. Die bisherigen Ergebnisse zur Aktivierung von c-Jun durch *S. mansoni* in der Zellkultur waren anhand von Western Blot Analysen gewonnen worden. Hierbei werden über die densitometrische Auswertungen semiquantitative Daten erhoben. Es erfolgt ein relativer Vergleich der Proteingehalte und keine absolute Messung der Proteinmenge. Gegebenenfalls kann eine hohe Belastung an Hintergrundsignalen vorkommen.<sup>175</sup> Dahingegen bietet das Reporter-gen-Assay den Vorteil, dass die funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 quantitativ erfasst werden kann. Die sensitive Methode erlaubt auch geringere Veränderungen der AP-1-Promotoraktivität zu detektieren.

Gleichzeitig ist die Signal-to-Noise Ratio (Signal-Rausch-Verhältnis) beim Reporterogen-Assay sehr hoch.<sup>176,177</sup> Im Einzelfall wird entschieden werden müssen, welche Methode sich für die jeweiligen Fragestellungen am besten eignet. Wie hier erläutert, wurde mit dem etablierten Reporterogen-Assay das Repertoire unserer Arbeitsgruppe gewinnbringend erweitert.

#### **4.3 Mögliche Anwendung der Erkenntnisse und Ausblick auf zukünftige Forschung**

Noch immer ist das Wissen um den möglichen Zusammenhang einer durch *S. mansoni*-ausgelösten Kolitis und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen unzureichend.<sup>19</sup> Aus den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen ergeben sich neue Aspekte für die weitere Forschung.

Es konnte gezeigt werden, dass *S. mansoni*-Eiantigene im Kolonepithel den karzinomassoziierten Transkriptionsfaktor AP-1 über den IR/ IGF1R und den AR sowie über MAPK- und PI3K/Akt-Signalwege funktionell aktivieren. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder auch beim metabolischen Syndrom wird über die Verwendung von *S. mansoni*-Antigenen als therapeutisches Mittel diskutiert.<sup>24,155</sup> Die hier gezeigte Aktivierung von onkogenen Signalwegen sollten bei solchen Überlegungen berücksichtigt werden. Die therapeutische Strategie bei einer *S. mansoni*-Infektion ist bisher vor allem auf die Behandlung mit Praziquantel beschränkt. Auf Grund der latenten Gefahr einer Resistenzentwicklung gibt es den Bedarf, neue Therapieansätze zu erforschen.<sup>8</sup> Für kolorektale Karzinome und Kolitiden werden der Insulin-/ Insulin-like-growth-factor-1-<sup>149,154</sup> und der Androgenrezeptor,<sup>118,119</sup> assoziierte Signalkaskaden wie der MAPK- und PI3K/Akt-Signalweg<sup>101,106,160,161</sup> sowie der Transkriptionsfaktor AP-1<sup>98,135-137</sup> bereits als therapeutische oder diagnostische Ansatzpunkte diskutiert. Potentiell könnte der Nutzen solcher Konzepte auch im Zusammenhang mit *S. mansoni* erforscht werden.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass noch weitere Rezeptoren bei der funktionellen AP-1-Aktivierung eine Rolle spielen. Mittels des Reporterogen-Assays können in Zukunft weitere Rezeptoren und Signalkaskaden identifiziert werden, die AP-1 induzieren. Auch bietet sich die Möglichkeit, andere Reporterogene nach dem hier gezeigten Prinzip zu verwenden. Somit lässt sich die Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren bei der Stimulation mit *S. mansoni*-Eiantigenen untersuchen. In der Leber zeigten Ergebnisse die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3.<sup>73</sup> Darauf aufbauend könnte eine Beteiligung von STAT3 auch im Kolonepithel untersucht werden. Gleichzeitig bieten die Ergebnisse eine Grundlage für die Etablierung eines Reporterogen-Assays in Hepatozyten. Auch bei der Erforschung von Signalwegen in der

von *S. mansoni*-Eiern stark betroffenen Leber könnten die Vorteile der Methode so zum Tragen kommen.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben erste Hinweise auf einen Zusammenhang von *S. mansoni*-Eiantigenen und oxidativem Stress im Kolonepithel. Zur genaueren Klärung dieser Beziehung stehen confirmatorische Versuche aus. Ferner ergeben sich Hinweise, dass die Verwendung des antioxidativ wirkenden reduzierten Glutathions die potentiell onkogene Signalgebung vermindern könnte. Zahlreiche Studien diskutieren Serummarker für oxidativen Stress als diagnostischen Parameter und Antioxidantien als therapeutischen Ansatz bei einer Kolitis und kolorektalen Karzinomen.<sup>164,165,173</sup> Der tatsächliche Nutzen solcher Überlegungen ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Die Übertragbarkeit dieser Konzepte auf eine Infektion mit *S. mansoni* wird aktuell diskutiert.<sup>171</sup>

Darüber hinaus beleuchten die Ergebnisse dieser Arbeit die Komplexität der durch *S. mansoni*-Eier abgesonderten Antigene. Sowohl IPSE als auch andere Antigene verschiedener Molekülmassen tragen unterschiedlich stark zur Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors bei. Es lässt sich spekulieren, ob omega-1 eines der Antigene ist, welche dabei eine bedeutende Rolle spielen. Hierzu und zu weiteren potentiellen Antigenen stehen confirmatorische und weiterführende Versuche aus.

Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit und unserer Arbeitsgruppe geben zusammen mit Ergebnissen anderer Publikationen Hinweise auf die Aktivierung onkogener Prozesse im Kolon bei einer *S. mansoni*-Infektion. Darauf aufbauend werden weiterhin intensive molekularbiologische Forschungsarbeiten vor allem *in vivo* benötigt. Unbedingt braucht es auch epidemiologische Studien zum gemeinsamen Auftreten der parasitären Erkrankung und des kolorektalen Karzinoms. Auf Grund der geographischen Verteilung der Erkrankung und der finanziellen Herausforderungen bleibt die Schistosomiasis bisher eine der vernachlässigten Tropenerkrankungen der WHO. Jedoch könnte eine intensivere Erforschung der Schistosomiasis in diagnostischen und therapeutischen Neuerungen resultieren. Weltweit könnte die Lebensqualität von bis zu 780 Millionen Menschen verbessert werden.

#### **4.4 Limitation dieser Arbeit**

Die durchgeführte Studie untersucht ausschließlich die Wirkung von *S. mansoni*-Eiantigenen auf SW620-Zellen. Die Ergebnisse beziehen sich somit nur auf Signaltransduktionsmechanismen *in vitro*. *In vitro*-Methoden haben den Vorteil, gut kontrollierbar und reproduzierbar zu sein. Bei der Infektion mit *S. mansoni* handelt es sich jedoch um einen komplexen Prozess innerhalb des lebenden Organismus. Hierfür bieten sich *in vivo*-Versuche an.<sup>76</sup> *In vivo*-Versuche bieten den Vorteil, dass sich die

Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Zelltypen, Signalwegen, Stressreaktionen und Immunmodulationen adäquater untersuchen lassen als durch reine Zellkulturversuche. Es gilt ethische Überlegungen in die Findung geeigneter Methoden mit einzubeziehen. Um dem gerecht zu werden, bietet sich eine Kombination aus *in vitro*- und *in vivo*-Forschung an. Daher sollte auch im vorliegenden Fall ergänzend eine Überprüfung der Resultate in Kolonproben von *S. mansoni*-infizierten Mäusen oder Hamstern angestrebt werden. Des Weiteren sollten die Erkenntnisse mittels einer größeren Kohorte an humanen Proben verifiziert werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu oxidativem Stress durch SEA im Kolonepithel sind indirekte Hinweise. Es sollten daher spezifische Assays für einen direkteren Nachweis von oxidativem Stress erfolgen.

Innerhalb der Karzinogenese existiert eine Vielzahl an Signalkaskaden und involvierten Rezeptoren. Die in dieser Arbeit zum Screening verwendeten Rezeptorinhibitoren sind nur eine Auswahl der in Frage kommenden Rezeptoren. Für folgende Studien sollten weitere Screenings in Betracht gezogen werden. So könnten z.B. weitere Rezeptoren und Kinasen, die durch *S. mansoni*-Eiantigene induziert werden, identifiziert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die parasitäre Infektionskrankheit Schistosomiasis stellt mit zirka 240 Millionen Erkrankten eine bedeutsame globale Ursache für sozioökonomische Ungleichheit und Morbidität dar. Endemisch ist die Schistosomiasis vor allem in den Tropen und Subtropen. Eine zunehmende Globalisierung, Migration und der Klimawandel begünstigen potentiell eine Ausbreitung der Erkrankung in gemäßigte Breiten wie Europa. Eine Infektion mit der Unterart *Schistosoma haematobium* gilt als karzinogen. Für eine *Schistosoma mansoni*-Infektion wird eine Assoziation zur Entstehung hepatozellulärer und kolorektaler Karzinome diskutiert. Die diesbezügliche aus diversen kleineren Fallstudien und molekularbiologischen Untersuchungen resultierende Beweislage ist jedoch weiterhin unzureichend. Die Arbeitsgruppe um Prof. Roeb konnte bereits zeigen, dass im Kolonepithel bei einer *S. mansoni*-Infektion oder der Stimulation mit löslichen Eiantigenen onkogene Signalwege und DNA-Schäden induziert werden. Die hier vorliegende Arbeit knüpft an diese Erkenntnisse an. Zunächst wurde hierfür ein Reporter-Gen-Assay für den karzinomassoziierten Transkriptionsfaktor AP-1 in Kolonepithelzellen etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass AP-1 bei einer Stimulation mit löslichen *S. mansoni*-Eiantigenen (SEA) konzentrationsabhängig funktionell aktiviert wird. Gewisse Bestandteile des komplexen Antigengemisches, wie IPSE und weitere noch näher zu untersuchende Komponenten, spielen bei dieser Aktivierung eine wichtige Rolle. Die Induktion von AP-1 wird über die

Aktivierung des Insulin-/ Insulin like growth factor-1-Rezeptors, des Androgenrezeptors und der Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK- und PI3K/Akt-Signalkaskaden vermittelt. Sowohl die Rezeptoren als auch die Kinasen sind laut Literatur bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms involviert. Die Aktivierung der MAPK p38 hingegen reduziert die SEA-induzierte Aktivierung von AP-1. Dies lässt einen potentiell tumorsuppressiven Effekt von p38 in diesem Kontext vermuten. Eine Behandlung der Enterozyten mit dem antioxidativ wirkenden reduzierten Glutathion ist in der Lage, die SEA-bedingten Effekte auf AP-1 abzumildern. So liefern die Erkenntnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass die AP-1-Aktivierung unter anderem durch oxidativen Stress induziert wird. Konfirmatorische *in vivo*-Versuche hierzu stehen aus. Die Resultate dieser Arbeit liefern weiterführende Hinweise darauf, wie *S. mansoni* auf molekularer Ebene für die kolorektale Karzinogenese prädisponierend wirken könnte. Mittels des eigens für die Versuche der vorliegenden Arbeit in der Arbeitsgruppe etablierten Reporter-gen-Assays können in Zukunft weitere in diesem Kontext involvierte Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren und Kinasen analysiert werden. Eine Etablierung von Reporter-gen-Analysen in Hepatozyten könnte wichtige Anhaltspunkte zu SEA-induzierten, potentiell onkogenen Signalwegen in der Leber liefern. Es sollte eine Verifizierung der Ergebnisse mittels *in vivo*-Versuchen erfolgen. Gegebenenfalls lassen sich auf dieser Basis neue diagnostische oder therapeutische Strategien für eine *Schistosoma mansoni*-Infektion erforschen.

## 6 Summary

The parasitic infectious disease Schistosomiasis is a significant global contributor to socioeconomic inequality and morbidity, affecting approximately 240 million individuals. Schistosomiasis is predominantly endemic in tropical and subtropical regions. Increasing globalization, migration and climate change potentially favor the expansion of the disease in more temperate latitudes, such as Europe. The infection with the subspecies *Schistosoma haematobium* is classified as carcinogenic. In case of a *Schistosoma mansoni*-infection, there is an ongoing discussion about its association with the development of hepatocellular and colorectal cancer. The evidence in this regard, resulting from various smaller case studies and molecular biological investigations, remains insufficient. The research group of Prof. Roeb generated evidence in colon epithelium cells indicating that a *S. mansoni*-infection or stimulation with soluble egg antigen induces oncogenic signaling pathways and DNA damage. This study extends upon these findings. Initially a reporter gene assay with the carcinoma-associated transcriptional factor AP-1 was established. It could be demonstrated that AP-1 is concentration dependent functionally activated upon stimulation with *S.*

*mansoni* egg antigen (SEA). Certain components of the complex mixture of antigens, such as IPSE and additional yet to be determined elements, play an important role in this activation. The induction of AP-1 is mediated through the activation of the insulin/insulin like growth factor-1 receptors, the androgen receptors, the Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK and PI3K/Akt pathways. According to literature, both receptors and the kinase pathways identified are involved in the development of colorectal carcinoma. Conversely, the activation of the MAPK p38 diminishes the SEA-induced activation of AP-1. This suggests a potential tumor suppressive effect of p38 in this context. The treatment of enterocytes with the antioxidative reduced glutathione reduces the SEA-dependent effects on AP-1. The findings of this study indicate that the activation of AP-1 is partly due to oxidative stress. Confirmatory experiments in this regard are pending. The results of this research provide further insights how *Schistosoma mansoni* may predispose to colorectal carcinogenesis on a molecular level. Through the use of the reporter gene assay, established specifically for the experiments in the present study within the research group, additional transcription factors, receptors and kinases involved in SEA-induced signaling can be explored in the future. The establishment of reporter gene analysis in hepatocytes could provide important clues regarding SEA-induced, potentially oncogenic signaling pathways in the liver. A verification of the results should be conducted in *in vivo* experiments. Possibly, this could lead to the exploration of new diagnostic or therapeutic strategies for a *Schistosoma mansoni* infection.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
AG	research group	Arbeitsgruppe
AP-1	activator protein-1	Aktivator-Protein-1
APC-Gen	adenomatous polyposis coli gene	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
AR	androgen receptor	Androgenrezeptor
ARE	antioxidant response element	Antioxidans-Antwort-Element
ATF	activating transcription factor	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
ATP	adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
CED	inflammatory bowel disease	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERK	extracellular-signal regulated kinase	extrazellulär regulierte Signalkinase
FAP	Familial Adenomatous Polyposis	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FBS	fetal bovine serum	Fetales Kälberserum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	reduced glutathione	reduziertes Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	distilled water	destilliertes Wasser
HCC	hepatocellular carcinoma	Hepatozelluläres Karzinom
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HRP	Horseradish Peroxidase	Meerrettich-Peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer	Internationale Agentur für Krebsforschung
Ig	immunoglobulin	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor	Insulinartiger Wachstumsfaktor
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	Insulinartiger Wachstumsfaktor 1-Rezeptor
IL	interleukins	Interleukin
IPSE	IL-4-inducing principle from <i>S. mansoni</i> eggs	IL-4-induzierender Faktor aus <i>S. mansoni</i> Eiern
IR	insulin receptor	Insulinrezeptor
JLU	Justus-Liebig-University	Justus-Liebig-Universität
JNK	c-Jun-N-terminal kinase	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	kilodalton	Kilodalton
KRK	colorectal cancer	Kolorektales Karzinom
M	molar mass	Molare Masse
MAF	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	Muskuloaponeurotisches Fibrosarkom-Onkogen-Homolog

MAP	Mitogen-activated protein	Mitogen-aktivierte Proteine
MEK 1/2	mitogen-activated protein kinase kinase 1/2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen 1/2
mRNA	messenger RNA	Boten-RNS
nIPSE	natural IPSE	natürliches IPSE
NTDs	neglected tropical diseases	Vernachlässigte Tropenkrankheiten
Parp-1	Poly(ADP-ribose)polymerase	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor	Thrombozytenwachstumsfaktor-Rezeptor
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	Phosphatidylinositol 3- Kinase
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
<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>
SEA	soluble egg antigen	lösliches Ei-Antigen
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Signalüberträger und Aktivator der Transkription 3
Th	T-helper cell	T-Helferzelle
TK	thymidine kinase	Thymidinkinase
TLR4	toll-like receptor 4	Toll-like-Rezeptor 4
WHO	World Health Organisation	Weltgesundheitsorganisation
$\gamma$ H2a.x	gamma-H2A histone family member X	gamma-H2A-Histon-Familienmitglied X

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i> .....	3
Abbildung 2: Kenntnisstand zu aktivierten Signalwegen im Kolonepithel bei einer <i>Schistosoma mansoni</i> -Infektion zu Beginn der vorliegenden Arbeit.....	14
Abbildung 3: Signalkaskaden, die durch eine Aktivierung des Insulin-/ IGF1-Rezeptors ausgelöst werden .....	18
Abbildung 4: Bei der Aktivierung des Androgenrezeptors involvierte Signalwege .....	19
Abbildung 5: Arbeitsschritte der chemischen Transformation.....	31
Abbildung 6: Funktionsweise des Reporter-Gen-Assays .....	34

Abbildung 7: Arbeitsschritte des Reportergen-Assays .....	35
Abbildung 8: <i>S. mansoni</i> -Eier in Kokultur mit SW620-Zellen .....	38
Abbildung 9: Einfluss der Transfektion und Stimulanzen auf die Vitalität der SW620-Zellen .....	44
Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch Stimulation mit unterschiedlichen SEA-Chargen.....	46
Abbildung 11: <i>S. mansoni</i> -Eier induzieren die AP-1-Promotoraktivität in SW620-Zellen .....	47
Abbildung 12: Induktion der AP-1-Promotoraktivität durch Stimulation mit SEA, nIPSE und HEK-IPSE .....	49
Abbildung 13: Gegenüberstellung der SEA- und LMW-Marker-Eluationskurven sowie der Ergebnisse des AP-1-Reportergen-Assays .....	51
Abbildung 14: Einfluss von SEA-Fractionen auf die Induktion des AP-1-Promotors. SW620-Zellen wurden mit dem AP-1-Reportergen transfiziert.....	52
Abbildung 15: Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von c-Jun nach 24-stündiger Stimulation mit SEA und SEA-Fractionen.....	54
Abbildung 16: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition des Insulinrezeptors/ Insulin-like growth factor 1-Rezeptors .....	57
Abbildung 17: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition des Androgenrezeptors .....	58
Abbildung 18: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition des Insulin-/ IGF-1-Rezeptors und des Androgenrezeptors .....	60
Abbildung 19: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition der Akt 1/2/3-Kinase .....	61
Abbildung 20: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition der MEK 1/2-Kinase. ....	63
Abbildung 21: Steigerung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Inhibition der p38 MAP-Kinase .....	64
Abbildung 22: Verminderung der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität durch Behandlung mit dem Antioxidans GSH.....	65
Abbildung 23: Erkenntnisse dieser Arbeit zu Signalkaskaden im Kolonepithel nach Stimulation mit <i>S. mansoni</i> -Eiantigenen .....	81
Abbildung 24: Plasmid AP-1 (pGI4.44 [luc2P/AP1 RE/Hygro]).....	106
Abbildung 25: Plasmid TK (pGL4.74[hRLuc/TK]) .....	106
Abbildung 26: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reportergen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen – Inhibitionsversuche .....	107

Abbildung 27: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporter-Gen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen – SEA-Konzentrationsreihen.....	107
Abbildung 28: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporter-Gen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen - Kokultur mit <i>S. mansoni</i> -Eiern .....	108
Abbildung 29: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporter-Gen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen - SEA-Fraktionen .....	108
Abbildung 30: Gleichbleiben der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität bei Anwendung verschiedener Inhibitoren und Stimulanzen im Screening .....	110

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Instrumente und Geräte .....	21
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tabelle 4: Puffer und Lösungen .....	24
Tabelle 5: Zelllinien.....	25
Tabelle 6: Medien und Zusatzstoffe .....	26
Tabelle 7: Kommerzielle Kits .....	27
Tabelle 8: Inhibitoren/ Stimulanzen .....	27
Tabelle 9: Antikörper .....	28
Tabelle 10: Software.....	28
Tabelle 11: Vektoren für die Transformation.....	30
Tabelle 12: Vorbereitung der Inhibitoren/ Stimulanzen .....	36
Tabelle 13: Vorbereitung Konzentrationsreihe SEA 1.....	37
Tabelle 14: Vorbereitung Konzentrationsreihe SEA 2.....	38

## 10 Literaturverzeichnis

- 1 WHO. Neglected tropical diseases. [https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1), Zugriff: 10.02.2024.
- 2 Engels D, Zhou X-N. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infectious diseases of poverty* 2020; 9: 10.
- 3 Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. *Journal of advanced research* 2013; 4: 433–444.
- 4 WHO. Schistosomiasis (Bilharzia). [https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1), Zugriff: 16.09.2023.

- 5 Fenwick A. The global burden of neglected tropical diseases. *Public health* 2012; 126: 233–236.
- 6 Nelwan ML. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Current therapeutic research, clinical and experimental* 2019; 91: 5–9.
- 7 Gray DJ, Ross AG, Li Y-S, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ (Clinical research ed.)* 2011; 342: d2651.
- 8 Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)* 2014; 383: 2253–2264.
- 9 Boissier J, Moné H, Mitta G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe. *The Lancet. Infectious diseases* 2015; 15: 757–758.
- 10 Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, Allienne J-F, 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: 971–979.
- 11 Schwartz C, Fallon PG. Schistosoma "Eggs-Iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 2492.
- 12 van Tong H, Brindley PJ, Meyer CG, Velavan TP. Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine* 2017; 15: 12–23.
- 13 Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *The New England journal of medicine* 2002; 346: 1212–1220.
- 14 Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)* 2006; 368: 1106–1118.
- 15 Chabasse D, Bertrand G, Leroux JP, Gauthey N, Hocquet P. Bilharziose à *Schistosoma mansoni* évolutive découverte 37 ans après l'infestation. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales* 1985; 78: 643–647.
- 16 McManus DP. The search for a vaccine against schistosomiasis--a difficult path but an achievable goal. *Immunological reviews* 1999; 171: 149–161.
- 17 Masamba P, Kappo AP. Immunological and Biochemical Interplay between Cytokines, Oxidative Stress and Schistosomiasis. *International journal of molecular sciences* 2021; 22.
- 18 Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1991; 146: 1322–1327.

- 19 von Bülow V, Lichtenberger J, Grevelding CG, Falcone FH, Roeb E, Roderfeld M. Does *Schistosoma Mansoni* Facilitate Carcinogenesis? *Cells* 2021; 10.
- 20 Gu K, Li Y, Driguez P, Zeng Q, Yu X, Sun H, Cai L, He Y, Wang W, McManus DP. Clinical diagnostic value of viable *Schistosoma japonicum* eggs detected in host tissues. *BMC infectious diseases* 2017; 17: 244.
- 21 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: 61.
- 22 Elbaz T, Esmat G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *Journal of advanced research* 2013; 4: 445–452.
- 23 Niedrig, M., B. Reinhardt, G. D. Burchard, H. Schmitz, E. Tannich, K. Tintelnot, G. Laude, K. Alpers, K. Stark, and J. Mehlhose. *Steckbriefe Seltener Und Importierter Infektionskrankheiten*. 2006.
- 24 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/ $\beta$ -catenin signaling and activate the protooncogene c-Jun in human and hamster colon. *Scientific reports* 2020; 10: 22373.
- 25 Richter J, Correia Dacal AR, Vergetti Siqueira JG, Poggensee G, Mannsmann U, Deelder A, Feldmeier H. Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to *Schistosoma mansoni*. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 1998; 3: 728–735.
- 26 Friedman JF, Kanzaria HK, Acosta LP, Langdon GC, Manalo DL, Wu H, Olveda RM, McGarvey ST, Kurtis JD. Relationship between *Schistosoma japonicum* and nutritional status among children and young adults in Leyte, the Philippines. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2005; 72: 527–533.
- 27 EZEAMAMA AE, Friedman JF, Acosta LP, BELLINGER DC, Langdon GC, Manalo DL, Olveda RM, Kurtis JD, McGarvey ST. Helminth infection and cognitive impairment among Filipino children. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2005; 72: 540–548.
- 28 Bustinduy AL, Thomas CL, Fiutem JJ, Parraga IM, Mungai PL, Muchiri EM, Mutuku F, Kitron U, King CH. Measuring fitness of Kenyan children with polyparasitic infections using the 20-meter shuttle run test as a morbidity metric. *PLoS neglected tropical diseases* 2011; 5: e1213.
- 29 Dunne DW, Jones FM, Doenhoff MJ. The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology* 1991; 103 Pt 2: 225–236.

- 30 Asahi H, Stadecker MJ. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. *Parasitology international* 2003; 52: 361–367.
- 31 Mortimer CE, Müller U. *Chemie. Das Basiswissen der Chemie*. 13., vollständig überarbeitete Auflage Thieme, Stuttgart 2020; S. 44.
- 32 Dunne DW, Agnew AM, Modha J, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni* egg antigens: preparation of rabbit antisera with monospecific immunoprecipitating activity, and their use in antigen characterization. *Parasite immunology* 1986; 8: 575–586.
- 33 Wuhrer M, Balog CIA, Catalina MI, Jones FM, Schramm G, Haas H, Doenhoff MJ, Dunne DW, Deelder AM, Hokke CH. IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *The FEBS journal* 2006; 273: 2276–2292.
- 34 Schramm G, Falcone FH, Gronow A, Haisch K, Mamat U, Doenhoff MJ, Oliveira G, Galle J, Dahinden CA, Haas H. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 18384–18392.
- 35 Mbanefo EC, Agbo CT, Zhao Y, Lamanna OK, Thai KH, Karinshak S, Khan MA, Odegaard J, Saltikova I, Smout M, Pennington L, Nicolls M, Jardetzky T, Loukas A, Brindley P, Falcone F, Hsieh MH. IPSE, an Abundant Egg-Secreted Protein of the Carcinogenic Helminth *Schistosoma haematobium*, Promotes Proliferation of Bladder Cancer Cells and Angiogenesis 2020.
- 36 Kaur I, Schramm G, Everts B, Scholzen T, Kindle KB, Beetz C, Montiel-Duarte C, Blindow S, Jones AT, Haas H, Stolnik S, Heery DM, Falcone FH. Interleukin-4-inducing principle from *Schistosoma mansoni* eggs contains a functional C-terminal nuclear localization signal necessary for nuclear translocation in mammalian cells but not for its uptake. *Infection and immunity* 2011; 79: 1779–1788.
- 37 Meevissen MHJ, Balog CIA, Koeleman CAM, Doenhoff MJ, Schramm G, Haas H, Deelder AM, Wuhrer M, Hokke CH. Targeted glycoproteomic analysis reveals that kappa-5 is a major, uniquely glycosylated component of *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2011; 10: M110.005710.
- 38 Schramm G, Hamilton JV, Balog CIA, Wuhrer M, Gronow A, Beckmann S, Wipperfsteg V, Grevelding CG, Goldmann T, Weber E, Brattig NW, Deelder AM, Dunne DW, Hokke CH, Haas H, Doenhoff MJ. Molecular characterisation of kappa-5, a major antigenic glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and biochemical parasitology* 2009; 166: 4–14.
- 39 Fitzsimmons CM, Schramm G, Jones FM, Chalmers IW, Hoffmann KF, Grevelding CG, Wuhrer M, Hokke CH, Haas H, Doenhoff MJ, Dunne DW. Molecular characterization of omega-1: a hepatotoxic ribonuclease from *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and biochemical parasitology* 2005; 144: 123–127.

- 40 WHO Globocan. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>, Zugriff: 25.09.2023.
- 41 Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 2019; 16: 713–732.
- 42 Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 2016; 469: 125–134.
- 43 Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging* 2016; 11: 967–976.
- 44 Onkologie L. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. Langversion 2.1. – Januar 2019 AWMF-Registernummer: 021/007OL; 2019.
- 45 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–767.
- 46 Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). *International journal of oncology* 2013; 43: 973–984.
- 47 Giouleme O, Diamantidis MD, Katsaros MG. Is diabetes a causal agent for colorectal cancer? Pathophysiological and molecular mechanisms. *World journal of gastroenterology* 2011; 17: 444–448.
- 48 Montminy EM, Jang A, Conner M, Karlitz JJ. Screening for Colorectal Cancer. *The Medical clinics of North America* 2020; 104: 1023–1036.
- 49 Ming-Chai C, Chi-Yuan C, Pei-Yu C, Jen-Chun H. Evolution of colorectal cancer in schistosomiasis. Transitional mucosal changes adjacent to large intestinal carcinoma in colectomy specimens. *Cancer* 1980; 46: 1661–1675.
- 50 Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 2004; 73: 39–85.
- 51 Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature reviews. Cancer* 2012; 12: 801–817.
- 52 Srinivas US, Tan BW, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology* 2019; 25: 101084.
- 53 Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53: 1137–1144.
- 54 Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 2059–2072.

- 55 Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330–337.
- 56 Li S, Tan H-Y, Wang N, Zhang Z-J, Lao L, Wong C-W, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International journal of molecular sciences* 2015; 16: 26087–26124.
- 57 Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental health perspectives* 1998; 106: 375–384.
- 58 Averill-Bates DA. The antioxidant glutathione. *Vitamins and hormones* 2023; 121: 109–141.
- 59 Plummer M, Martel C de, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet. Global health* 2016; 4: e609-16.
- 60 IARC. Biological agents. A review of human carcinogens. *Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 2012; 100: 1–441.
- 61 Herrera LA, Benítez-Bribiesca L, Mohar A, Ostrosky-Wegman P. Role of infectious diseases in human carcinogenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* 2005; 45: 284–303.
- 62 Trakatelli C, Frydas S, Hatzistilianou M, Papadopoulos E, Simeonidou I, Founta A, Paludi D, Petrarca C, Castellani ML, Papaioannou N, Salini V, Conti P, Kempuraj D, Vecchiet J. Chemokines as markers for parasite-induced inflammation and tumors. *The International journal of biological markers* 2005; 20: 197–203.
- 63 Botelho MC, Veiga I, Oliveira PA, Lopes C, Teixeira M, da Costa JMC, Machado JC. Carcinogenic ability of *Schistosoma haematobium* possibly through oncogenic mutation of KRAS gene. *Advances in cancer: research & treatment* 2013; 2013.
- 64 Chaudhary KS, Lu QL, Abel PD, Khandan-Nia N, Shoma AM, el Baz M, Stamp GW, Lalani EN. Expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in schistosomiasis-associated transitional and squamous cell carcinoma of urinary bladder. *British journal of urology* 1997; 79: 78–84.
- 65 Brindley PJ, da Costa JMC, Sripa B. Why does infection with some helminths cause cancer? *Trends in cancer* 2015; 1: 174–182.
- 66 Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 2009; 361: 2449–2460.
- 67 Palumbo E. Association Between Schistosomiasis and Cancer. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 2007; 15: 145–148.
- 68 Vennervald BJ, Polman K. Helminths and malignancy. *Parasite immunology* 2009; 31: 686–696.

- 69 International Agency for Research on Cancer (WHO). Global Cancer Observatory - Cancer Today. Mortality, both sexes. [https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/tables?mode=cancer&types=1&cancers=11&group\\_populations=1&multiple\\_populations=1](https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/tables?mode=cancer&types=1&cancers=11&group_populations=1&multiple_populations=1), Zugriff: 10.02.2024.
- 70 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68: 394–424.
- 71 El-Tonsy MM, Hussein HM, Helal TE-S, Tawfik RA, Koriem KM, Hussein HM. Schistosoma mansoni infection: is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? *Acta tropica* 2013; 128: 542–547.
- 72 Abdel-Rahim AY. Parasitic infections and hepatic neoplasia. *Digestive diseases* (Basel, Switzerland) 2001; 19: 288–291.
- 73 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* (Baltimore, Md.) 2020; 72: 626–641.
- 74 von Bülow V, Schneider M, Dreizler D, Russ L, Baier A, Buss N, Lichtenberger J, Härle L, Müller H, Tschuschner A, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Schistosoma mansoni-Induced Oxidative Stress Triggers Hepatocellular Proliferation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2024;17(1):107-117.
- 75 Härle L, von Bülow V, Knedla L, Stettler F, Müller H, Zahner D, Haeberlein S, Windhorst A, Tschuschner A, Burg-Roderfeld M, Köhler K, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Hepatocyte integrity depends on c-Jun-controlled proliferation in Schistosoma mansoni infected mice. *Sci Rep*. 2023 Nov 21;13(1):20390.
- 76 von Bülow V, Gindner S, Baier A, Hehr L, Buss N, Russ L, Wrobel S, Wirth V, Tabatabai K, Quack T, Haeberlein S, Kadesch P, Gerbig S, Wiedemann KR, Spengler B, Mehl A, Morlock G, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Falcone FH, Wilson RA, Bankov K, Wild P, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Metabolic reprogramming of hepatocytes by Schistosoma mansoni eggs. *JHEP reports : innovation in hepatology* 2023; 5: 100625.
- 77 Elsammak MY, Al-Sharkaweey RM, Ragab MS, Amin GA, Kandil MH. IL-4 and reactive oxygen species are elevated in Egyptian patients affected with schistosomal liver disease. *Parasite immunology* 2008; 30: 603–609.
- 78 La Flamme AC, Patton EA, Bauman B, Pearce EJ. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2001; 166: 1903–1911.
- 79 Oliveira RB de, Senger MR, Vasques LM, Gasparotto J, dos Santos JPA, Pasquali MAdB, Moreira JCF, Silva FP, Gelain DP. Schistosoma mansoni infection causes oxidative stress and alters receptor for advanced glycation endproduct (RAGE)

- and tau levels in multiple organs in mice. *International journal for parasitology* 2013; 43: 371–379.
- 80 Al-Mashat F, Sibiany A, Radwi A, Bahadur Y, Al-Radi A, Meir H, Ahmed GE. Rectal cancer associated with schistosomiasis: report of two cases and review of the literature. *Annals of Saudi medicine* 2001; 21: 65–67.
  - 81 Herman AM, Kische A, Babu H, Shilanaiman H, Tarmohamed M, Lodhia J, Amsi P, Pyuza J, Mremi A, Mwasamwaja A, Nyindo M, Chilonga K, Msuya D. Colorectal cancer in a patient with intestinal schistosomiasis: a case report from Kilimanjaro Christian Medical Center Northern Zone Tanzania. *World journal of surgical oncology* 2017; 15: 146.
  - 82 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: 175–181.
  - 83 Almeida GFG, Sarinho FW, Carvalho de Abreu E Lima P, Oliveira Filho JB, Moura MAdL, Ribeiro LNB, Rolim de Brito B, Lira MMdM, Maior MdRMS, Domingues ALC. DNA Repair Defect and RAS Mutation in Two Patients With *Schistosoma mansoni*-Associated Colorectal Cancer: Carcinogenesis Steps or Mere Coincidence? *Journal of global oncology* 2017; 3: 423–426.
  - 84 Zalata KR, Nasif WA, Ming S-C, Lotfy M, Nada NA, El-Hak NG, Leech SH. p53, Bcl-2 and C-Myc expressions in colorectal carcinoma associated with schistosomiasis in Egypt. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* 2005; 27: 245–253.
  - 85 Soliman AS, Bondy ML, El-Badawy SA, Mokhtar N, Eissa S, Bayoumy S, Seifeldin IA, Houlihan PS, Lukish JR, Watanabe T, Chan AO, Zhu D, Amos CI, Levin B, Hamilton SR. Contrasting molecular pathology of colorectal carcinoma in Egyptian and Western patients. *British journal of cancer* 2001; 85: 1037–1046.
  - 86 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: 68.
  - 87 Sancho R, Nateri AS, Vinuesa AG de, Aguilera C, Nye E, Spencer-Dene B, Behrens A. JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumourigenesis in mice. *The EMBO journal* 2009; 28: 1843–1854.
  - 88 Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017; 36: 1461–1473.
  - 89 Karin M, Liu Zg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology* 1997; 9: 240–246.
  - 90 Bahnassy AA, Zekri A-RN, El-Houssini S, El-Shehaby AMR, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC gastroenterology* 2004; 4: 22.

- 91 Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Czyzewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer research* 2009; 29: 3049–3052.
- 92 Latchman DS. Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1997; 29: 1305–1312.
- 93 Hager GL, McNally JG, Misteli T. Transcription dynamics. *Molecular cell* 2009; 35: 741–753.
- 94 Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270: 16483–16486.
- 95 Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* 2002; 4: E131-6.
- 96 Brennan A, Leech JT, Kad NM, Mason JM. Selective antagonism of cJun for cancer therapy. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2020; 39: 184.
- 97 Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390–2400.
- 98 Song D, Lian Y, Zhang L. The potential of activator protein 1 (AP-1) in cancer targeted therapy. *Frontiers in immunology* 2023; 14: 1224892.
- 99 Zhu G, Cheng Z, Huang Y, Zheng W, Yang S, Lin C, Ye J. MyD88 mediates colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via NF- $\kappa$ B/AP-1 signaling pathway. *International journal of molecular medicine* 2020; 45: 131–140.
- 100 Ye N, Ding Y, Wild C, Shen Q, Zhou J. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). *Journal of medicinal chemistry* 2014; 57: 6930–6948.
- 101 Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 2014; 120: 3446–3456.
- 102 Lei Z-N, Teng Q-X, Tian Q, Chen W, Xie Y, Wu K, Zeng Q, Zeng L, Pan Y, Chen Z-S, He Y. Signaling pathways and therapeutic interventions in gastric cancer. *Signal transduction and targeted therapy* 2022; 7: 358.
- 103 Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer* 2009; 9: 537–549.
- 104 Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C. p38 $\alpha$  MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World journal of gastroenterology* 2014; 20: 9744–9758.
- 105 Bulavin DV, Fornace AJ. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Advances in cancer research* 2004; 92: 95–118.

- 106 Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2007; 6: 2429–2433.
- 107 Yong H-Y, Koh M-S, Moon A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 2009; 18: 1893–1905.
- 108 Truong TH, Lange CA. Deciphering Steroid Receptor Crosstalk in Hormone-Driven Cancers. *Endocrinology* 2018; 159: 3897–3907.
- 109 Massimino M, Sciacca L, Parrinello NL, Scalisi NM, Belfiore A, Vigneri R, Vigneri P. Insulin Receptor Isoforms Differently Regulate Cell Proliferation and Apoptosis in the Ligand-Occupied and Unoccupied State. *International journal of molecular sciences* 2021; 22.
- 110 Anbarasu S, Anbarasu A. Cancer-biomarkers associated with sex hormone receptors and recent therapeutic advancements: a comprehensive review. *Med Oncol* 2023; 40.
- 111 Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. *Cancer letters* 2011; 300: 1–9.
- 112 Hua H, Kong Q, Yin J, Zhang J, Jiang Y. Insulin-like growth factor receptor signaling in tumorigenesis and drug resistance: a challenge for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology* 2020; 13: 64.
- 113 Hakuno F, Takahashi S-I. IGF1 receptor signaling pathways. *Journal of molecular endocrinology* 2018; 61: T69-T86.
- 114 Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, Hideshima T, Chauhan D, Joseph M, Libermann TA, García-Echeverría C, Pearson MA, Hofmann F, Anderson KC, Kung AL. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer cell* 2004; 5: 221–230.
- 115 Hou C-H, Hou S-M, Tang C-H. Ultrasound increased BMP-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun, and AP-1 pathways in cultured osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry* 2009; 106: 7–15.
- 116 Botelho MC, Crespo M, Almeida A, Vieira P, Delgado ML, Araujo L, Machado JC, Da Correia Costa JM. *Schistosoma haematobium* and *Schistosomiasis mansoni*: production of an estradiol-related compound detected by ELISA. *Experimental parasitology* 2009; 122: 250–253.
- 117 Church DR, Lee E, Thompson TA, Basu HS, Ripple MO, Ariazi EA, Wilding G. Induction of AP-1 activity by androgen activation of the androgen receptor in LNCaP human prostate carcinoma cells. *The Prostate* 2005; 63: 155–168.

- 118 Albasri AM, Elkablawy MA. Clinicopathological and prognostic significance of androgen receptor overexpression in colorectal cancer. Experience from Al-Madinah Al-Munawarah, Saudi Arabia. *Saudi medical journal* 2019; 40: 893–900.
- 119 Refaat B, Aslam A, Idris S, Almalki AH, Alkhalidi MY, Asiri HA, Almaimani RA, Mujalli A, Minshawi F, Alamri SA, AlHussain MI, Baltow BA, Alqasmi MH, Basfar GT, Alosaimi OM, Muhayya IA. Profiling estrogen, progesterone, and androgen receptors in colorectal cancer in relation to gender, menopausal status, clinical stage, and tumour sidedness. *Frontiers in endocrinology* 2023; 14: 1187259.
- 120 Leung JK, Sadar MD. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Frontiers in endocrinology* 2017; 8: 2.
- 121 Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen Receptor Signaling in Bladder Cancer. *Cancers* 2017; 9.
- 122 Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010; 42: 813–827.
- 123 Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of hygiene* 1928; 27: 113–159.
- 124 Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *The Journal of experimental medicine* 1944; 79: 137–158.
- 125 Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology* 1970; 53: 159–162.
- 126 Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 1983; 166: 557–580.
- 127 Louise H. Naylor. Reporter Gene Technology: The Future Looks Bright.
- 128 Gholam Reza Salehi Jouzani, Irina Vasilievna Goldenkova. A New Reporter Gene Technology: Opportunities and Perspectives. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY* 2005; Vol.3.
- 129 Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS, Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical biochemistry* 1994; 219: 169–181.
- 130 Brogan J, Li F, Li W, He Z, Huang Q, Li C-Y. Imaging molecular pathways: reporter genes. *Radiation research* 2012; 177: 508–513.
- 131 Kant P, Hull MA. Excess body weight and obesity--the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 2011; 8: 224–238.

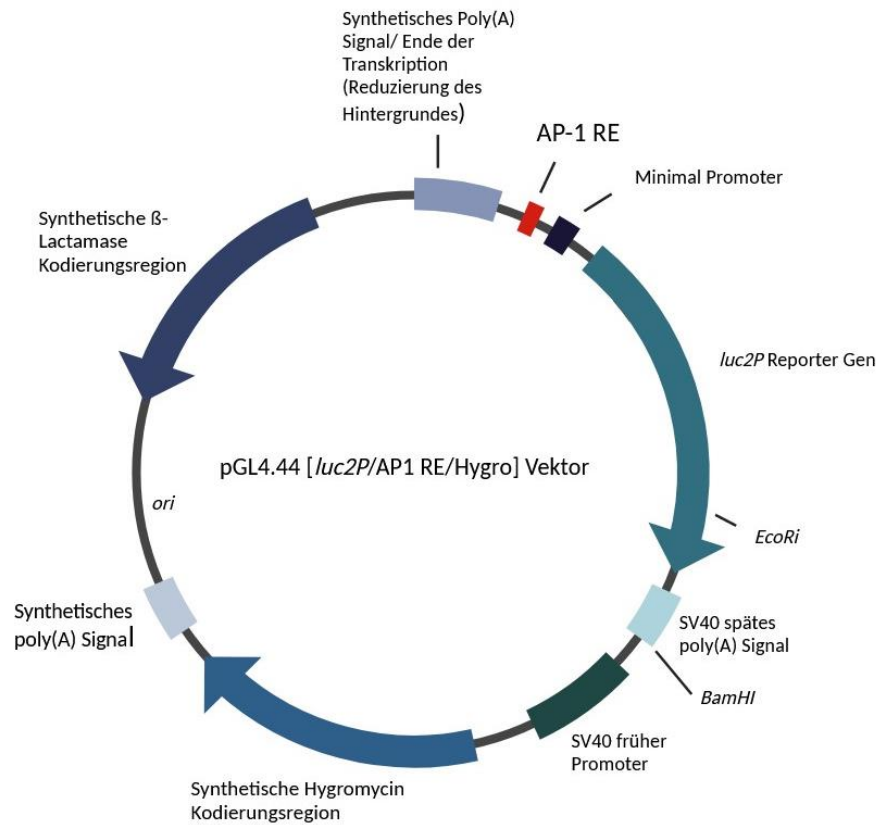
- 132 Qiu D-C, Hubbard AE, Zhong B, Zhang Y, Spear RC. A matched, case-control study of the association between *Schistosoma japonicum* and liver and colon cancers, in rural China. *Annals of tropical medicine and parasitology* 2005; 99: 47–52.
- 133 Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatitis B virus large surface protein: function and fame. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 2015; 4: 1–10.
- 134 Wang Z, Du Z, Liu Y, Wang W, Liang M, Zhang A, Yang J. Comparison of the clinicopathological features and prognoses of patients with schistosomal and nonschistosomal colorectal cancer. *Oncology letters* 2020; 19: 2375–2383.
- 135 Ashida R, Tominaga K, Sasaki E, Watanabe T, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Mitsuyama S, Iwao H, Arakawa T. AP-1 and colorectal cancer. *Inflammopharmacology* 2005; 13: 113–125.
- 136 Gao Y, Huang Y, Zhao Y, Hu Y, Li Z, Guo Q, Zhao K, Lu N. LL202 protects against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice by inhibiting MAPK/AP-1 signaling. *Oncotarget* 2016; 7: 63981–63994.
- 137 Bhosale PB, Kim HH, Abusaliya A, Vetrivel P, Ha SE, Park MY, Lee HJ, Kim GS. Structural and Functional Properties of Activator Protein-1 in Cancer and Inflammation. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2022; 2022: 9797929.
- 138 Varyani F, Fleming JO, Maizels RM. Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2017; 312: G537-G549.
- 139 Bodammer P, Waitz G, Loebermann M, Holtfreter MC, Maletzki C, Krueger MR, Nizze H, Emmrich J, Reisinger EC. *Schistosoma mansoni* infection but not egg antigen promotes recovery from colitis in outbred NMRI mice. *Digestive diseases and sciences* 2011; 56: 70–78.
- 140 Moreels TG, Nieuwendijk RJ, Man JG de, Winter BY de, Herman AG, van Marck EA, Pelckmans PA. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut* 2004; 53: 99–107.
- 141 Heylen M, Ruysers NE, Man JG de, Timmermans J-P, Pelckmans PA, Moreels TG, Winter BY de. Worm proteins of *Schistosoma mansoni* reduce the severity of experimental chronic colitis in mice by suppressing colonic proinflammatory immune responses. *PloS one* 2014; 9: e110002.
- 142 Asahi H, Hernandez HJ, Stadecker MJ. A novel 62-kilodalton egg antigen from *Schistosoma mansoni* induces a potent CD4(+) T helper cell response in the C57BL/6 mouse. *Infection and immunity* 1999; 67: 1729–1735.
- 143 Mbanefo EC, Agbo CT, Zhao Y, Lamanna OK, Thai KH, Karinshak SE, Khan MA, Fu C-L, Odegaard JI, Saltikova IV, Smout MJ, Pennington LF, Nicolls MR,

- Jardetzky TS, Loukas A, Brindley PJ, Falcone FH, Hsieh MH. IPSE, an abundant egg-secreted protein of the carcinogenic helminth *Schistosoma haematobium*, promotes proliferation of bladder cancer cells and angiogenesis. *Infectious agents and cancer* 2020; 15: 63.
- 144 Ferguson BJ, Newland SA, Gibbs SE, Tourlomousis P, Fernandes dos Santos P, Patel MN, Hall SW, Walczak H, Schramm G, Haas H, Dunne DW, Cooke A, Zaccone P. The *Schistosoma mansoni* T2 ribonuclease omega-1 modulates inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in macrophages. *International journal for parasitology* 2015; 45: 809–813.
- 145 Everts B, Perona-Wright G, Smits HH, Hokke CH, van der Ham AJ, Fitzsimmons CM, Doenhoff MJ, van der Bosch J, Mohrs K, Haas H, Mohrs M, Yazdanbakhsh M, Schramm G. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *The Journal of experimental medicine* 2009; 206: 1673–1680.
- 146 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: 1753-67, S1.
- 147 Steinfeld S, Andersen JF, Cannons JL, Feng CG, Joshi M, Dwyer D, Caspar P, Schwartzberg PL, Sher A, Jankovic D. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of experimental medicine* 2009; 206: 1681–1690.
- 148 Hagen J, Young ND, Every AL, Pagel CN, Schnoeller C, Scheerlinck J-PY, Gasser RB, Kalinna BH. Omega-1 knockdown in *Schistosoma mansoni* eggs by lentivirus transduction reduces granuloma size in vivo. *Nature communications* 2014; 5: 5375.
- 149 Durai R, Yang W, Gupta S, Seifalian AM, Winslet MC. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *International journal of colorectal disease* 2005; 20: 203–220.
- 150 Vigneri PG, Tirrò E, Pennisi MS, Massimino M, Stella S, Romano C, Manzella L. The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. *Frontiers in oncology* 2015; 5: 230.
- 151 Reinmuth N, Liu W, Fan F, Jung YD, Ahmad SA, Stoeltzing O, Bucana CD, Radinsky R, Ellis LM. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002; 8: 3259–3269.
- 152 Zhang R, Xu G-L, Li Y, He L-J, Chen L-M, Wang G-B, Lin S-Y, Luo G-Y, Gao X-Y, Shan H-B. The role of insulin-like growth factor 1 and its receptor in the formation and development of colorectal carcinoma. *The Journal of international medical research* 2013; 41: 1228–1235.

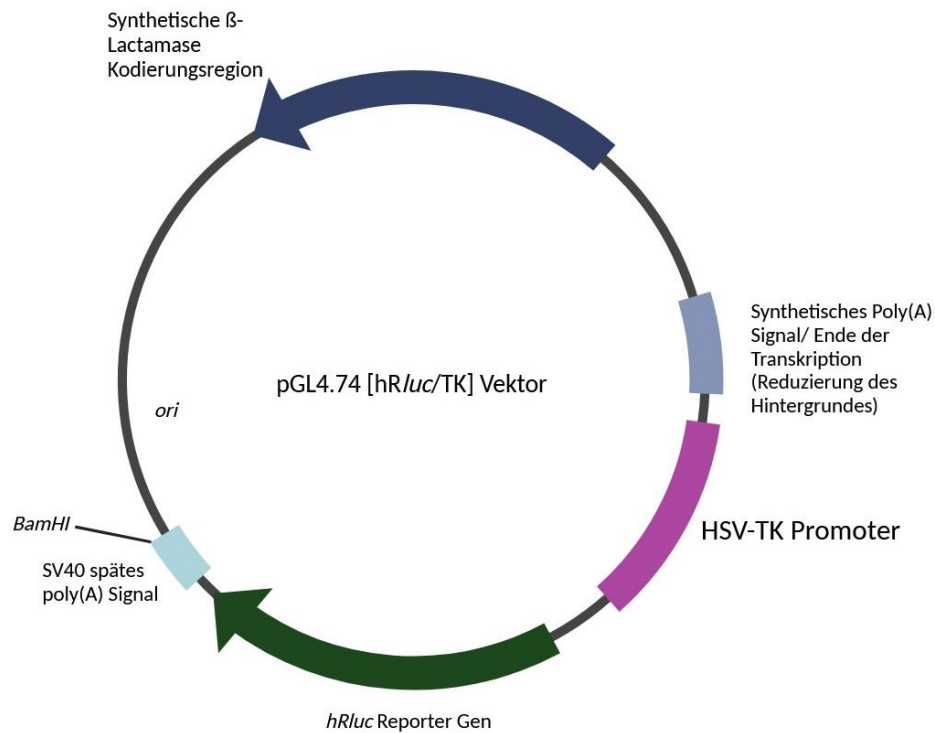
- 153 Heckl SM, Pellinghaus M, Krüger S, Bosselmann C, Wilhelm F, Behrens H-M, Schreiber S, Röcken C. Epithelial insulin receptor expression-prognostic relevance in colorectal cancer. *Oncotarget* 2018; 9: 37497–37508.
- 154 Abbruzzese C, Diodoro MG, Sperduti I, Mileo AM, Pattaro G, Salvo L de, Cosimelli M, Perrotti N, Paggi MG. Detection of phosphorylated insulin receptor in colorectal adenoma and adenocarcinoma: implications for prognosis and clinical outcome. *Journal of cellular physiology* 2015; 230: 562–567.
- 155 Husaarts L, García-Tardón N, Beek L, Heemskerk MM, Haerberlein S, Zon GC, Ozir-Fazalalikhani A, Berbée JFP, Dijk KW, Harmelen V, Yazdanbakhsh M, Guigas B. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *FASEB j.* 2015; 29: 3027–3039.
- 156 Wolde M, Berhe N, Medhin G, Chala F, van Die I, Tsegaye A. Inverse Associations of *Schistosoma mansoni* Infection and Metabolic Syndromes in Humans: A Cross-Sectional Study in Northeast Ethiopia. *Microbiology insights* 2019; 12: 1178636119849934.
- 157 Shen S-W, Lu Y, Li F, Shen Z-H, Xu M, Yao W-F, Feng Y-B, Yun J-T, Wang Y-P, Ling W, Qi H-J, Tong D-X. The potential long-term effect of previous schistosome infection reduces the risk of metabolic syndrome among Chinese men. *Parasite immunology* 2015; 37: 333–339.
- 158 Chen Y, Lu J, Huang Y, Wang T, Xu Y, Xu M, Li M, Wang W, Li D, Bi Y, Ning G. Association of previous schistosome infection with diabetes and metabolic syndrome: a cross-sectional study in rural China. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013; 98: E283-7.
- 159 Stebbings WS, Farthing MJ, Puddefoot JR, Anderson E, Vinson GP, Northover JM, Wood RF. Androgen receptors in colorectal adenomas. *Journal of cancer research and clinical oncology* 1988; 114: 208–211.
- 160 Setia S, Nehru B, Sanyal SN. Upregulation of MAPK/Erk and PI3K/Akt pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2014; 68: 1023–1029.
- 161 Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet. Oncology* 2005; 6: 322–327.
- 162 Zhang J, Chen Y-H, Lu Q. Pro-oncogenic and anti-oncogenic pathways: opportunities and challenges of cancer therapy. *Future Oncology* 2010; 6: 587–603.
- 163 Pranteda A, Piastra V, Stramucci L, Fratantonio D, Bossi G. The p38 MAPK Signaling Activation in Colorectal Cancer upon Therapeutic Treatments. *International journal of molecular sciences* 2020; 21.
- 164 Bardelčíková A, Šoltys J, Mojžiš J. Oxidative Stress, Inflammation and Colorectal Cancer: An Overview. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2023; 12.

- 165 Marra M, Sordelli IM, Lombardi A, Lamberti M, Tarantino L, Giudice A, Stiuso P, Abbruzzese A, Sperlongano R, Accardo M, Agresti M, Caraglia M, Sperlongano P. Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *Journal of translational medicine* 2011; 9: 171.
- 166 Abd Ellah MR. Involvement of free radicals in parasitic infestations. *Journal of Applied Animal Research* 2013; 41: 69–76.
- 167 Smith NC, Bryant C. Free radical generation during primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite immunology* 1989; 11: 147–160.
- 168 Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions. *International journal for parasitology* 2004; 34: 163–189.
- 169 Salim EI, Morimura K, Menesi A, El-Lity M, Fukushima S, Wanibuchi H. Elevated oxidative stress and DNA damage and repair levels in urinary bladder carcinomas associated with schistosomiasis. *International journal of cancer* 2008; 123: 601–608.
- 170 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239–247.
- 171 Pascal M, Abdallahi OM, Elwali NE, Mergani A, Qurashi MA, Magzoub M, Reggi M de, Gharib B. Hyaluronate levels and markers of oxidative stress in the serum of Sudanese subjects at risk of infection with *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; 94: 66–70.
- 172 Loguercio C, Di Pierro M. The role of glutathione in the gastrointestinal tract: a review. *Italian journal of gastroenterology and hepatology* 1999; 31: 401–407.
- 173 Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, Del Vecchio Blanco C. Glutathione supplementation improves oxidative damage in experimental colitis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2003; 35: 635–641.
- 174 Oliveira KC, Cardoso R, Dos Santos AC, Fernandes R, Botelho MC. Imbalance of Steroid Hormones in Hamsters Infected with *Schistosoma mansoni*. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 2019; 19: 1122–1126.
- 175 Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* 2012; 4: 429–434.
- 176 Gressner AM, Arndt T (Hrsg. 2019). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Third edition Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
- 177 Lallemand C, Kavrochorianou N, Steenholdt C, Bendtzen K, Ainsworth MA, Meritet J-F, Blanchard B, Lebon P, Taylor P, Charles P, Alzabin S, Tovey MG. Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF $\alpha$  antagonists. *Journal of immunological methods* 2011; 373: 229–239.

## 11 Anhang



**Abbildung 24: Plasmid AP-1 (pGL4.44 [*luc2P*/AP1 RE/Hygro]).** (nach dem Herstellerprotokoll erstellt mit BioRender)



**Abbildung 25: Plasmid TK (pGL4.74[*hRluc*/TK]).** (nach dem Herstellerprotokoll erstellt mit BioRender)

SW620 unbehandelt Kontrolle	SW620* DMSO SEA	SW620* DMSO PBS	SW620* Inhibitor 1 SEA	SW620* Inhibitor 1 PBS	SW620* Inhibitor 2 SEA	SW620* Inhibitor 2 PBS			
SW620 unbehandelt Kontrolle	SW620* DMSO SEA	SW620* DMSO PBS	SW620* Inhibitor 1 SEA	SW620* Inhibitor 1 PBS	SW620* Inhibitor 2 SEA	SW620* Inhibitor 2 PBS			
SW620 unbehandelt Kontrolle	SW620* DMSO SEA	SW620* DMSO PBS	SW620* Inhibitor 1 SEA	SW620* Inhibitor 1 PBS	SW620* Inhibitor 2 SEA	SW620* Inhibitor 2 PBS			
			SW620* Inhibitor 3 SEA	SW620* Inhibitor 3 PBS	SW620* Inhibitor 4 SEA	SW620* Inhibitor 4 PBS			
			SW620* Inhibitor 3 SEA	SW620* Inhibitor 3 PBS	SW620* Inhibitor 4 SEA	SW620* Inhibitor 4 PBS			
			SW620* Inhibitor 3 SEA	SW620* Inhibitor 3 PBS	SW620* Inhibitor 4 SEA	SW620* Inhibitor 4 PBS			

\*= transfiziert  
SEA: jeweils 0,5 µl  
PBS: jeweils 0,5 µl

**Abbildung 26: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporteragen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen – Inhibitionsversuche.**

SW620 unbehandelt Kontrolle	SW620* DMSO PBS 1	SW620* SEA 1 Konz. 1	SW620* SEA 1 Konz. 2	SW620* SEA 1 Konz. 3	SW620* SEA 1 Konz. 4				
SW620 unbehandelt Kontrolle	SW620* DMSO PBS 1	SW620* SEA 1 Konz. 1	SW620* SEA 1 Konz. 2	SW620* SEA 1 Konz. 3	SW620* SEA 1 Konz. 4				
SW620 unbehandelt Kontrolle	SW620* DMSO PBS 1	SW620* SEA 1 Konz. 1	SW620* SEA 1 Konz. 2	SW620* SEA 1 Konz. 3	SW620* SEA 1 Konz. 4				
	SW620* DMSO PBS 2	SW620* SEA 2 Konz. 1	SW620* SEA 2 Konz. 2	SW620* SEA 2 Konz. 3	SW620* SEA 2 Konz. 4				
	SW620* DMSO PBS 2	SW620* SEA 2 Konz. 1	SW620* SEA 2 Konz. 2	SW620* SEA 2 Konz. 3	SW620* SEA 2 Konz. 4				
	SW620* DMSO PBS 2	SW620* SEA 2 Konz. 1	SW620* SEA 2 Konz. 2	SW620* SEA 2 Konz. 3	SW620* SEA 2 Konz. 4				

\* = transfiziert  
Konz. 1= 1 µl/ mL  
Konz. 2= 5 µl/ mL  
Konz. 3= 10 µl/ mL  
Konz.4 = 15 µl/ mL

**Abbildung 27: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporteragen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen – SEA-Konzentrationsreihen.**

SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* Medium		SW620* <i>S. mansoni</i> - Eier Konz. 1		SW620* <i>S. mansoni</i> - Eier Konz. 2								
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* Medium		SW620* <i>S. mansoni</i> - Eier Konz. 1		SW620* <i>S. mansoni</i> - Eier Konz. 2								
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* Medium		SW620* <i>S. mansoni</i> - Eier Konz. 1		SW620* <i>S. mansoni</i> - Eier Konz. 2								

\* = transfiziert  
Konz. 1= 30 Eier  
Konz. 2= 40 Eier

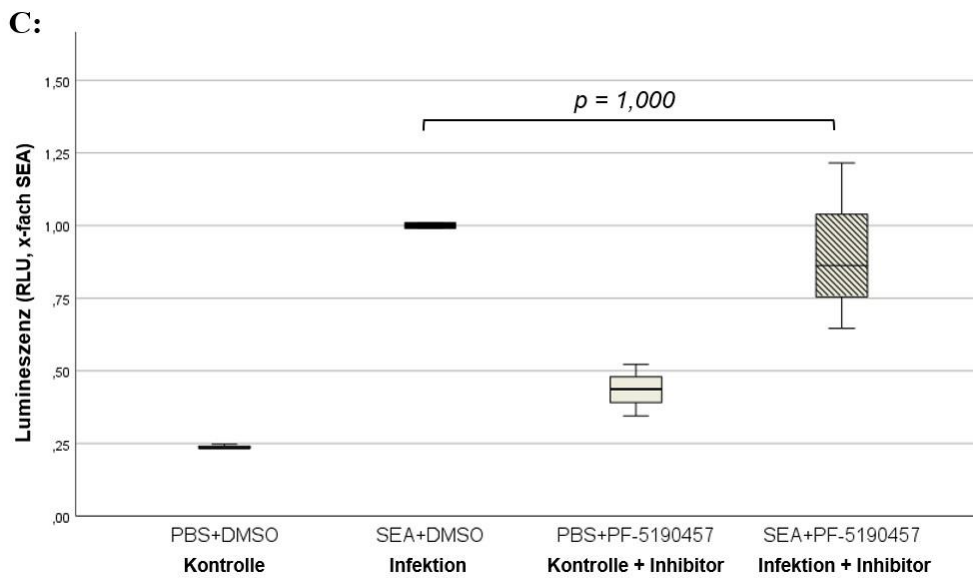
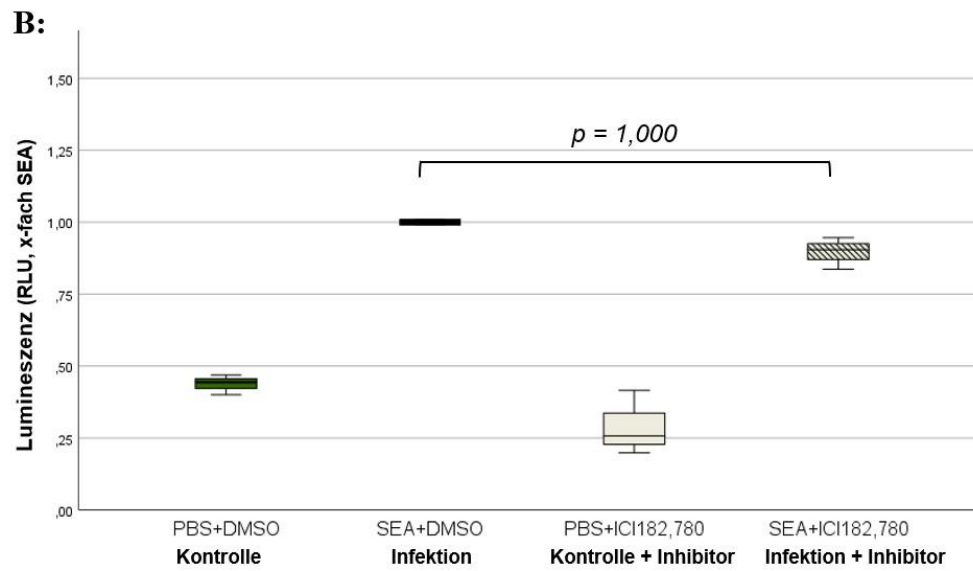
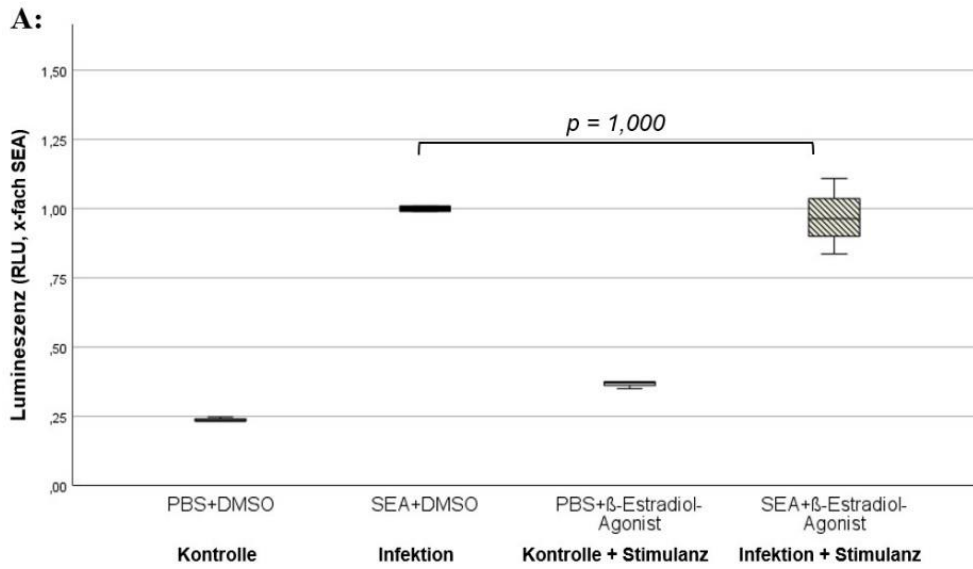
**Abbildung 28: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporteragen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen - Kokultur mit *S. mansoni*-Eiern.**

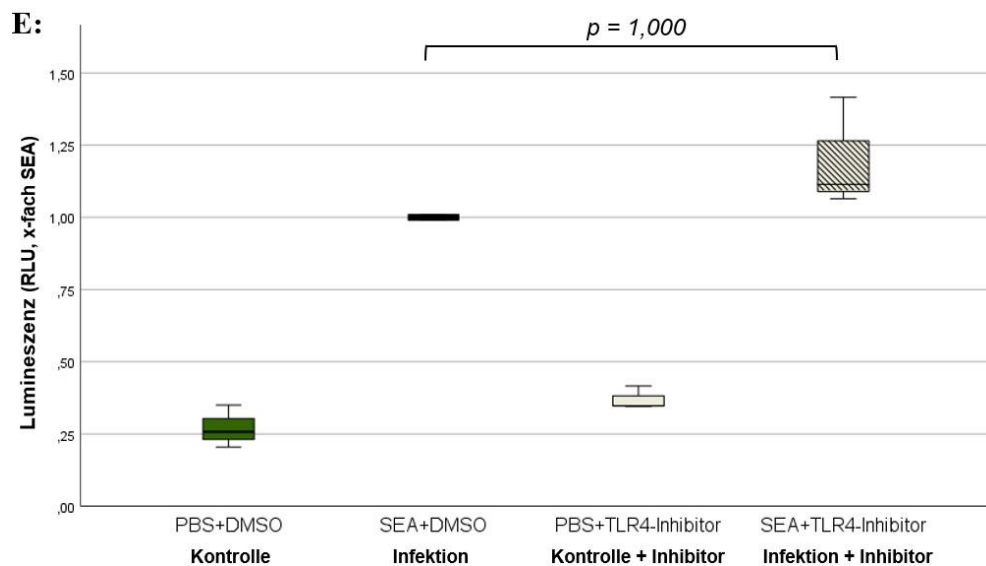
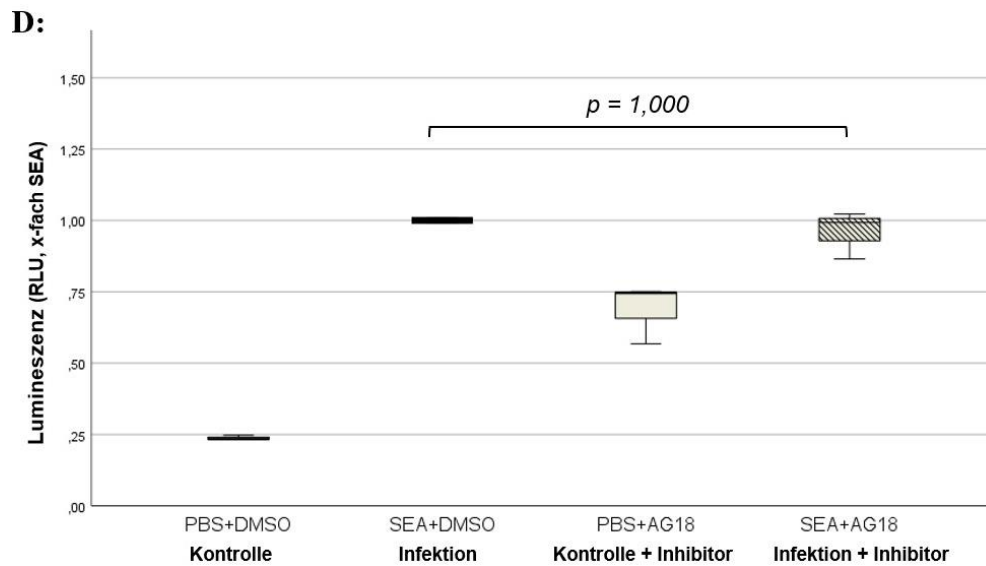
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* DMSO SEA		SW620* DMSO PBS		SW620* Frak. B1		SW620* Frak. B2		SW620* Frak. B3		SW620* Frak. B4		SW620* Frak. B5		SW620* Frak. B6		SW620* Frak. B7	
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* DMSO SEA		SW620* DMSO PBS		SW620* Frak. B1		SW620* Frak. B2		SW620* Frak. B3		SW620* Frak. B4		SW620* Frak. B5		SW620* Frak. B6		SW620* Frak. B7	
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* DMSO SEA		SW620* DMSO PBS		SW620* Frak. B1		SW620* Frak. B2		SW620* Frak. B3		SW620* Frak. B4		SW620* Frak. B5		SW620* Frak. B6		SW620* Frak. B7	
						SW620* Frak. B8		SW620* Frak. B9		SW620* Frak. B10		SW620* Frak. B11		SW620* Frak. B12		SW620* Frak. B13		SW620* Frak. B15	
						SW620* Frak. B8		SW620* Frak. B9		SW620* Frak. B10		SW620* Frak. B11		SW620* Frak. B12		SW620* Frak. B13		SW620* Frak. B15	
						SW620* Frak. B8		SW620* Frak. B9		SW620* Frak. B10		SW620* Frak. B11		SW620* Frak. B12		SW620* Frak. B13		SW620* Frak. B15	

SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* DMSO SEA		SW620* DMSO PBS		SW620* Frak. C1		SW620* Frak. C2		SW620* Frak. C3		SW620* Frak. C4		SW620* Frak. C5		SW620* Frak. C6		SW620* Frak. C7		
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* DMSO SEA		SW620* DMSO PBS		SW620* Frak. C1		SW620* Frak. C2		SW620* Frak. C3		SW620* Frak. C4		SW620* Frak. C5		SW620* Frak. C6		SW620* Frak. C7		
SW620 unbehandelt Kontrolle		SW620* DMSO SEA		SW620* DMSO PBS		SW620* Frak. C1		SW620* Frak. C2		SW620* Frak. C3		SW620* Frak. C4		SW620* Frak. C5		SW620* Frak. C6		SW620* Frak. C7		
						SW620* Frak. C8		SW620* Frak. C9		SW620* Frak. C10		SW620* Frak. C11		SW620* Frak. C12		SW620* Frak. C13		SW620* Frak. C14		SW620* Frak. C15
						SW620* Frak. C8		SW620* Frak. C9		SW620* Frak. C10		SW620* Frak. C11		SW620* Frak. C12		SW620* Frak. C13		SW620* Frak. C14		SW620* Frak. C15
						SW620* Frak. C8		SW620* Frak. C9		SW620* Frak. C10		SW620* Frak. C11		SW620* Frak. C12		SW620* Frak. C13		SW620* Frak. C14		SW620* Frak. C15

\* = transfiziert

**Abbildung 29: Beispielhafte Plattenbelegung der 96-Well-Platten für ein Reporteragen-Assay mit transfizierten SW620-Zellen - SEA-Fraktionen.**





**Abbildung 30: Gleichbleiben der SEA-induzierten AP-1-Promotoraktivität bei Anwendung verschiedener Inhibitoren und Stimulanzien im Screening.** SW620-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem AP-1-Reportergen mit den aufgeführten Inhibitoren und Stimulanzien behandelt. Zur Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit DMSO, dem Lösungsmittel des Inhibitors. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen für 24 Stunden mit SEA (Konzentration von 15  $\mu$ l/ mL; = „Infektion“) oder PBS (= „Kontrolle“) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels des Reportergen-Assays. Die statistische Analyse der normierten Lumineszenzwerte erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Test. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in einem Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. **A)** Stimulation mittels des Endogener Östrogenrezeptor-Agonisten  $\beta$ -Estradiol, Endkonzentration 100 nM. **B)** Inhibition mittels des Östrogenrezeptor-Antagonist ICI 182,780, Endkonzentration 100 nM. **C)** Stimulation mittels des Inversen Ghrelin Rezeptor-Agonisten PF-5190457, Endkonzentration 10  $\mu$ M. **D)** Inhibition mittels des EGFR und PDGFR- Kinase-Inhibitors AG 18, Endkonzentration 10  $\mu$ M. **E)** Inhibition mittels eines TLR4-Inhibitors, Endkonzentration 1  $\mu$ g/mL. **A)** bis **E)** Es lag jeweils keine Verminderung der durch SEA induzierten AP-1-Promotoraktivität vor ( $p=1,000$ ),  $n=3$ .

## 12 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter den folgenden Titeln veröffentlicht:

### Originalarbeiten:

Von Bülow V, Gindner S, Baier A, Hehr L, Buss N, Russ L, Wrobel S, **Wirth V**, Tabatabai K, Quack T, Haerberlein S, Kadesch P, Gerbig S, Wiedemann KR, Spengler B, Mehl A, Morlock G, Schramm G, Pons-Kühnemann J, Falcone FH, Wilson RA, Bankov K, Wild P, Grevelding CG, Roeb E, Roderfeld M. Metabolic reprogramming of hepatocytes by *Schistosoma mansoni* eggs. *JHEP reports : innovation in hepatology* 2023; 5: 100625. DOI: 10.1016/j.jhepr.2022.100625. PMID: 36590323; PMCID: PMC9800334.

### Publizierte Abstracts:

**Wirth V**, von Bülow V, Hehr L, Russ L, Tabatabai K, Baier A, Strassmann J, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Antigene von *Schistosoma mansoni* Eiern induzieren eine AP-1-Aktivierung in Enterozyten über den Insulin-like growth factor 1-Rezeptor. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2021; 59: e150–e324. DOI: 10.1055/s-0041-1733543, Abstract und Kongressvortrag DGVS- (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) Kongress Leipzig 2021, Sprecherin: **Wirth V**.

**Wirth V**, von Bülow V, Hehr L, Russ L, Baier A, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Insulin-like growth factor 1 receptor and insulin receptor mediate AP-1-activation in enterocytes stimulated with parasite antigens. *Z Gastroenterol* 2021; 60: e1–e55. DOI: 10.1055/s-0041-1740727, Abstract und Kongressvortrag GASL- (German Association of the Study of the Liver) Kongress 2022, Sprecherin: **Wirth V**.

### Nicht publizierte Abstracts:

**Wirth V**, von Bülow V, Hehr L, Russ L, Tabatabai K, Baier A, Strassmann J, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Wie Infektionen mit parasitären Würmern die Entstehung von Krebs fördern könnten - erste Hinweise auf Signalwege und Transkriptionsfaktoren, Abstract und Vortrag Science Day Justus-Liebig-Universität Gießen 2021, Sprecherin: **Wirth V**.

**Wirth V**, von Bülow V, Hehr L, Russ L, Baier A, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Functional activation of the insulin-like growth factor 1 receptor IGF1-R and insulin receptor IR following stimulation with parasite antigens. Abstract und Präsentation FALK Foundation-Symposium 2022, Sprecherin: **Wirth V**.

## 13 Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung zur Dissertation

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

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 14 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mich auf meinem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Elke Roeb für die hervorragende Betreuung und das mir entgegengebrachte Vertrauen danken. Zu jeder Zeit stand sie mir mit ihrer fachlichen Expertise und wertvollen Anregungen zur Seite.

Mein großer Dank gilt außerdem Frau Dr. Verena von Bülow und Herrn Dr. Martin Roderfeld für die kompetente Begleitung in der experimentellen Phase und während des Verfassens dieser Arbeit. Vielen Dank auch an meine weiteren Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Prof. Roeb für die ausgezeichnete Einarbeitung und die harmonische Zusammenarbeit. Ich behalte meine Zeit im Labor besonders wegen des großartigen Teams in bester Erinnerung.

Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die fachkundige statistische Beratung.

Ganz besonders danke ich meiner Familie sowie meinen Freundinnen und Freunden. Ich weiß eure liebevolle Unterstützung sehr zu schätzen. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.