

Aktivierung des Protoonkogens c-Jun durch *Schistosoma mansoni*-Ei-Antigene

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

vorgelegt von Wolters, Friederike Caroline Christine
aus Dresden

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Schwerpunkt
Gastroenterologie

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

Gutachter: PD Dr. Hain

Tag der Disputation: 07.07.2023

*Meinen Eltern
Gerda und Manfred Wolters*

*Meiner Freundin und Laborkollegin
Laura Hehr †*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1	<i>Schistosomiasis</i>	1
1.1.1	Epidemiologie der Schistosomiasis	1
1.1.2	Pathogenese der Schistosomiasis	2
1.1.3	Klinik und Folgen der Schistosomiasis	6
1.1.4	Diagnostik der Schistosomiasis	7
1.1.5	Behandlungsstrategien bei Schistosomiasis	8
1.2	<i>Übersicht Darm</i>	8
1.2.1	Makroskopische Anatomie des Darms	8
1.2.2	Histologie des Darms	8
1.2.3	Funktion des Darms	9
1.3	<i>Kolorektales Karzinom</i>	10
1.3.1	Epidemiologie	10
1.3.2	Präkanzerosen des KRK	10
1.3.3	Molekulare Mechanismen der Karzinomentstehung	13
1.4	<i>Infektiöse Erkrankungen und Neoplasie</i>	15
1.4.1	Allgemeine Mechanismen	15
1.4.2	<i>S. mansoni</i> -assoziierte Kolitis und Karzinogenese	16
1.5	<i>AP-1-Transkriptionsfaktor c-Jun</i>	18
1.6	<i>Cyclin D1</i>	20
1.7	<i>Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit</i>	22
2	Material und Methoden	23
2.1	<i>Geräte und Materialien</i>	23
2.2	<i>Methoden</i>	36
2.2.1	Tiermodell	36
2.2.2	Zellkultur	38
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	40
2.2.4	Histologische Methoden	43
2.2.5	Statistische Auswertung	45
3	Ergebnisse	47
3.1	<i>S. mansoni</i> -induzierte granulomatöse Entzündung im Kolon infizierter Hamster	47
3.2	<i>Aktivierung des Protoonkogens c-Jun in Kolonzellen im Hamster-Modell</i>	49
3.3	<i>Nukleäre Translokation von c-Jun in Kolonepithelzellen nahe der Parasiteneier</i>	52

3.4	<i>Erhöhte Expression von Cyclin D1 in Kolonzellen im Hamster-Modell</i>	53
3.5	<i>Erhöhte Expression von Cyclin D1 in Kolonepithelzellen nahe der Parasiteneier</i>	56
3.6	<i>Mechanistische Untersuchungen in Zellkultur (Colon 26-Zellen)</i>	57
3.6.1	Konzentrations-/ und zeitabhängige c-Jun-Aktivierung nach Stimulation mit SEA58	
3.6.2	Inhibitionsversuche mit JNK-/ und MEK-Inhibitoren an stimulierten Colon 26-Zellen	59
4	Diskussion	66
4.1	<i>Schistosoma mansoni-induzierte granulomatöse Kolitis in Hamstern</i>	67
4.2	<i>S. mansoni-Infektion und Karzinogenese</i>	68
4.3	<i>Aktivierung des Protoonkogens c-Jun und des Downstream-Faktors Cyclin D1 im Hamster-Modell</i>	69
4.3.1	c-Jun	69
4.3.2	Cyclin D1	71
4.4	<i>Aktivierung von c-Jun und Expression von Cyclin D1 nach Stimulation mit SEA im Zellkulturmodell</i>	73
4.5	<i>JNK II/MEK VI-Inhibition in Colon 26-Zellen – Mögliche mechanistische Erklärungen der c-Jun-Aktivierung</i>	76
4.6	<i>Ausblick und Anwendung</i>	78
4.7	<i>Limitationen der Arbeit</i>	78
5	Zusammenfassung	79
6	Summary	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Publikationen und Kongressbeiträge	93
9	Anhang	94
10	Erklärung zur Dissertation	98
11	Danksagung	99
12	Tabellarischer Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

3R	Replace, Reduce, Refine
AP-1	Aktivator-Protein 1
APC	Adenomatous Polyposis coli Gene
ATF	Activating Transcription Factor
bs	bisex
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin (Bereich im Erbgut)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
ECL	Elektrochemilumineszenz
G1-Phase	Gap-1-Phase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCC	Hepatocelluläres Carcinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HGIEN	hochgradige intraepitheliale Neoplasie
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KRK	Kolorektales Karzinom
LGIEN	leichtgradige intraepitheliale Neoplasien
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
ms	monosex
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RE	Response-elemente
Rpm	Rounds per minute
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid

S.	Schistosoma
SDS PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEA	Schistosoma mansoni-Soluble Egg Antigens
SmCKPB	S. mansoni Chemokine binding protein
TBS-T	Tris-Buffered Saline with Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TH	T-Helferzelle
WHO	World Health Organization

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einteilung benigner epithelialer Tumore
Tabelle 2	Geräte
Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 4	Chemikalien und Reagenzien
Tabelle 5	Puffer und ihre Zusammensetzung
Tabelle 6	Primärantikörper Western Blot
Tabelle 7	Sekundärantikörper Western Blot
Tabelle 8	Primärantikörper/ Antikörper Isotypkontrolle
Tabelle 9	Sekundärantikörper Immunhistochemie
Tabelle 10	Kommerzielle Kits
Tabelle 11	Stimulanzen und Inhibitoren
Tabelle 12	Zelllinie- Charakteristika Colon 26
Tabelle 13	Aufbau Versuchsgruppen mit Nummer, Geschlecht und Art der Infektion (bisex infiziert/ monosex infiziert)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Lebenszyklus der Schistosomen
Abbildung 2	Schematische Darstellung klassischer Adenomtypen mit ausgewähltem Beispiel
Abbildung 3	Adenom-Karzinom-Sequenz mit den zugrunde liegenden molekularen Alterationen nach Fearon & Vogelstein
Abbildung 4	Regulatorische Mechanismen von AP-1/c-Jun über den JNK- und ERK-Signalweg
Abbildung 5	Schematische Darstellung des Zellzyklus
Abbildung 6	Versuchsaufbau und Infektionsmodus

- Abbildung 7 Masson-Goldner-Färbung eines histologischen Paraffinschnitts des Kolons eines bisex infizierten Hamsters
- Abbildung 8 Masson-Goldner-Färbungen histologischer Paraffinschnitte des Kolons eines bisex und eines monosex infizierten Hamsters
- Abbildung 9 Western Blot-Analyse der kolorektalen c-Jun-Aktivierung im Hamster-Modell
- Abbildung 10 Immunhistochemische Färbung von c-Jun mit AP und Kernfärbung durch Hämalaun Sauer nach Meyer am Kolonschnitt bisex und monosex infizierter Hamster
- Abbildung 11 Semiquantitative Western Blot-Analyse der Cyclin D1-Expression in Kolonzellen im Hamster-Modell
- Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung von Cyclin D1 mit DAB und Kernfärbung durch Methylgrün am Kolonschnitt bisex und monosex infizierter Hamster
- Abbildung 13 Western Blot-Analyse der c-Jun-Aktivierung in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA
- Abbildung 14 Western Blot-Analyse der c-Jun-Aktivierung in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. JNK-Inhibition (SP600125)
- Abbildung 15 Western Blot-Analyse Cyclin D1-Expression in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. JNK-Inhibition (SP600125)
- Abbildung 16 Western Blot-Analyse der c-Jun-Aktivierung in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. MEK-VI-Inhibition
- Abbildung 17 Western Blot-Analyse Cyclin D1-Expression in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. MEK-VI-Inhibition
- Abbildung 18 Schematische Zusammenfassung der bisherigen Daten über S. mansoni-Ei-Antigene und Entstehung des CRC
- Abbildung 19 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit
- Abbildung 20 Vergleich der ss (singlesex) und der bs (bisex) Gruppe mittels Mann-Whitney-U-Test
- Abbildung 21 Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test der Inhibitionsversuche
- Abbildung 22 Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen mit Kruskal-Wallis-Test für das Proteinverhältnis p-c-Jun/GAPDH
- Abbildung 23 Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen mit Kruskal-Wallis-Test für das Proteinverhältnis c-Jun/GAPDH
- Abbildung 24 Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen mit Kruskal-Wallis-Test für das Proteinverhältnis Cyclin D1/GAPDH

1 Einleitung und Zielsetzung

Schistosomiasis ist eine parasitäre Infektionserkrankung und gehört zu den sogenannten vernachlässigten Tropenkrankheiten (NTD, engl. neglected tropical diseases). Nach Malaria ist Schistosomiasis weltweit die zweithäufigste Parasitose¹. Die Mortalität durch Schistosomiasis wird auf 200 000 Todesfälle pro Jahr geschätzt². Eine Infektion hat oftmals starke Auswirkungen auf die Gesundheit der Betroffenen, stellt aber auch eine große wirtschaftliche Belastung für die betroffenen Länder dar.

Schistosomiasis, auch Bilharziose genannt, wurde erstmals 1851 in Kairo von dem deutschen Arzt und Naturwissenschaftler Theodor Bilharz beschrieben. Dieser fand den Saugwurm bei der Autopsie in den Darmvenen eines jungen verstorbenen Ägypters³. Neben dem Vorkommen in tropischen und subtropischen Gebieten kann inzwischen eine Ausbreitung der Schistosomiasis in gemäßigte Klimazonen beobachtet werden. So wurden auf der französischen Mittelmeerinsel Korsika Fälle von Schistosomiasis beschrieben⁴.

Die Erkrankung wird hauptsächlich durch drei humanpathogene Arten ausgelöst: *S. mansoni*, *S. japonicum* und *S. haematobium*⁵. Eine Infektion mit Schistosomiasis erfolgt bei Kontakt mit kontaminiertem Süßwasser. Dies wird verständlich, wenn man den Lebenszyklus des Parasiten betrachtet⁵ (s. 1.1.2.1). Die hepatische und intestinale Schistosomiasis im Rahmen einer Infektion mit *S. mansoni* bzw. *S. japonicum* führt vornehmlich zu gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhoe, Bauchschmerzen und gastrointestinalen Blutungen. Entzündliche Umbauprozesse in der Leber können die Entstehung einer Leberfibrose und einer portalen Hypertension verursachen⁶. Die urogenitale Schistosomiasis, ausgelöst durch *S. haematobium*, verursacht hingegen Umbauprozesse in der Harnblase und Symptome wie Hämaturie, Dysurie und kann im Verlauf eine Hydronephrose und Nierenversagen bedingen⁷. Eine weitere schwerwiegende Komplikation der Infektion mit *S. haematobium* stellt die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms dar^{8,9}. Auch für die anderen Schistosomenarten wird inzwischen eine Assoziation zur Karzinomentstehung diskutiert^{10,11}.

1.1 Schistosomiasis

1.1.1 Epidemiologie der Schistosomiasis

Nach Angaben der WHO wurden im Jahr 2019 schätzungsweise 236 Mio. Menschen prophylaktisch gegen die Schistosomen-Infektion behandelt². Schistosomiasis gehört zu den parasitären Erkrankungen mit der höchsten Prävalenz und konnte bisher in 78 Ländern nachgewiesen werden². Die Erkrankung tritt häufig in tropischen und

subtropischen Ländern auf und ist in Teilen Afrikas, Asiens, Südamerikas und auf den karibischen Inseln verbreitet¹. Dabei treten über 90% der Fälle in Subsahara-Afrika auf. Abhängig von den Umgebungsbedingungen, z.B. dem Hygienestandard und dem Vorhandensein von Gewässern, kann sich die Ausbreitung lokal sehr stark unterscheiden⁶.

Die häufigste Form der Erkrankung ist die chronische Schistosomiasis, was bedingt ist durch den wiederholten Kontakt mit infektiösen Zerkarien in Schistosomiasis-endemischen Regionen. In diesen Gegenden ist nahezu jeder Langzeitbewohner mindestens einmal im Leben mit Schistosomen infiziert worden⁵. Untersuchungen zeigten, dass in Schulen in diesen Gebieten 60-80% der Kinder und 20-40% der Erwachsenen aktiv infiziert sind. Meist findet schon im Alter von 2 Jahren eine Erstinfektion statt. Bis zum Alter von 8 - 15 Jahren steigt die Prävalenz und Intensität der Erkrankung weiter an und erreicht hier ihr Maximum. Im Erwachsenenalter sind Prävalenz und Intensität rückläufig¹². Allerdings gibt es auch in dieser Altersgruppe Bevölkerungsgruppen mit einer hohen Prävalenz. Ursächlich ist der häufige Kontakt mit infektiösem Wasser z.B. beim Baden, Waschen, Fischen sowie Autowaschen⁵.

1.1.2 Pathogenese der Schistosomiasis

1.1.2.1 Lebenszyklus der Schistosomen

Schistosomiasis wird durch Trematoden der Gattung *Schistosoma* verursacht¹³. Die verschiedenen Arten der Schistosomen unterliegen einem ähnlichen Lebenszyklus, welcher zunächst die Infektion eines Zwischenwirts und schlussendlich die Infektion eines Endwirts, z.B. des Menschen, umfasst¹³. In der Zwischenzeit durchlaufen die Trematoden verschiedene Larvenstadien (s. Abbildung 1)¹⁴. Zunächst werden die Eier des Parasiten vom Endwirt ausgeschieden. Dies erfolgt mit dem Stuhl (*S. mansoni* und *S. japonicum*) oder mit dem Urin (*S. haematobium*). Gelangen die Eier in Kontakt mit Wasser, schlüpfen die Miracidien, auch Wimpernlarven genannt¹³. Trifft ein Miracidium auf den Zwischenwirt, bei *S. mansoni* die Süßwasserschnecke *Biomphalaria*, infiziert es diesen¹⁴. Innerhalb der Schnecke entwickeln sich die Parasiten zum Stadium der Sporozyste und vermehren sich durch asexuelle Reproduktion, wodurch anschließend die Zerkarien ins Wasser abgegeben werden können¹⁴. Eine durch ein Miracidium infizierte Schnecke kann so täglich tausende Zerkarien ausscheiden⁵. Hat ein potenzieller Endwirt Kontakt zum infektiösen Wasser, können Zerkarien über die Penetration der Haut eindringen und ihn infizieren¹³. Im Endwirt gelangen die Zerkarien über das lymphatische und venöse System in den Blutkreislauf des Wirts und anschließend in die Lunge. Nach erneutem Eintritt in die Blutbahn erreichen die

Schistosomen den hepatoportalen Kreislauf, wo sie zum adulten Wurm heranreifen und die Paarung der weiblichen und männlichen Würmer stattfindet¹⁴. Dabei formt der männliche Wurm mit seinem Körper eine Falte, in welche er den weiblichen Wurm aufnehmen und dauerhaft umschließen kann. Im Anschluss an die Migration in die Mesenterialvenen (*S. mansoni*/ *S. japonicum*) bzw. die perivesikalen Venen (*S. haematobium*) beginnen die weiblichen Pärchen mit der Eiproduktion¹⁴.

Die Pärchen von *S. mansoni* befinden sich v.a. in den kleinen Mesenterialvenen des Kolons und Zäkums, wo sie sich über ihre Körperoberfläche von den Blutbestandteilen des Wirts ernähren^{15,16}. Jeder weibliche Wurm kann täglich rund 350 Eier ablegen¹⁷. Ein Teil der Eier passiert anschließend durch einen komplexen Prozess die Darmwand, gelangt so in das Darmlumen und wird vom Wirt ausgeschieden, was den Lebenszyklus des Parasiten komplettiert. Allerdings kann nicht jedes Ei die Darmwand erfolgreich passieren. Einige Eier werden im Darmgewebe eingeschlossen, was durch entzündliche granulomatöse Prozesse zu erheblichen Pathologien führen kann¹⁸. Diese polypösen und granulomatösen Veränderungen können Komplikationen wie gastrointestinale Blutungen verursachen¹⁵. Ein weiterer Teil der abgelegten Eier erreicht über den Blutkreislauf andere Organe, wie z.B. die Leber. Dort bleiben die Eier in den Sinusoiden stecken, was auch hier zu granulomatöser Entzündung und letzten Endes zur Leberfibrose führen kann¹⁵.

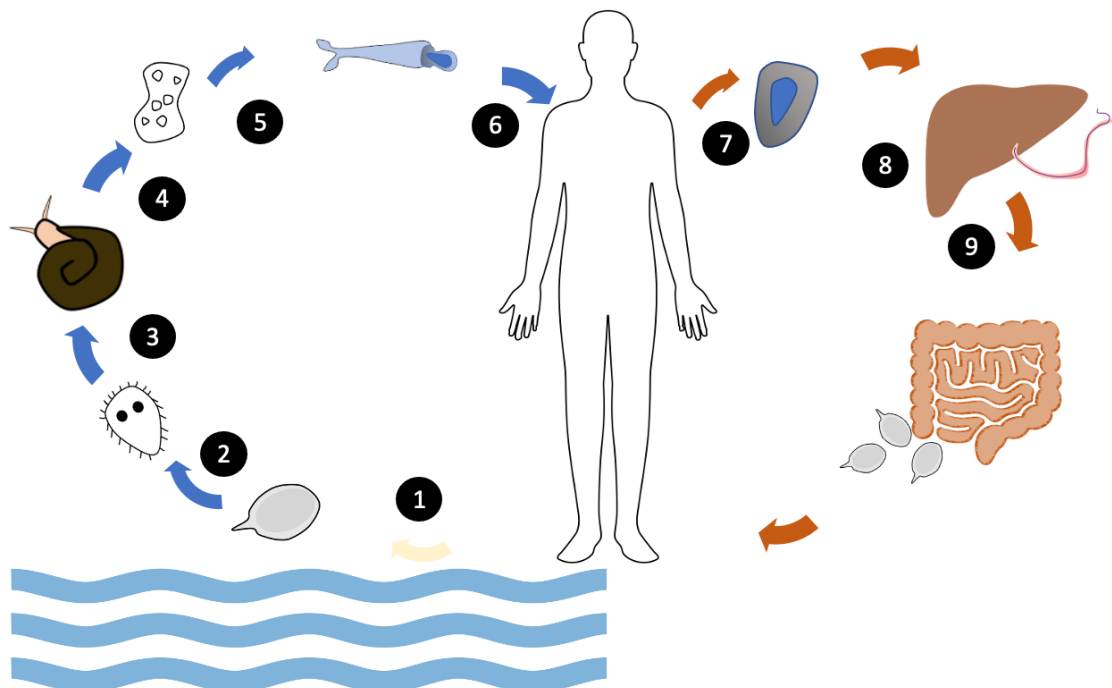


Abbildung 1: **Lebenszyklus der Schistosomen.** Die Eier werden durch den Endwirt über den Kot oder Urin ausgeschieden und gelangen ins Wasser (1). Anschließend

schlüpfen aus den Eiern die Miracidien (2). Diese dringen in die Schnecke, den Zwischenwirt, ein (3). Innerhalb der Schnecke entwickeln sich die Parasiten zu Sporozysten und vermehren sich durch asexuelle Reproduktion (4). Danach werden sie als Zerkarien ins Wasser abgegeben, wo sie bis zu 72 Stunden überleben können (5). Hat ein Endwirt Kontakt zum kontaminierten Wasser, können die Zerkarien durch Penetration der Haut in ihn eindringen und ihn infizieren (6). Dabei entwickeln sie sich zum Stadium der Schistosomula (7). Über den Blutkreislauf erreichen die Parasiten die Leber. Hier entwickeln sie sich zum adulten Wurm (8) und die Paarung der weiblichen und männlichen Würmer erfolgt. Anschließend kommt es zur Migration der Pärchenegel in die Venen des Darms, wo die Eiproduktion stattfindet (9). Modifiziert nach Doccheck: <https://www.doccheck.com/de/detail/photos/7790-bilharziose-kreislauf-schema>, aufgerufen am 01.02.2021.

1.1.2.2 Immunantwort bei Schistosomiasis

Die Immunantwort auf eine Infektion mit Schistosomen beginnt in den ersten 5 Wochen mit einer Typ-1-Immunreaktion, welche durch erhöhte Interleukin-12- und Interferon- γ -Spiegel gekennzeichnet ist¹⁹. Mit dem Beginn der Eiproduktion erfolgt der Wechsel zu einer Typ-2-Immunreaktion, die Interferon- γ -Produktion nimmt ab und die Induktion der CD4-positiven T-Zellen beginnt¹⁹. Nach ca. 3 Monaten und Übergang in eine chronische Infektion folgt der Status der Immunsuppressivität, welcher durch eine reduzierte Inflammation, z.B. eine geringere Granulombildung um die Parasiteneier, gekennzeichnet ist¹⁵. Die Ausbildung von Granulomen ist ein Hauptbestandteil der Immunantwort bei Schistosomiasis¹⁵. Der Aufbau des Granuloms ist dabei abhängig vom jeweiligen Organ, in welchem es sich befindet. Im Darm sind hauptsächlich T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, eosinophile Granulozyten und Fibroblasten, welche zur Faserbildung beitragen, an der Entstehung des Granuloms beteiligt²⁰. Durch die Entstehung von fibrotischen Läsionen kann dies zu verschiedenen Pathologien des Wirts führen. Allerdings bilden die Granulome ebenso einen Schutz des umliegenden Gewebes vor den Einwirkungen der Ei-Antigene und -toxine. So führt z.B. eine abgeschwächte Granulombildung bei Mäusen mit Mangel an CD4-T-Zellen zu einer erheblich gesteigerten Mortalität im Vergleich zu Mäusen mit einem intakten Immunsystem²¹. Nicht zuletzt übernehmen die Granulome auch eine Transportfunktion und sind wichtig für die Ausscheidung der Parasiteneier²¹. Dementsprechend sind z.B. Mäuse mit einem Mangel an T-Zellen nicht in der Lage, Eier mit der gleichen Rate wie vergleichbar infizierte, immunologisch intakte Mäuse der Kontrollgruppen auszuscheiden²².

1.1.2.3 Antigenausscheidung der Schistosomen-Eier

Die Parasiteneier sind lebende und metabolisch aktive Organismen mit einer starken Antigenwirkung¹⁵. Sie interagieren mit dem Wirt und seinem Immunsystem, sodass es zu einem erfolgreichen Transport durch die Darmwand und zur Ausscheidung der Eier kommen kann. Diese Interaktion kommt sowohl durch das Ei und seine Oberfläche als auch durch Ei-Sekrete zustande¹⁵. Die Antigensekretion beginnt einige Tage, nachdem die Eier vom weiblichen Wurm ausgeschieden wurden²³. Über die Zusammensetzung der Ei-Sekrete gibt es unterschiedliche Meinungen, wonach diese aus einer größeren Menge von insgesamt 188 Proteinen²⁴ oder aus wenigen Proteinen²³ zusammengesetzt sind.

SEA ist ein Extrakt aus *S. mansoni* Eiern. Es ist aus einer Vielzahl verschiedener Antigene zusammengesetzt. Hauptbestandteile von SEA sind die Ei-Antigene IPSE/alpha-1, omega-1 und kappa-5²⁵.

Die bisher am besten untersuchten Ei-Sekrete sind omega-1 und alpha-1, welches auch als IPSE oder SmCKBP bezeichnet wird. Beide wurden erstmals durch Dunne *et al.* 1981 beschrieben²¹.

Omega-1

Omega-1 (ω -1) ist ein monomeres Glykoprotein mit einer Größe von 31 kDa und spezifisch für *S. mansoni*²⁶. Mit der Eiproduktion beginnt während einer Infektion mit Schistosomen auch die Produktion von Interleukin-4 (IL-4) und die Entwicklung von Typ2-T-Helferzellen (TH2-Zellen). Dabei führt ω -1 über die Konditionierung von dendritischen Zellen zu einer Polarisation von TH2-Zellen^{26,27}. Über die Glykosylierung kann ω -1 an den Mannose-Rezeptor der dendritischen Zellen binden und anschließend durch Ribonuklease-Aktivität und Spaltung von rRNA und mRNA Einfluss auf die Proteinsynthese nehmen²⁸. Überdies zeigte sich, dass eine Anwendung von Antisera gegen ω -1 eine Hepatozytenschädigung bei *S. mansoni*-infizierten, immunsupprimierten Mäusen verhindert. Dies lässt auf eine hepatotoxische Wirkung von ω -1 schließen²⁹.

Alpha-1/ IPSE/ SmCKBP

Alpha-1 (α -1) besteht aus zwei Dimeren von 41 bzw. 36 kDa, die sich jeweils aus zwei Glykoprotein-Komponenten zusammensetzen²⁹.

Auch hier zeigte sich, dass das Ei-Antigen die Immunantwort des Wirts beeinflusst. Es stellte sich heraus, dass α -1 die Freisetzung von IL-4 aus basophilen Granulozyten induziert³⁰, weshalb es auch als IPSE (IL-4-inducing principle of *S. mansoni* eggs)

bezeichnet wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass α -1 zu einer Größenzunahme von Granulomen um die Parasiteneier in der Leber führt³¹.

Außerdem enthält das Protein eine Kernlokalisierungssequenz, welche es zur nukleären Translokation und zur DNA-Bindung innerhalb der Wirtszelle befähigt³².

Eine weitere Bezeichnung für das Ei-spezifische Protein ist SmCKBP (*S. mansoni* chemokine binding protein). Es konnte gezeigt werden, dass *S. mansoni*-Eier Antigene sezernieren, welche Chemokine, wie z.B. Interleukin-8 binden und damit eine antiinflammatorische Wirkung erzeugen können³³. Dadurch wird sowohl die Größe als auch die zelluläre Zusammensetzung des Granuloms beeinflusst³³. Am Beispiel von α -1 mit seinen unterschiedlichen biologischen Eigenschaften und Wirkungen, wie der Bindung von Chemokinen, der Vergrößerung von Granulomen oder der erhöhten Freisetzung von IL-4, lässt sich die komplexe Dynamik und Dualität der Funktionen von Ei-Antigenen erkennen¹⁵.

1.1.3 Klinik und Folgen der Schistosomiasis

1.1.3.1 Akute Schistosomiasis

Die ersten Zeichen einer Schistosomiasis können bereits beim Eindringen der Parasiten in die Haut sichtbar werden. Hier entwickelt sich häufig, insbesondere bei einer Primärinfektion von Touristen oder Migranten, ein juckender Ausschlag, welcher einige Tage bestehen bleiben kann³⁴. Die akute Schistosomiasis (Katayama-Fieber) ist eine systemische Überempfindlichkeitsreaktion auf den Parasiten und kann Wochen bis Monate nach der Primärinfektion auftreten³⁵. Die Krankheit beginnt plötzlich mit Fieber, Müdigkeit, Myalgie und unproduktivem Husten. Abdominale Symptome können sich später entwickeln, verursacht durch die Migration der Würmer in den Darm¹⁴. Bei den meisten Patienten kommt es nach 2-10 Wochen zu einer spontanen Heilung. Einige entwickeln jedoch eine anhaltende und schwerwiegendere Erkrankung mit Gewichtsverlust, Atemnot, Durchfall, diffusen Bauchschmerzen, Toxämie, Hepatosplenomegalie und Hautausschlag^{14,35}. Das durch *S. mansoni* und *S. haematobium* ausgelöste Katayama-Fieber tritt selten bei der chronisch exponierten Bevölkerung auf und betrifft meist Touristen. Im Gegensatz dazu löst *S. japonicum* auch bei Menschen, die in Endemiegebieten leben, diese Form der Erkrankung aus¹⁴.

1.1.3.2 Chronische Schistosomiasis

Während *S. haematobium* Auslöser der urogenitalen Schistosomiasis ist, führen *S. mansoni* und *S. japonicum* zu intestinaler und hepatischer Schistosomiasis¹.

Insbesondere bei der Bevölkerung der Endemiegebiete wird die Morbidität hauptsächlich durch die chronische Infektion und die im Gewebe abgelegten Eier ausgelöst⁶. Eingeschlossene Eier verursachen eine granulomatöse Immunreaktion, welche den Wirt einerseits schützen²¹, bei unkontrollierter Immunreaktion aber schwere Pathologien verursachen kann⁶.

Die chronische intestinale Form der Erkrankung äußert sich in einer Schistosomiasis-assoziierten Kolitis⁵. Die Würmer leben in den Mesenterialvenen und legen ihre Eier überwiegend im Bereich der Submukosa ab³⁶. Hier kommt es zu granulomatösen Entzündungsreaktionen und verschiedenen Veränderungen der Darmwand, wie fokale Schleimhauthyperplasie, Pseudopolypose und Polyposis³⁷. Klinisch äußert sich die Kolitis mit unspezifischen intermittierenden Bauchschmerzen, Durchfall und rektalen Blutungen⁵.

Die hepatische Schistosomiasis wird ebenfalls durch eine granulomatöse Entzündung um die Parasiteneier verursacht und kann zu periportal Fibrose sowie portaler Hypertension führen^{5,38}. Zu den klinischen Merkmalen gehören Beschwerden des Oberbauches mit tastbarer knotiger Hepatomegalie und Splenomegalie⁵. Als Komplikation der portalen Hypertension können Aszites und Ösophagusvarizen mit Blutungen auftreten³⁹. Die Zeit von der Primärinfektion bis zur fortgeschrittenen Fibrose beträgt meist 5 –15 Jahre, kann bei Kindern jedoch kürzer sein⁴⁰. Darüber hinaus verursachen alle Schistosomen-Arten als Folge von anhaltender Entzündung unspezifische, systemische Symptome wie Anämie, Unterernährung und bei Kindern eine Beeinträchtigung der körperlichen Entwicklung⁵.

1.1.4 Diagnostik der Schistosomiasis

Die Diagnose einer Schistosomiasis kann nach mikroskopischer Untersuchung von Stuhl oder Urin, serologischen Tests, PCR sowie Bildgebung gestellt werden^{1,5,6}. Den Goldstandard stellt die mikroskopische Untersuchung und Detektion von Parasiteneiern in Stuhl und Urin dar. Dabei macht die Menge der ausgeschiedenen Eier eine Einschätzung der Infektionsintensität, Infektiosität und des Morbiditätsrisikos möglich⁶. Zur Detektion einer akuten Infektion können z.B. serologische Testverfahren angewendet werden⁵. Um eine Manifestation von Organkomplikationen zu diagnostizieren, ist die Anwendung bildgebender Verfahren nötig. Hier kommen röntgenologische, sonographische und endoskopische Untersuchungen zum Einsatz⁶.

1.1.5 Behandlungsstrategien bei Schistosomiasis

Zur medikamentösen Behandlung der Schistosomiasis wird Praziquantel in einer Dosis von 40 mg/kg eingesetzt¹. Praziquantel kann bei allen Schistosomiasis-Spezies angewendet werden, hat allerdings die Einschränkung, dass es keine unreifen Würmer abtötet. Die Behandlung muss daher nach 2-4 Wochen wiederholt werden, um die Wirksamkeit zu erhöhen¹. Praziquantel tötet die Würmer innerhalb weniger Stunden ab⁴¹. Nebenwirkungen beschränken sich meist auf kurz anhaltende Übelkeit und Unwohlsein⁶. Schistosomiasis-assoziierte Organpathologien gehen nach Wochen bis Monaten meist deutlich zurück, fortgeschrittene Leberfibrosen können allerdings irreversibel sein⁶. Ein Impfstoff gegen Schistosomiasis ist bisher nicht verfügbar^{2,6}.

1.2 Übersicht Darm

1.2.1 Makroskopische Anatomie des Darms

Der Darm ist Teil des Verdauungsapparates beim Menschen und besteht aus kontinuierlich hintereinandergeschalteten röhrenförmigen Organen⁴². Er ist gegliedert in Dünndarm (Intestinum tenue) und Dickdarm (Intestinum crassum) und befindet sich im Bereich der Bauch- und Beckenhöhle⁴². Da in der vorliegenden Arbeit Analysen im Bereich des Kolons durchgeführt wurden, sollen die anatomischen Verhältnisse dieses Darmabschnitts nachfolgend erläutert werden. Das Kolon gliedert sich in einen aufsteigenden (Colon ascendens), quer verlaufenden (Colon transversum) und absteigenden (Colon descendens) Anteil sowie den Sigmadarm (Colon sigmoideum)⁴³. Die arterielle Blutversorgung des Darms erfolgt zum überwiegenden Teil durch Abgänge der Aorta abdominalis: den Truncus coeliacus, die A. mesenterica superior und die A. mesenterica inferior⁴². Die A. mesenterica superior versorgt die Anteile des Dickdarms bis zur linken Kolonflexur. Das Colon descendens und Colon sigmoideum erhalten Äste von der A. mesenterica inferior. Der venöse Abfluss des Darms erfolgt über in die Pfortader (V. portae) drainierende Venen⁴².

1.2.2 Histologie des Darms

Der histologische Aufbau der Darmwand ist in allen Abschnitten des Darms grundsätzlich ähnlich. Dennoch gibt es, besonders im Hinblick auf den Aufbau der Tunica mucosa, regionale Unterschiede⁴⁴. Die Gewebeschichten sind von innen nach außen folgendermaßen angeordnet: die Schleimhaut (Tunica mucosa) mit der Lamina epithelialis, der Lamina propria und der Lamina muscularis mucosae, die Tela submucosa, die Muskelschicht (Tunica muscularis) bestehend aus einer

Ringmuskelschicht (Stratum circulare) und Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale) und die Tunica adventitia⁴⁵.

Die in der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden Prozesse finden vor allem im Bereich der Tunica mucosa statt, sodass diese nachfolgend näher beschrieben werden soll.

Die äußerste Schicht der Tunica mucosa, die Lamina epithelialis, besteht in den meisten Darmanteilen aus einem einschichtigen Zylinderepithel, welches von einer Schleimschicht bedeckt ist⁴⁴. Diese Epithelzellschicht enthält im Bereich des Dickdarms zahlreiche Becherzellen. Diese produzieren Muzin (MUC2) für die Schleimschicht, welche das Epithel bedeckt und aus zwei Lagen zusammengesetzt ist. Die innere Schicht haftet fest auf dem Epithel und bildet ein dichtes Muzin-Netz mit antimikrobiellen Peptiden und IgA, das das Eindringen von Bakterien behindert. Die äußere Schicht wird durch ein lockereres Muzin-Netz gebildet und enthält symbiotisch mit dem Menschen lebende, sog. kommensale Bakterien⁴⁵. Die darunterliegende Lamina propria enthält Bindegewebe und retikuläre Fasern sowie freie Immunzellen. Außerdem verlaufen Gefäße und Nerven in dieser Schicht⁴⁴.

Die Lamina propria des Dickdarms besitzt neben zahlreichen Immunzellen auch einzelne Lymphfollikel und ist somit auch für die Immunabwehr im Bereich des Darms von Bedeutung⁴⁵. Die Lamina epithelialis und propria bilden gemeinsam Zotten (Villi intestinales) und Krypten (Cryptae intestinales) aus, welche je nach Abschnitt des Darms unterschiedlich ausgeprägt sind. Die Lamina muscularis mucosae besteht aus glatten Muskelzellen⁴⁴.

1.2.3 Funktion des Darms

Neben der Hauptfunktion, der Verdauung, übernimmt der Magen-Darm-Trakt wichtige Funktionen bei der Immunabwehr⁴⁶. Diese Funktionen kann man in zwei Gruppen einteilen: nicht immunologische und immunologische Mechanismen⁴⁶. Zur ersten Gruppe gehören die Epithelzellbarriere und der intestinale Schleimfilm, welche entlang des gesamten Magen-Darm-Trakts ein Eindringen von Erregern verhindern. Im Magen führt das saure Magensekret zum Abtöten von Keimen⁴⁶. Auch die im Dickdarm lebenden Bakterien (Mikrobiom) haben eine Schutzfunktion und wirken einer Ansiedlung fremder Erreger entgegen⁴⁷. Weiterhin ist die Bewegung des Darms wichtig für den Abtransport und die Ausscheidung von Keimen⁴⁶. Immunologische Mechanismen finden sich schon am Beginn des Magen-Darm-Trakts in der Mundhöhle. Die Mundspeicheldrüsen sezernieren Immunglobulin A (IgA) sowie Lysozym, ein Enzym, welches der Abwehr von Bakterien dient⁴⁶. Im Darm dient das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT von engl. gut associated lymphoid tissue) der

Immunabwehr⁴⁵. Das Epithel über diesen Lymphfollikeln enthält M-Zellen, welche Antigene durch die Epithelzellbarriere transportieren (Transzytose) und so an das Lymphgewebe weitergeben können⁴⁶. Weiterhin enthält die Lamina propria viele diffus verteilte freie Immunzellen wie Lymphozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen⁴⁵.

1.3 Kolorektales Karzinom

1.3.1 Epidemiologie

Im Jahr 2012 belief sich die Anzahl der weltweiten Neuerkrankungen am kolorektalen Karzinom (KRK) auf 1,4 Millionen, 693.900 KRK-assoziierte Todesfälle waren zu verzeichnen⁴⁸. Ein Großteil der Tumore (70-80%) entsteht sporadisch, 20-30% haben einen hereditären Ursprung, wie z.B. HNPCC (von engl. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, auch Lynch-Syndrom) oder FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis). Ein kleinerer Anteil (1-2%) der Tumore ist auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen zurückzuführen⁴⁹. Die Anzahl der Erkrankungen ist weltweit sehr unterschiedlich verteilt. Hohe Inzidenzwerte finden sich z.B. in Europa, Nordamerika und Japan. In Afrika, Lateinamerika und der Karibik ist die Inzidenz dagegen eher niedrig⁴⁸. In einigen Ländern mit vergleichsweise hohen Inzidenzwerten, z.B. den USA, sind jedoch zunehmend sinkende Fallzahlen zu erkennen. Dies kann auf ein vermehrtes Screening, die Entfernung von Präkanzerosen und eine Verminderung von Risikofaktoren (z.B. Rauchen) zurückgeführt werden^{48,50}.

1.3.2 Präkanzerosen des KRK

Zu den benignen epithelialen Tumoren des Darmtraktes zählen vornehmlich Läsionen mit polypenartiger Struktur, aber auch flache und sessile Läsionen⁵¹. Eine Einteilung erfolgt nach der WHO in leichtgradige intraepitheliale Neoplasien (LGIEN) und hochgradige intraepitheliale Neoplasien (HGIEN)⁵¹. Nach histologischer Wachstumsform wird das klassische Adenom von sogenannten serratierten Läsionen, zu denen der hyperplastische Polyp, das sessile serratierte Adenom und das traditionelle serratierte Adenom zählt, unterschieden⁵²(s. Tabelle 1). Kolorektale Adenome entstehen aus dem adenomatösen Subtyp sogenannter aberranter Kryptenfoci, veränderte Anteile der Darmschleimhaut mit erweiterten Krypten und verdicktem Epithel⁵³. Nach ihrem histologischen Wachstumsmuster können sie weiter eingeteilt werden^{54,55}. Zu den klassischen Formen gehören das tubuläre (>80% tubuläre Struktur), villöse (>80% villöse Struktur) und tubulovillöse (20-80% villöse Struktur) Adenom (s. Abbildung 2).

Dabei steigt mit zunehmend villöser Struktur das Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms⁵⁴.

Klassisches Adenom	Tubuläres Adenom
	Villöses Adenom
	Tubulovillöses Adenom
Serratierte Läsionen	Hyperplastischer Polyp
	Sessiles serratiertes Adenom
	Traditionelles serratiertes Adenom

Tabelle 1: **Einteilung benigner epithelialer Tumore.** Modifiziert nach: Sinn, P. (2014). Kolorektales Adenom. Universität Heidelberg. Online einsehbar über: https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/705/kolorektale-adenome, aufgerufen am 03.02.2021.

Adenome treten insbesondere mit zunehmendem Lebensalter häufig auf^{56,57}. In einer 1982 in Oslo durchgeführten Autopsie-Studie wurde das Vorkommen von Neoplasien in Kolon und Rektum untersucht. Adenome waren bei 34% der Männer und 32% der Frauen vorhanden. Dabei war eine ansteigende Prävalenz mit dem Lebensalter zu beobachten⁵⁶. Im Jahresbericht 2018 zur Früherkennungskoloskopie des Zentralinstituts für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland wurden die Untersuchungsdaten von 445.061 Teilnehmern ausgewertet. Bei 40,7% aller untersuchten Patienten ergab sich dabei ein histologischer Befund. Die Diagnose tubuläres Adenom wurde in 58,5% der Fälle, tubulovillöses Adenom in 7,9% und villöses Adenom in 0,5% der Fälle gestellt⁵⁷.

Von den klassischen Adenomen unterscheidet man die serratierten Läsionen. Das sessil serratierte Adenom zeichnet sich makroskopisch häufig durch eine flach-erhabene Struktur aus und ist oft im rechtsseitigen Kolon zu finden^{54,58}. Traditionell serratierte Adenome haben oft eine polypoide Struktur und befinden sich meist im linksseitigen Kolon und im Rektum⁵⁹. Hyperplastische Polypen stellen die häufigsten kolorektalen Polypen dar und haben in der Regel einen Durchmesser von < 5mm^{54,60}.

Durch molekulare Veränderungen können sich primär gutartige Tumore zu Karzinomen entwickeln. Benigne epitheliale Tumore wie kolorektale Adenome sind Vorläuferläsion des KRK und stellen somit Präkanzerosen dar⁵¹.

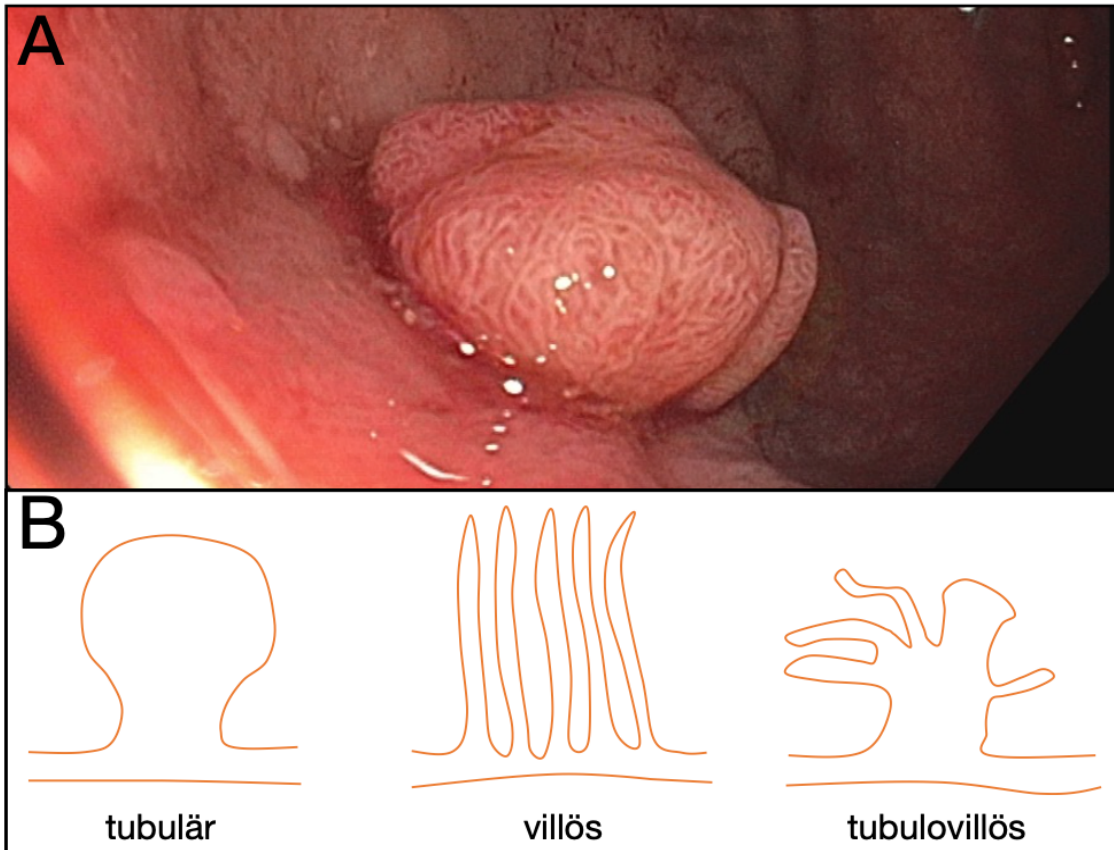


Abbildung 2: **Schematische Darstellung klassischer Adenotypen mit ausgewähltem Beispiel:** Schematische Darstellung der klassischen Adenotypen: tubuläres, villöses und tubulovillöses Adenom. Endoskopische Aufnahme eines tubulovillösen Adenoms im Bereich des Kolons (A). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Jörg Halwe aus der Klinik für Gastroenterologie des Klinikums Helse Fonna in Leirvik, Stord, Norwegen. Modifiziert nach: Messmann *et al.* 2004 (B).

Das Konzept der sporadischen Karzinogenese wurde 1990 durch Fearon und Vogelstein beschrieben und als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ bezeichnet. Über diesen Weg entstehen ca. 60% der sporadischen Karzinome^{51,61}. Tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome sind hierbei Vorläuferläsionen. Neben diesem klassischen Karzinogeneseweg können Tumore durch den serratierten Karzinogeneseweg aus sessilen serratierten Adenomen und den alternativen Karzinogeneseweg aus traditionell serratierten und villösen Adenomen entstehen⁵¹. Hyperplastische Polypen sind sowohl für den serratierten Karzinogeneseweg als auch für den alternativen Karzinogeneseweg als Vorläuferläsion bekannt und gelten insbesondere bei einem Durchmesser von >1 cm als Vorstufen^{51,54}. Es wird angenommen, dass etwa 10-20% der sporadischen KRK über den serratierten oder alternativen Karzinogeneseweg entstehen⁴⁹.

1.3.3 Molekulare Mechanismen der Karzinomentstehung

Für die Entstehung des KRK konnten drei verschiedene Karzinogenesewege als molukulare Mechanismen identifiziert werden: Chromosomeninstabilität, Mikrosatelliteninstabilität und der CpG-Insel-Methylierungstyp⁶².

Chromosomeninstabilität betrifft ca. 85% der sporadischen KRK und ist gekennzeichnet durch Veränderungen der Anzahl und der Struktur von Chromosomen, so z.B. der Verlust von 17p und 18q⁶². So kommt es zu Mutationen oder Allelverlust in verschiedenen Tumorsuppressorgenen und Onkogenen wie APC, p53, KRAS und BRAF^{62,63}. Nach dem von Fearon und Vogelstein beschriebenen Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz steht dabei die Mutation des APC-Gens an erster Stelle, gefolgt von weiteren Mutationen, häufig dem KRAS-Gen und schließlich der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 (s. Abbildung 3)⁶⁴. Das APC-Protein spielt dabei eine wichtige Rolle, was auf seiner Beteiligung an zentralen Regulationsvorgängen, wie Proliferation und Differenzierung, Zellzykluskontrolle und Apoptose, beruht⁵¹. Weiterhin trägt APC zur korrekten Ausbildung des Spindelapparats bei und hat somit große Bedeutung bei der Gewährleistung der chromosomalen Stabilität während der Mitose.^{51,65}

Die am häufigsten involvierten Signalwege sind der Wnt- und MAPK (engl. mitogen-activating protein kinase) -Signalweg. Der Wnt-Signalweg ist bei 93% aller KRK betroffen⁶⁶. APC ist ein wichtiger negativer Regulator dieses Signalwegs und am Abbau des Effektorproteins β -Catenin beteiligt. Ein Defekt des APC-Proteins führt zur Akkumulation von β -Catenin in der Zelle und folglich zu dysregulierten Proliferations- und Differenzierungsvorgängen⁴⁹. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs erfolgt durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Bei einer Mutation der beteiligten Signalmoleküle, z.B. RAS oder RAF, kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung und zur unkontrollierten Proliferation der Zelle⁶². Mikrosatelliteninstabilität ist gekennzeichnet durch Längenveränderungen in kurzen, repetitiven DNA-Sequenzen, den Mikrosatelliten. Diese entstehen durch Defekte im DNA-Mismatch-Repair-System, einem DNA-Reparatursystem⁶⁷.

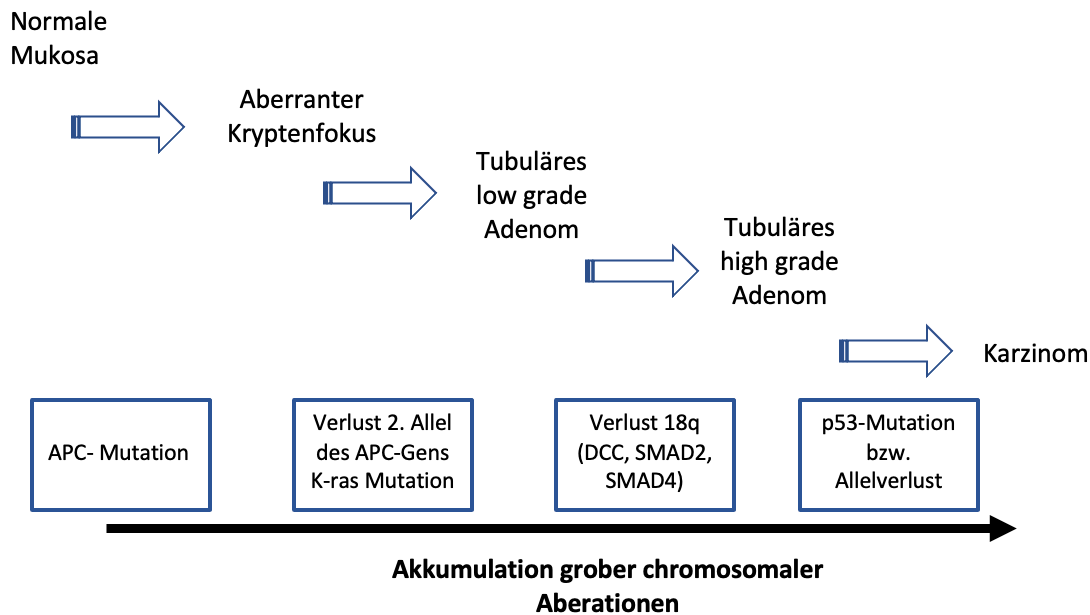


Abbildung 3: **Adenom-Karzinom-Sequenz mit den zugrundeliegenden molekularen Alterationen nach Fearon & Vogelstein.** Modifiziert nach: Baretton & Aust 2013.

Mutationen in den Mismatch-Repair-Genen z.B. MLH1, MSH2, MSH6 oder PMS2, können diese Defekte verursachen⁶⁸.

Eine weitere Ursache der Mikrosatelliteninstabilität ist die epigenetische Inaktivierung von MLH1 durch Hypermethylierung von CpG-Inseln⁶⁸. Störungen im Mismatch-Repair-System können wie bei HNPCC erblich sein, treten aber auch bei 15% der sporadischen KRK auf⁶⁸.

Der CpG-Insel-Methylierungstyp ist durch die Hypermethylierung zahlreicher Promotor-CpG-Inseln und der daraus resultierenden Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gekennzeichnet⁶⁹. Etwa bei 17% der sporadischen KRK kann der CpG-Insel-Methylierungstyp gefunden werden. Hierbei betrifft die Hypermethylierung häufig MLH1 und stellt so eine Überlappung mit dem Weg der Mikrosatelliteninstabilität dar⁶². Der CpG-Insel-Methylierungstyp ist stark mit dem serratierten Karzinogeneseweg assoziiert. Entsprechende Tumore bilden sich häufig proximal im Kolon, im höheren Lebensalter und oft beim weiblichen Geschlecht⁷⁰.

Sonderformen der Karzinomentstehung stellen der serratierte und der alternative Karzinogeneseweg dar. Besonders häufig finden sich in diesen Tumoren KRAS- und BRAF- Mutationen, welche in einer Überaktivierung des MAPK-Signalwegs münden⁴⁹. Typisch für sessile serratierte Adenome sind BRAF-Mutationen (ca. 80%) und der CpG-

Insel-Methylierungstyp mit Mikrosatelliteninstabilität. Traditionell serratierte Adenome weisen häufig KRAS-Mutationen (ca. 80%) und etwas seltener BRAF-Mutationen (ca. 20-30%) auf⁴⁹.

1.4 Infektiöse Erkrankungen und Neoplasie

1.4.1 Allgemeine Mechanismen

Zu den sechs häufigsten Todesursachen durch Krebserkrankungen gehören Lungen-, Leber-, Magen-, Darm-, Brust- und Speiseröhrenkrebs. Davon sind vier (Leber-, Magen-, Kolorektal- und Speiseröhrenkrebs) häufig mit Infektionskrankheiten assoziiert¹⁰. Nach einer Studie von de Martel *et al.* wurden im Jahr 2018 weltweit 13% aller Krebsfälle durch Infektionserkrankungen ausgelöst, davon 0,43% durch Helmintheninfektionen. Besonders häufig sind infektionsbedingte Krebserkrankungen in Ostasien und Afrika südlich der Sahara, was auf die höhere Prävalenz der wichtigsten onkogenen Infektionen in diesen Gebieten zurückzuführen ist⁹.

Durch die IARC wurden Infektionskrankheiten in verschiedene Gruppen eingeteilt, um sie nach ihrem karzinogenen Risiko zu beurteilen. Zur Gruppe 1 (hohe Evidenz für karzinogene Wirkung) gehören z.B. *Helicobacter pylori*, Hepatitis-B-Virus (HBV), aber auch Trematodeninfektionen wie *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* und *Schistosoma haematobium*⁸. Die Leberegel *Clonorchis sinensis* und *Opisthorchis viverrini* erhöhen das Risiko für das Auftreten eines Cholangiokarzinoms, eine Infektion mit *S. haematobium* ist hingegen mit der Entstehung von Blasenkrebs assoziiert⁸. Epidemiologische Studien aus Sambia zeigten, dass 65% der an Blasenkrebs Erkrankten gleichzeitig eine urogenitale Schistosomiasis aufwiesen⁷¹. Weltweit konnten im Jahr 2018 ca. 1,1% der Fälle von Blasenkrebs auf eine Infektion mit *S. haematobium* zurückgeführt werden⁹. Bei der Krebsentstehung im Zusammenhang mit *S. haematobium* spielen die chronischen Entzündungsprozesse, Epithelschäden und oxidativer Stress eine zentrale Rolle. Diese können zu Veränderungen bei der Regulation von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen führen, die die Kontrolle der Zellproliferation beeinträchtigen¹⁰. Mit der Entstehung von Blasenkrebs bei *S. haematobium* wurden Mutationen im HRAS-⁷², KRAS-⁷³ Gen und eine veränderte Expression von Bcl-2 und p53⁷⁴ in Verbindung gebracht.

S. japonicum wurde von der IARC in die Gruppe 2B (möglicherweise karzinogene Wirkung) eingeteilt¹⁰. So zeigten z.B. epidemiologische Studien in China eine starke Korrelation zwischen der Prävalenz von *S. japonicum* und der Inzidenz und Mortalität vom kolorektalen Karzinom⁷⁵.

1.4.2 *S. mansoni*-assoziierte Kolitis und Karzinogenese

Das gemeinsame Auftreten von *S. mansoni*-Infektionen und Krebserkrankungen wie dem KRK^{76,77}, Prostatakarzinom⁷⁸, Hepatozellulären Karzinom (HCC)⁷⁹ und Blasenkrebs⁸⁰ wird in verschiedenen Fallberichten und klinischen Studien beschrieben. Herman et al. berichtete in einer Fallstudie über einen Patienten, welcher aufgrund eines Ileus im Bereich des Kolons im Kilimanjaro Christian Medical Center Northern Zone Tanzania behandelt wurde. In der Laparotomie fand sich eine Läsion im Bereich des Sigmoids, welche sich in histologischen Untersuchungen als Adenokarzinom herausstellte, aber gleichzeitig auch Parasiteneier von *S. mansoni* enthielt⁷⁷.

Eine klinische Studie von Madbouly *et al.* untersuchte an Darmkrebs erkrankte ägyptische Patienten mit und ohne *S. mansoni* assoziierter Kolitis. Es zeigte sich, dass die Gruppe der Patienten mit Schistosomiasis gehäuft jüngere Patienten enthielt und häufiger von muzinösen und multizentrischen Tumoren sowie höheren Tumorstadien betroffen war. Darin sahen die Autoren einen Hinweis dafür, dass eine gleichzeitige Infektion einen Einfluss auf die Prognose bei KRK hat⁸¹. In einem Fallbericht von Almeida *et al.* spiegelten sich die Ergebnisse der Studie von Madbouly *et al.* wider. Hier wurde über zwei brasilianische Patienten berichtet, welche neben der Diagnose KRK eine Schistosomen-Infektion aufwiesen. Beobachtet werden konnte sowohl ein junges Erkrankungsalter der Patienten (45 und 47 Jahre), als auch ein muzinöser Tumor bei der histologischen Untersuchung⁸².

Auch das Auftreten von HCC bei *S. mansoni*-Infektion wurde in klinischen Studien untersucht. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Shousha *et al.* untersuchte Patienten mit Leberzirrhose bzw. HCC mit und ohne *S. mansoni*-Infektion in der Vorgeschichte. Die Gruppen wurden unter anderem hinsichtlich der Häufigkeit eines HCC, der Tumorcharakteristik, dem Outcome bei HCC-Therapie und dem Outcome einer antiviralen Therapie bei Virushepatitis verglichen. Der Gruppenvergleich zeigte einen höheren Anteil von HCC in der Gruppe der Patienten mit bekannter *S. mansoni*-Infektion. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Gruppe mit zusätzlicher *S. mansoni*-Infektion ein schlechteres Ansprechen auf die HCC-Therapie sowie auf die antivirale Therapie bei HCV hatte. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Infektion mit *S. mansoni* das Risiko der Entwicklung eines HCC erhöht und überdies das Outcome der Patienten verschlechtert⁸³.

Bisher liegen nur wenige epidemiologische Studien zum Auftreten vom KRK bei Infektion mit *S. mansoni* vor und die Ergebnisse sind nicht eindeutig. Eine epidemiologische Studie zur Untersuchung vom gemeinsamen Auftreten von Darmkrebs und *S. mansoni*-Infektion auf Bevölkerungsebene steht weiterhin aus⁷⁶. Parkin *et al.* sprach sich gegen

einen Zusammenhang aus und begründete dies damit, dass das KRK auf dem afrikanischen Kontinent einheitlich häufig auftritt, die geografische Verteilung von *S. mansoni* aber sehr unterschiedlich ist⁸⁴.

Zu einem anderen Ergebnis kam eine Studie, welche in Uganda und Simbabwe durchgeführt wurde. Es wurden Patienten ohne und mit infektiösen Darmerkrankungen, insbesondere Amöben- und Schistosomen-Infektionen, untersucht und miteinander verglichen. Dabei wurde auch das Vorkommen von KRK ermittelt. Es zeigte sich, dass ausschließlich Patienten mit einer chronischen infektiösen Darmerkrankung eine solche Krebserkrankung aufwiesen. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass eine Assoziation zwischen chronischer Darminfektion und der Entwicklung von Darmkrebs besteht⁸⁵.

Es gibt verschiedene Ansatzpunkte, über welche Mechanismen die Infektion mit *S. mansoni* karzinogen wirkt. Eine Vermutung ist, dass die chronische Inflammation zu Mutationen in Onkogenen führt und über die Aktivierung von verschiedenen Signalwegen zur Karzinomentstehung beiträgt, ähnlich wie es auch bei der Karzinogenese bei *S. haematobium* der Fall ist¹⁰. Ursachen könnten die vom Parasiten ausgehenden Produkte und Metaboliten sein, welche in die Umgebung sekretiert werden und verschiedene Stoffwechselprozesse, wie oxidativen Stress induzieren. Dieser könnte zu DNA-Schäden in Epithelzellen führen¹⁰. Weiterhin führen die physische Schädigung des Wirtsgewebes während der Entwicklung des Parasiten sowie die Aktivierung von Wundheilungsprozessen zu erhöhter Zellproliferation und -transformation, welche auch mit DNA-Schädigung verbunden sein können⁸⁶.

Die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wurde in verschiedenen Studien untersucht⁸⁷⁻⁸⁹. Roderfeld *et al.* konnte zeigen, dass sekretierte Ei-Antigene zu einer permanenten Aktivierung der HCC-assoziierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT3 in Leberzellen von infizierten Hamstern und in humanen Leberzellen führen⁸⁸. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die beschleunigte Entwicklung von HCC bei Patienten mit Hepatitis B und/ oder Hepatitis C sowie *S. mansoni* Konfektion dar^{88,90}.

Eine andere Studie untersuchte die Expression von p53, Bcl-2 und c-Myc sowie die Apoptoseaktivität in Kolonkarzinomgewebe von Patienten mit und ohne entsprechende Infektion. Sie konnten im Tumorgewebe der infizierten Probanden eine geringere Apoptoseaktivität und Überexpression von Bcl-2, welches ein Inhibitor der Apoptose darstellt, zeigen⁸⁹. Im o. g. Fallbericht von Almeida *et al.* wiesen die untersuchten Patienten mit Schistosomen-Infektion bei KRK RAS-Mutationen sowie Mikrosatelliteninstabilität mit Mutation des MLH1- und PMS2-Gens auf. Die Autoren diskutierten dabei ein zufälliges Auftreten bzw. einen Zusammenhang dieser Mutationen mit der Schistosomen-Infektion⁸². In einer im Jahr 2019 von Nacif-Pimenta *et al.*

veröffentlichten Studie wurden in vitro Untersuchungen zur regulatorischen Wirkung von *S. mansoni*- und *S. haematobium*-Eiern auf Epithelzelllinien in Harn- und Gallenwegen durchgeführt. In den mit *S. mansoni*-Eiern stimulierten Zellen zeigte sich bei der Genexpressionsanalyse eine Hochregulation der Protoonkogene c-Myc und c-Jun, NF- κ B1, Scr, Bcl-2 sowie TNF und RUNX1. Weiterhin wurde sowohl bei der Stimulation mit *S. mansoni* als auch mit *S. haematobium*-Eiern eine Unterregulierung von mit p53 assoziierten Signalwegen beobachtet⁸⁷.

1.5 AP-1-Transkriptionsfaktor c-Jun

Das Aktivator-Protein 1 (AP-1) ist ein Transkriptionsfaktor (TF), der an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist⁹¹. AP-1 ist ein dimerer Proteinkomplex, welcher sich aus Mitgliedern der Jun- (z.B. c-Jun und Jun-B), Fos- (z.B. c-Fos, Fos-B), ATF- und MAF-Proteinfamilie zusammensetzt. All diese Proteine verfügen über sogenannte bZIP-Domänen (Basic Leucine Zipper Domain), bestehend aus einer DNA-Bindungsstelle und einer Leucin-Zipper-Domäne⁹². Diese dienen einerseits der Dimerisierung und andererseits durch Erkennung verschiedener DNA-Response-Elemente (RE) der DNA-Bindung. Jun-Proteine bilden sowohl Hetero- als auch Homodimere, wohingegen z.B. Fos-Proteine ausschließlich Heterodimere bilden⁹². Der AP-1-Komplex kann folglich durch viele verschiedene Dimerkombinationen geformt werden. Diese bestimmen die Gene, die durch den Transkriptionsfaktor reguliert werden und somit die Wirkung auf zelluläre Prozesse⁹³. Die unterschiedlichen Dimere erkennen verschiedene RE, wie z.B. das TPA-Response-Element (TRE) mit der Konsensussequenz 5'-TGA(G/C)TCA-3'⁹¹. Das TRE wird z.B. durch Mitglieder der Jun- und Fos-Familie erkannt und ermöglicht so die Aktivierung von Zielgenen. Ein weiteres RE stellt das cAMP-Response-Element (CRE) mit der Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3' dar, welches durch Mitglieder der ATF- Familie erkannt wird⁹¹.

c-Jun und die Mitglieder der Fos-Familie beeinflussen die Zellproliferation positiv, wohingegen Jun-B einen hemmenden Einfluss auf diese hat⁹¹. c-Jun reguliert die Zellzyklus-Progression dabei sowohl durch die Inhibierung des Tumorsuppressors p53, als auch durch die Stimulierung von Cyclin D1 und beschleunigt dadurch die Überleitung der G1- in die S-Phase des Zellzyklus⁹⁴.

Die Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktor-Familie unterliegen einer Transkriptions-, Translations- und Posttranslationsregulation, die ihre Aktivität beeinflussen⁹⁵. Der Transkriptionsfaktor c-Jun wird durch verschiedene Mechanismen aktiviert, darunter Wachstumsfaktoren, Onkogene und Zytokine⁹⁵(s. Abbildung 4). Diese Stimuli aktivieren MAP-Kinase-Wege (engl. Mitogen-activated protein), welche zur Gruppe der

Serin/Threonin-Proteinkinasen gehören und die AP-1-Aktivität durch Phosphorylierung steigern⁹². Zu diesen MAP-Kinasen zählt auch ERK (engl. extracellular-signal-regulated kinase), welches durch verschiedene extrazelluläre Signale, z.B. Wachstumsfaktoren über den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg aktiviert wird^{92,96}. Ein weiterer Mechanismus der c-Jun-Aktivierung ist JNK (c-Jun-N-terminale Kinase)⁹². JNK zählt ebenfalls zur Familie der MAP-Kinasen und wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Dazu gehören extrazelluläre Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone, aber auch intrazelluläre Stimuli wie oxidativer Stress und DNA-Schäden⁹⁷. Diese führen über die Induktion des MAP-Kinase-Signalwegs zur Aktivierung von MKK (MAP-Kinase-Kinase) 4/7, welche wiederum JNK aktivieren. Dieses transloziert anschließend in den Zellkern, wo es durch Phosphorylierung c-Jun aktiviert⁹⁸.

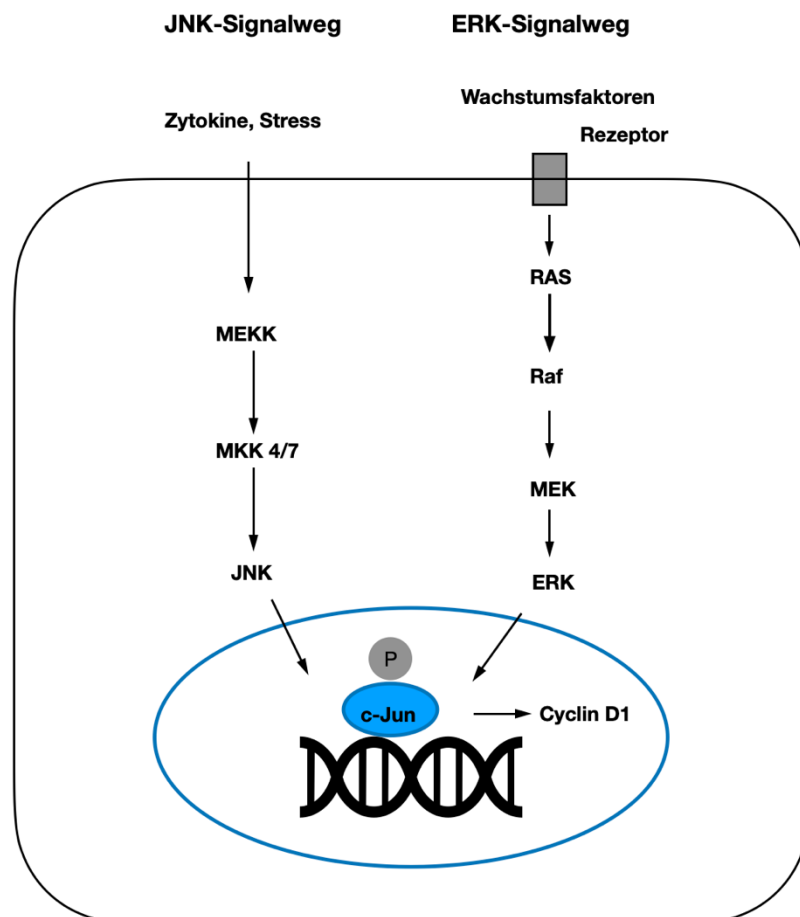


Abbildung 4: **Regulatorische Mechanismen von AP-1/ c-Jun über den JNK- und ERK-Signalweg.** Die JNK- und ERK-Signalwege können auf verschiedenen Wegen aktiviert werden, darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Hormone. Die spezifische Kinase MKK4/7 phosphoryliert und aktiviert JNK, welches seinerseits die Transkription von c-Jun durch Phosphorylierung an den Serinresten

63/73 aktiviert. Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren an den Rezeptor aktiviert. ERK aktiviert anschließend verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Jun. Der Übergang des ERK- Signalweges zu JNK wird durch die von c-Jun vermittelte Induktion der RACK-1 Transkription, welche zusammen mit der aktiven Proteinkinase C und MKK4/7 die JNK-Aktivierung erhöht, geschaffen. Modifiziert nach: Kappelmann *et al.* 2014.

Die Mitglieder der AP-1-Familie sind an einer Reihe mitogener Signalwege beteiligt und spielen daher auch bei der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle⁹¹. c-Jun beeinflusst über die Hemmung der p53/p21- und p38-MAPK-Aktivität regenerative Prozesse in der Leber⁹⁹. Bei der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms nimmt c-Jun über die antagonistische Wirkung zu p53 und die Verringerung der Apoptose Einfluss auf die Tumorgenese⁹³. In einer weiteren in vivo Studie konnte gezeigt werden, dass c-Jun durch Unterdrückung der c-Fos-vermittelten Apoptose das Überleben von Tumorzellen in der Leber beeinflusst¹⁰⁰.

Auch bei der Entstehung des malignen Melanoms ist das Protoonkogen c-Jun beteiligt¹⁰¹. Das Ösophagusadenokarzinom wurde ebenfalls mit einer Überexpression von c-Jun in Verbindung gebracht. So konnte in einer Studie eine höhere Expression des Transkriptionsfaktors in Ösophagusadenokarzinom-Proben als im gesunden Ösophagusgewebe gefunden werden¹⁰². Für das kolorektale Karzinom konnte in mehreren Studien eine Überexpression von Mitgliedern der Jun-Familie gezeigt werden. Wang *et al.* konnte neben c-Jun auch eine signifikant erhöhte Expression von Jun-B in humanen Kolonkarzinomen erkennen^{103,104}.

1.6 Cyclin D1

Cycline sind eine Gruppe von Proteinen, welche gemeinsam mit CDKs (engl. cyclin-dependent kinases) die Phasenübergänge des Zellzyklus steuern. Durch Komplexbildung sind sie in der Lage, CDKs zu aktivieren¹⁰⁵. Zu den CDK-Cyclin-Komplexen gehören drei Interphasen-CDKs (CDK 2/4/6) und ein Mitose-CDK (CDK1) sowie zehn verschiedene Cycline, welche sich in 4 Klassen (Cyclin A, B, D, E) einteilen lassen¹⁰⁵.

Cycline werden zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus synthetisiert und degradiert, sodass sich ihre Konzentration im Verlauf ändert und abhängig davon die Aktivierung der CDKs reguliert wird¹⁰⁶.

Der Zellzyklus beschreibt die Phase zwischen den Teilungen (Mitosen) einer Zelle. Er ist in vier aufeinanderfolgende Phasen eingeteilt: die G1-, S-, G2-, welche gemeinsam die Interphase bilden und die M-Phase¹⁰⁷. In der G1-Phase befindet sich die Zelle im Wachstum und Proteine sowie RNA für die bevorstehende Teilung werden synthetisiert. In der S-Phase kommt es zur DNA-Replikation. Die G2-Phase dient der Vorbereitung auf die Zellteilung und der Sicherstellung einer korrekten DNA-Replikation¹⁰⁶. Schließlich folgt die M-Phase mit der Mitose. Viele Zellen gehen anschließend in einen Ruhezustand über, welcher als G0-Phase bezeichnet wird¹⁰⁶. Durch bestimmte Faktoren können sie wieder in die G1-Phase übergehen¹⁰⁸ (s. Abbildung 5).

Das Voranschreiten des Zellzyklus wird durch Kontrollpunkte überwacht, wobei mögliche Defekte während der DNA-Synthese und Chromosomensegregation erkannt werden sollen. Bei Fehlern kommt es durch Regulation der CDKs zum Zellzyklusarrest¹⁰⁹. Defekte können so repariert und die Übertragung an die Tochterzelle verhindert werden. Ist keine Reparatur möglich, können die Zellen in die Ruhephase (Seneszenz) oder Apoptose übergehen¹⁰⁵.

Cyclin D1 spielt eine Schlüsselrolle in der G1-Phase. Es bildet den Cyclin D1/CDK4/6-Komplex, welcher den Cyclin E/CDK 2-Komplex aktiviert und so das Retinoblastom-Protein (pRB) inaktiviert¹¹⁰. pRB fungiert als Gatekeeper der G1-Phase, seine Inaktivierung führt zum Übergang in die S-Phase¹¹¹. Darüber hinaus verfügt Cyclin D1 über CDK-unabhängige Funktionen, welche für Zellwachstum und -differenzierung von Bedeutung sind¹¹⁰. Cyclin D1 ist mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und -coregulatoren assoziiert und bindet an verschiedene nukleäre Rezeptoren, z.B. Androgenrezeptoren¹¹².

Der Cyclin D1-Spiegel wird auf verschiedenen Wegen moduliert. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Hormone, aber auch die Aktivierung durch onkogene Signalwege, wie dem Ras-, Wnt- und NF- κ B-Signalweg^{110,113}. Die Expression, Aktivierung, der Abbau und die Lokalisation von Cyclin D1 ist in gesunden Zellen streng kontrolliert¹⁰⁶. Überexpression, Akkumulation oder Fehllokalisierung können die Entstehung von Tumoren begünstigen¹¹⁴. Tumorzellen mit hohen Cyclin D1-Spiegeln zeigen eine unkontrollierte Proliferation als Reaktion auf eine Funktionsstörung des Zellzyklus am Restriktionspunkt in der G1-Phase¹¹³. Zusätzlich zu dieser Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus reguliert Cyclin D1 auch eine Reihe von Schlüsselprozessen der Krebsentstehung wie die DNA-Schadensantwort, DNA-Replikation und -stabilität, Seneszenz und Zellmigration¹¹³. Cyclin D1 spielt eine entscheidende Rolle bei einer Reihe von Krebsarten wie dem Mamma-Karzinom, Kolon-Karzinom, Melanom und Prostatakarzinom¹¹⁰.

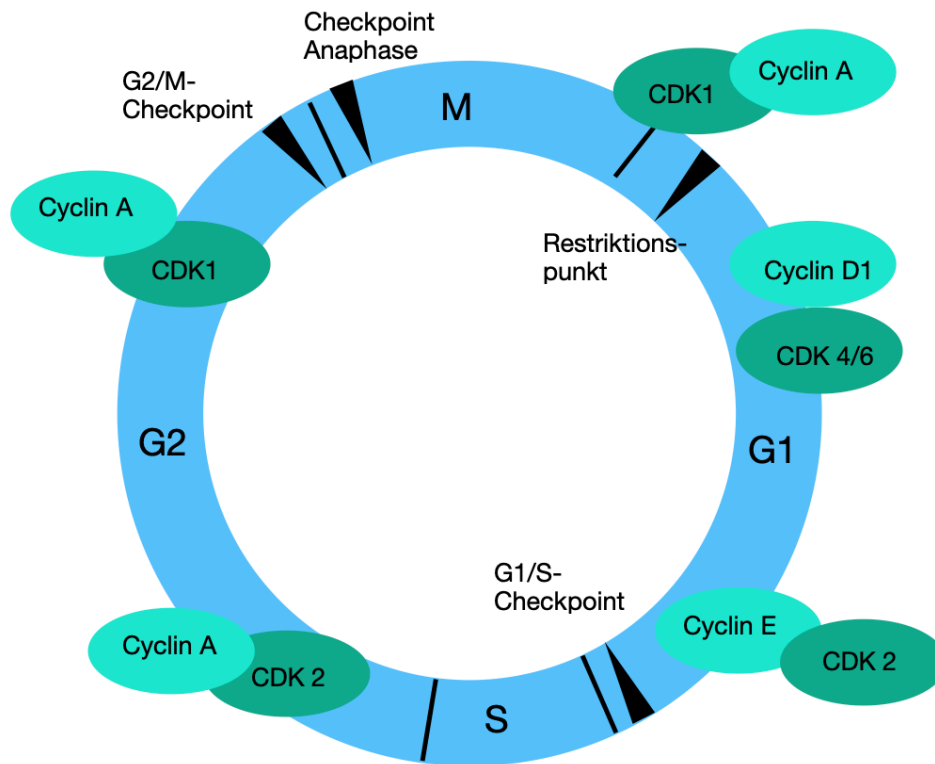


Abbildung 5: **Schematische Darstellung des Zellzyklus.** Nach mitogenen Signalen verlässt die Zelle die Ruhephase und tritt nach dem Restriktionspunkt (R) irreversibel in die G1-Phase ein. Die aufeinanderfolgenden G1-, S-, G2- und M-Phasen werden durch Cycline und ihre verwandten CDKs gesteuert. Modifiziert nach: Tchakarska *et al.* 2019.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Elke Roeb konnte zeigen, dass es bei einer Infektion mit *S. mansoni* zu einer Aktivierung hepatozellulärer Karzinogenese-assoziiierter Transkriptionsfaktoren, c- Jun und STAT3, kommt. Diese Aktivierung zeigte sich im Hamstermodell vornehmlich in der Umgebung der Eier des Parasiten. In Zellkulturversuchen stellte sich heraus, dass die Stimulation von humanen Leberzellen mit löslichen Ei-Antigenen von *S. mansoni* (soluble egg antigens, SEA) gleichwohl zur Aktivierung dieser Signalwege führt. Hieraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung dieser Signalwege durch sezernierte Antigene der Eier des Parasiten ausgelöst wird. Diese Befunde stellen eine mögliche Erklärung für die Entwicklung von HCC bei Patienten mit *S. mansoni* dar⁸⁸. Die Infektion mit *S. mansoni* führt neben Veränderungen im Lebergewebe auch im Bereich des Kolons zu erheblichen Pathologien. Die in der Einleitung genannten Fallberichte⁷⁷ und klinischen Studien^{81,89} legen nahe, dass auch

zwischen der chronischen intestinalen Schistosomiasis und der Entstehung kolorektaler Karzinome eine Assoziation besteht.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob es im Kolongewebe infizierter Hamster zu einer vergleichbaren Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun wie in der Leber kommt.

Bei positivem Befund sollten anschließend zur Klärung molekularbiologischer Zusammenhänge Zellkulturversuche mit Stimulation von Kolonkarzinomzellen durch SEA durchgeführt werden.

Darüber hinaus sollte die Aktivierung von Downstream-Faktoren wie Cyclin D1 näher analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Geräte

Stickstofftank #CFB-160	Taylor-Wharton Harsco GmbH, Husum-Mildstedt
Feinwaage Satorius analytic Typ 1801	Satorius, Göttingen
Stickstoffbehälter transportierbar	KGW Isotherm, Karlsruhe
Ultra TURRAX T3	IKA-Werke, Staufen
Vortex Schüttler VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Labortechnik, Staufen
Eismaschine Scottsman AF 100	Hubbard Ice Systems, Suffolk/UK
ThermoMixer #5436	Eppendorf AG, Hamburg
MIKRO 120 (Zentrifuge)	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Gefrierschrank (-20 °C) #GNP3376	Liebherr-Werk Biberach, Biberach
Gefrierschrank (-80 °C) #907	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen

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
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm # 612-1702	VWR International GmbH, Darmstadt
Reinstwasseranlage Milli-Q Biocel und Elix 3	Merck, Darmstadt
Electrophoresis Power Supply Consort EV #243	Fisher Bioblock Scientific, Villeneuve- d'Ascq (Frankreich)
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
Microliter Syringe Model 805 N # 84856	Hamilton Company, Reno, Nevada (USA)
Biometra Fastblot	Biometra GmbH, Göttingen
Rocking Platform	VWR International GmbH, Darmstadt
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Mikrotom #RM2165	Leica, Wetzlar
Entwicklungsmaschine AGFA CP1000	Tegtmeier, Rinteln
Mikrowelle 900&Grill	Severin, Sundern
Hot Plate Heizplatte 250 V #444-0584	VWR International GmbH
Feuchtkammer	

Mikroskop DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop DMRB	Leica, Wetzlar
HERACELL 150 i CO2 Incubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (USA)
Zellkultur-Sterilwerkbank #HBB2448	Heraeus Instruments, Hanau
LaminAir® HBB #2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Magnetrührer #RCTB 00.084009	KA Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

CELLSTAR® TUBES, 15 mL; Lot: #188 271	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 1000 µL, blau; Lot: #70.762.010	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µL, farblos; Lot: #70.1130	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µL, gelb; Lot: #70.760.012	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Vernichtungsbeutel #86.1197	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Filterpapier	IKA-Werke, Staufen
Immobilon®-P Transfer Membrane #IPVH00010	Merck Millipore Limited, Tullagreen, Carrigtohill ED (Irland)
CELLSTAR® TUBES, 50 mL; Lot: #227 261	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Western Blot Box	Sigma-Aldrich, Steinheim

Entwicklungsfilme Amersham Hyperfilm ECL (18x24 cm) #28906837	GE Healthcare, England
R-Filmkassette Spezial 200 (18 x 24 cm)	Rego X-ray, Augsburg
Objektträger Super Frost Ultraplus*	R. Langenbrink GmbH, Emmendingen
CELLSTAR® Zellkultur Schale #664160	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen
CELLSTAR® 24 Well Cell Culture Plate # 662 160	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster (Österreich)
Neubauer Zählkammer #T729.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Micro-Touch® #18074824DF	Ansell, Richmond (Australien)
Biosphere® Filter Tips #70.760.211	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 100 #70.762.211	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol #60242	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris Pufferan >99,6% p.a.	Roth, Karlsruhe
HCL >37%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua bidest	Millipore, Schwalbach
Ethanol 96% (V/V), vergällt mit MEK (Methyletylketon); Lot: #27685	Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken
Ethanol 99,9% vergällt; Lot: #2522P	Berkel AHK, Lippstadt
Ethanol absolut, vergällt mit MEK (Methyletylketon) ; Lot: # 27694	Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken
Ethanol ROTIPURAN ®; Lot: #9065.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5: 1); Lot: #3029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Ammoniumperoxodisulfat #9592.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine #35925.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; Lot: #26619	Thermo Scientific, USA
Methanol #32213-2.5L-M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Milchpulver (Blotting grade) #T145.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris base #77-86-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luminol #A8511-5G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Cumarsäure #110M1259V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30% #1.072.101.000	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Citronensäure #1002440500	Merck, Darmstadt
Trinatrium-Dihydrat #6132-04-3	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid #7647-14-5	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid #7447-40-7	Sigma-Aldrich, München
Kaliumhydrogenphosphat #7778-77-0	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat #10028-24-7	Roth, Karlsruhe
HCl #84422-12	Sigma-Aldrich, München
R.T.U NORMAL HORSE SERUM (2,5%); Lot: #ZE0709	Vector Laboratories, Inc., Californien (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA), pH=7	Merk, Darmstadt
RPMI 1640 #P04-18500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA #P10-0231 SP	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

Trypan Blue Stain 0.4% #15250	Gibco™, Carlsbad, Kalifornien (USA)
DPBS #BE17-513F	Lonza Group AG, Basel (Schweiz)
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® #4720.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämalaun Sauer nach Mayer #T865.2	Roth, Karlsruhe
Methylgrün (Ethyl green) #MKBF2380V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisen(3)-chlorid-Lösung #1.03943	Fa. Merck
Ponceau de Xylidine #1B 207	Fa. Diagonal
Säurefuchsin #F8129-25g	Fa. Sigma
Phosphorwolframsäure #1.00583.0100	Fa. Merck
Orange G #1B221	Fa. Chroma
Lichtgrün SF gelblich #62110	Fa. Fluka,

Tabelle 5: Puffer und ihre Zusammensetzung

4 x Lämmli-puffer	40% Glycerin 20% Mercaptoethanol 8% SDS 0,25 M Tris HCl pH 6,8 0,02% Bromphenolblau
1 x Lämmli-puffer	4x Lämmli-Puffer mit Aqua bidest 1:4 verdünnt

Tris-HCl, pH 6,8	6,05 g Tris base (=0,5 M) in 40 mL Aqua dest. lösen; mit 1 M HCl auf pH 6,8 bringen
10 % SDS-Trenngel (für 2 Gele)	3400 µL Rotiphorese Gel 30 100 µL SDS 10% 1950 µL Trenngel-Puffer, pH 8,8 4550 µL Aqua dest. 100 µL APS 10% 10 µL TEMED
13,5% SDS-Trenngel (für 2 Gele)	4500 µL Rotiphorese Gel 30 100 µL SDS 10% 1950 µL Trenngel-Puffer, pH 8,8 3450 µL Aqua dest. 100 µL APS 10% 10 µL TEMED
3% SDS-Sammelgel (für 2 Gele)	330 µL Rotiphorese Gel 30 2130 µL Aqua dest. 830 µL Sammelgel-Puffer, pH 6,8 40 µL 10% APS 4 µL TEMED
4x Trenngel-Puffer, pH 8,8	375 mL 2M Tris/HCl 10 mL SDS 20% 115 mL Aqua dest.
4x Sammelgel-Puffer, pH 6,8	125 mL 2M Tris, pH 6,8 10 mL SDS 20% 365 mL Aqua dest.

10x Elektrophorese-Laufpuffer (für 1 L)	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin Aqua bidest ad. 1l
1x Elektrophorese-Laufpuffer	100 mL 10x Elektrophorese-Laufpuffer 900 mL Aqua dest.
Transferpuffer pH 9,2	5,82 g Tris 2,93 g Glycin 200 mL Methanol Aqua bidest ad. 1 l
TBS-Stammlösung (10 x) pH 7,5	200 mM Tris (pH=7) 1,37 M NaCl Aqua bidest ad. 1 l
TBS-T-Puffer	250 mL 10 x TBS-Stammlösung 2,5 mL Tween 20 2250 mL Aqua bidest
ECL-Entwicklungslösung	950 µL Aqua bidest 500 µL Tris Puffer 2 M pH 8,5 50 µL Luminol (250 mM) 25 µL p-Cumarsäure (90 mM) 2,6 µL H ₂ O ₂

Citratpuffer	<p>Stammlösung A: (pH= 2,1) 21,01g Citronensäure 0,1 M Aqua bidest ad 1000 ml</p> <p>Stammlösung B: (pH= 8,4) 29,41 g Trinatriumcitrat-Dihydrat 0,1 M Aqua bidest ad 1000 ml</p> <p>Gebrauchslösung: (pH=6,1) 9 ml Stammlösung A 41 ml Stammlösung B Aqua bidest ad 500 ml</p>
10x PBS	<p>80 g NaCl 2g KCl 2,45 g Kaliumhydrogenphosphat 11,5 g Dinatriumhydrogenphosphat In 900 ml Aqua bidest lösen pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen Aqua bidest ad 1000 ml</p>
1x PBS	<p>100 ml 10x PBS Aqua bidest ad 1000 ml</p>
Weigerts Hämatoxylin	<p>Stammlösung A: 100 ml 10% Stammlösung 900 ml 96%igen Ethanol</p> <p>Stammlösung B: 950 ml Aqua bidest 40ml Eisen(3)-chlorid-Lösung 10ml HCL (25%)</p>

	Bei Verwendung wird eine Gebrauchslösung aus A und B zu gleichen Teilen angesetzt.
Ponceau de Xylidine	500 ml Aqua bidest 5g Ponceau de Xylidine 2,5g Säurefuchsin 1ml Essigsäure
Orange G	500 ml aqua bidest 20g Phosphorwolframsäure Orange G
Lichtgrün	500 ml Aqua bidest 1g Lichtgrün SF gelblich 1 ml Essigsäure

Antikörper Western Blot

Tabelle 6: Primärantikörper Western Blot

c-Jun (60A8) Verdünnung 1 : 1000 Spezies: Rabbit monoclonal antibody	Cell Signaling Technology Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) #9165
Cyclin D1 (DCS-6) Verdünnung 1 : 400 Spezies: Mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas (USA) sc-20044
GAPDH Verdünnung: 1 : 10000 Spezies: Mouse monoclonal IgG2b	ProteinTech Group Inc., Rosemont (USA) 60004-1-Ig

phospho-c-Jun (Ser63) (54B3) Verdünnung 1 : 1000 Spezies: Rabbit monoclonal antibody	Cell Signaling Technology Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) #3270
α-Tubulin Verdünnung 1 : 1000 Spezies: Rabbit polyclonal antibody	Cell Signaling Technology Inc., Cambridge (Vereinigtes Königreich) #2144
beta-Actin Antikörper C4 Verdünnung: 1 : 200 Spezies: Mouse monoclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas (USA) sc-47778

Tabelle 7: Sekundärantikörper Western Blot

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP Verdünnung 1 : 5000 Spezies: Mouse polyclonal antibody	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (USA) A16072
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP Verdünnung 1 : 5000 Spezies: rabbit polyclonal antibody	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (USA) A16104

Antikörper Immunhistochemie

Tabelle 8: Primärantikörper/ Antikörper Isotypkontrolle

rabbit anti-c-Jun (60A8) monoclonaler IgG Verdünnung: 1: 100	Cell Signaling Technology #9165
rabbit anti-Cyclin D1 (92G2) monoclonal Ab Verdünnung: 1 : 100	Cell Signaling Technology #2978

ChromPure Rabbit IgG , whole molecule, Nr: 011-000-003, Size: 11,2mg/ml;	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk (UK)
ChromPure mouse IgG , whole molecule, Nr: 015-000-003, Size:5,5mg/ml.	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk (UK).

Tabelle 9: Sekundärantikörper Immunhistochemie

ImmPRESS™ HRP REAGENT KIT Peroxidase, Anti-RABBIT IgG	Vector Laboratories, Inc., MP-7401
ImmPRESS™ HRP REAGENT KIT Peroxidase, Anti-MOUSE IgG	Vector Laboratories, Inc., MP-7405
ImmPRESS™ AP REAGENT KIT Alkaline Phosphatase, Anti-RABBIT IgG	Vector Laboratories, Inc, MP-5401

Tabelle 10: Kommerzielle Kits

DAB Peroxidase Substrate Kit; Lot: # ZE0606	Vector Laboratories, Inc., Californien (USA)
HighDef red ICH chromogen (AP) #ADI-950-140-0030	Enzo, Lörrach
ImmPRESS Reagent AP Kit #MP-5401	Vector Lab, USA

Tabelle 11: Stimulanzen und Inhibitoren

<i>S. mansoni</i> -soluble egg antigens (SEA) (1,52 mg/mL)	5. Lieferung von G. Schramm, Borstel vom 19.09.2018
--	---

JNK Inhibitor II (SP600125)	CAS 129-56-6 Firma: Calbiochem Research Biochemicals, Life Science Research, Merck (Darmstadt)
MEK Inhibitor VI (U0126)	CAS 109511-58-2 Firma: Calbiochem Research Biochemicals, Life Science Research, Merck (Darmstadt)

Tabelle 12: Zelllinie- Charakteristika Colon 26

Firma	CLS Cell Lines Service Service GmbH, Eppelheim
Produktnummer	Cryovial: 400156
Organismus	<i>Mus musculus</i> (Maus)
Stamm	Balb/c
Alter	6 Monate
Geschlecht	Weiblich
Gewebe	Kolon (Epithel)
Zelltyp	Kolonkarzinom, Grad IV, undifferenziert
Wachstumseigenschaften	Monolayer, adhären
Beschreibung	Colon 26-Tumor-Zellen wurden aus einem durch N-Nitroso-N-Methylurethan (NMU) induzierten Tumor einer Maus (Balb/c) isoliert.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell

In dieser Studie wurden syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) eingesetzt. Aufgrund von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden dabei nur weibliche Hamster verwendet. Die Goldhamster wurden im Tierstall des Instituts für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gezüchtet (VTH der JLU im BFS, Schubertstraße 81, 35392 Gießen). Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit der European Convention for the Protection of Vertebrate Animals (dem Europäischen Übereinkommen zum Schutz von Wirbeltieren) sowie den Prinzipien der 3R durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (*Genehmigungsnummer* V54-19 c 20/15 c GI 18/10 Nr. A1/2014).

Für den Versuchsaufbau standen 15 Tiere zur Verfügung. Die Versuchsgruppe bestand aus 11 Tieren, die Kontrollgruppe aus 4 Tieren (s. Tabelle 13).

Dabei wurden bisex infizierte Hamster der Experimentalgruppe mit monosex infizierten Hamstern der Kontrollgruppe verglichen. Nur in den bisex infizierten Hamstern findet eine Eiproduktion statt, Würmer sind in den Tieren beider Gruppen vorhanden. Durch den Vergleich konnte sichergestellt werden, dass die Effekte durch die Eier des Parasiten und nicht durch die Würmer zustande kamen. Es wurden Gewebeproben vom Kolon der Hamster untersucht (s. Abbildung 6). Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Die Infektion der Hamster erfolgte entsprechend dem Lebenszyklus des Pärchenegels *S. mansoni*. Dieser umfasst die Schnecke *Biomphalaria glabrata*, welche als Zwischenwirt fungiert. Die Hamster wurden als Endwirt eingesetzt. Die Population des verwendeten Parasiten *S. mansoni* stammt von einem liberianischen Isolat ab, welches von der Bayer AG (Monheim, Deutschland) bezogen wurde. Um bisex (zweigeschlechtliche) und monosex (eingeschlechtliche) Wurmpopulationen zu erzeugen, wurden die Schnecken entweder mit mehreren Miracidien unterschiedlichen Geschlechts oder mit einem Miracidium eines Geschlechts infiziert. Diese konnten sich durch asexuelle Reproduktion in den Schnecken vermehren und wurden anschließend als Zerkarien von den Schnecken ausgeschieden. Zur Geschlechtsbestimmung der monosex Zerkarien wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Anschließend erfolgte die Infektion der 8 Wochen alten Hamster, wobei diese in ein Wasserbad gesetzt wurden, welches mit Zerkarien (bisex oder monosex) bestückt war. Diese konnten durch Penetration der Haut in den Endwirt eindringen und ihn so infizieren. Die Infektion wurde 46 Tage (bisex Infizierte) bzw. 67 Tage (monosex Infizierte)¹¹⁵ aufrechterhalten, um eine vollständige Reifung der Würmer sicherzustellen. Die längere Infektionsdauer der

monosex infizierten Hamster ist durch ein langsames Wachstum der ungepaarten Würmer begründet¹¹⁵. Die Hamster wurden nach Erreichen der festgelegten Infektionszeit durch eine Injektion von Ketamin/Xylazin getötet und nachfolgend durch in situ Perfusion ausgeblutet. Anschließend wurde das Kolon präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Es folgte die Verarbeitung des Präparats durch Zermörserung auf Eis bzw. durch Fixierung in Formalin und anschließende Paraffineinbettung für die histologische Untersuchung. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

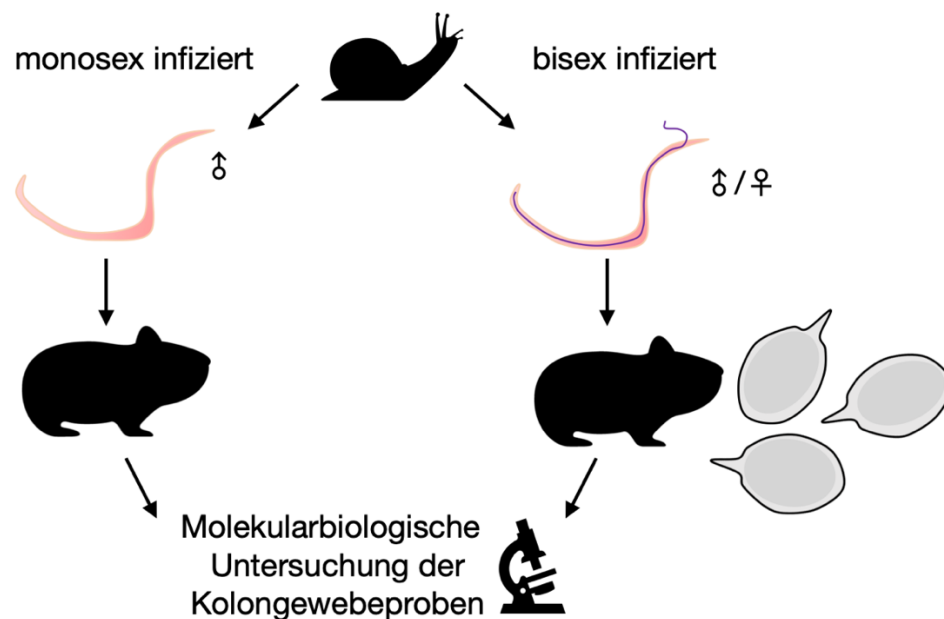


Abbildung 6: **Versuchsaufbau und Infektionsmodus.** Die Schnecke (*Biomphalaria glabrata*) fungiert als Zwischenwirt und scheidet Würmer eines Geschlechts bzw. beider Geschlechter aus. Anschließend Infektion der 8 Wochen alten Goldhamster mit den Zerkarien. Dabei entstehen bei Infektion mit Zerkarien beider Geschlechter bisex infizierte Hamster (Eiproduktion findet statt) oder bei Infektion mit Zerkarien eines Geschlechts monosex infizierte Hamster (keine Eiproduktion). Die bisex infizierten Hamster stellen die Versuchsgruppe dar, die monosex infizierten Hamster fungieren als Kontrollgruppe. Nach einer Infektionszeit von 67 Tagen (monosex) bzw. 46 Tagen (bisex) kam es zur Tötung der Hamster. Das Kolongewebe wurde anschließend präpariert und im Verlauf analysiert.

Nummer	Geschlecht/ Alter	Infektion (bs= bisex infiziert; ms= monosex infiziert)
63673	w	bs
63674	w	bs
63675	w	bs
63676	w	bs
58761	w	bs
62770	w	bs
62771	w	bs
62772	w	bs
62773	w	bs
62774	w	bs
62775	w	bs
58212	w	ms
59827	w	ms
59828	w	ms
59836	w	ms

Tabelle 13: **Aufbau Versuchsgruppe** mit Nummer, Geschlecht und Art der Infektion (bisex und monosex infiziert)

2.2.2 Zellkultur

Neben dem Tiermodell wurden im Zellkulturversuch Kolonkarzinomzellen der Zelllinie Colon 26 mit SEA stimuliert und anschließend im Western Blot analysiert.

2.2.2.1 Auftauen der Ziellinie, Zellkultivierung und -aussaat

Die Zellen wurden tiefgefroren im Stickstoffbehälter gelagert. Für die weitere Verwendung wurden sie bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in eine mit 10 ml serumhaltigem Medium bestückte Schale überführt. Die Kultivierung erfolgte in einer Zellkultur-Schale (100 x 20 mm, 58 cm² Wachstumsfläche) mit RPMI-Medium (10% FSC, 1% Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin) bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden ein- bis zweimal in der Woche passagiert. Dabei musste zunächst das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt werden, bevor

drei Waschschritte mit 10 ml PBS folgten. Es wurde 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen wurden anschließend für 5 min in den Brutschrank gestellt. Zwischenzeitlich wurde eine neue Zellkultur-Schale mit 10 ml Medium bestückt. Die Zellen wurden aus dem Brutschank entnommen und unter dem Mikroskop kontrolliert. Nachdem sich alle Zellen gelöst hatten, konnten sie in 5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert werden. Nachfolgend wurde 1 ml der Zellsuspension in die vorbereitete Schale überführt und bei o.g. Bedingungen inkubiert.

Im nächsten Schritt sollten die Zellen auf einer 24-Well-Platte ausgesät werden. Dafür wurde zunächst die in der Zellkultur-Schale befindliche Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und daraus auf das benötigte Volumen der Zellsuspension geschlossen.

Jedes Well wurde mit 500 µl serumhaltigem Medium bestückt, bevor das benötigte Volumen der Zellsuspension hinzugefügt wurde. Die 24-Well-Platte wurden bis zum nächsten Tag in den Brutschrank gegeben. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Kontrolle der Proben unter dem Mikroskop. Für die folgenden Experimente wurden nur gleichmäßig ausgesäte Zellkulturplatten verwendet.

2.2.2.2 Stimulation von Colon 26-Zellen

Die Zellen wurden am Tag vor dem Stimulationsversuch auf ein serumfreies Medium (ohne FSC und ohne Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin) überführt. Vor der Stimulation erfolgte eine erneute Kontrolle unter dem Mikroskop, um eine homogene Verteilung auf der Platte und eine Konfluenz der Zellen von 70-90% sicherzustellen. Der Überstand wurde abgesaugt und das SEA (Konzentration= 1,52 mg/ml) mit dem serumfreien Medium verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Für die Inhibitionsversuche wurde SEA auf eine Konzentration von 11,83 µg/ml verdünnt. Davon wurden jeweils 200 µl zu den Zellen pipettiert. Als Kontrollen fungierten 200 µl serumfreies Medium sowie 200 µl serumfreies Medium mit 2 µl PBS versetzt. Darauf folgte die Inkubation im Brutschrank.

2.2.2.3 Inhibition von Colon 26-Zellen

Die Zellen wurden am Tag vor der Inhibition auf ein serumfreies Medium (ohne FSC und ohne Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin) überführt. Der JNK-Inhibitor II (SP600125) und der MEK-Inhibitor VI (U0126) wurden bei einer Konzentration der Stammlösung von 20 mM in einem Verhältnis von 1 : 2000 mit serumfreiem Medium verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 10 µM entstand. DMSO wurde als Kontrolle mitgeführt, da die

Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen. DMSO wurde ebenfalls im Verhältnis 1 : 2000 mit serumfreiem Medium verdünnt. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt, bevor 200 µl der Inhibitor-Lösung bzw. der DMSO-Lösung hinzugefügt wurden. Es folgte eine Vorinkubation von 30 min im Brutschrank. Währenddessen konnten die Ansätze für die Stimulation und Inhibition vorbereitet werden. Da das Stimulanz SEA in PBS gelöst ist, wurde den Kontrollen PBS zugegeben. Die Positiv-Kontrollen wurden mit SEA versetzt. Für die Inhibitionsexperimente wurde der Inhibitor zusätzlich dem Zellkulturmedium zugegeben. Nach Ablauf der Vorinkubation konnte der Überstand abgesaugt und die jeweiligen Ansätze zu den Zellen pipettiert werden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Nach dem Stimulations-/ Inhibitionsversuch wurde der Überstand von den Zellen abgesaugt und 60 µl Lysepuffer hinzugegeben. Die Zellen wurden mit der Pipettenspitze vom Boden des Wells geschabt und es wurde mehrmals auf- und abpipettiert, um die Zellen vollständig zu lysieren und die genomische DNA zu scheren. Das Lysat wurde in Reagenzgefäße überführt und anschließend für 10 min bei 95 °C im Heizblock erwärmt. Nachfolgend wurden die Lysate bei -20 °C im Gefrierschrank tiefgefroren. Vor der weiteren Verwendung wurden die Lysate nochmals im Heizblock bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels Vortex aufgeschüttelt.

2.2.3.2 Herstellung von Gewebelysaten aus Kolonproben der Hamster

Die Gewebeproben wurden unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert. Zur Herstellung der Lysate wurden ca. 10 mg der Gewebeprobe mit Hilfe der Feinwaage in ein vorgekühltes Reagenzgefäß abgewogen und bis zur weiteren Verwendung auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurde zu jeder Probe die 40-fache Menge 1x Lämmli-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden mit den Ultraturrax auf Eis bei 0 °C homogenisiert, für 10 s bei Raumtemperatur geschüttelt und nachfolgend für 10 min bei 78,5 °C eingefroren. Um eine Denaturierung zu erreichen, wurden die Proben für 15 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt und anschließend 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reagenzgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurden die Lysate nochmals im Heizblock bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und geschüttelt.

2.2.3.3 Western Blot Analyse

2.2.3.3.1 SDS-PAGE

In diesem Schritt werden die Proteine mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel besteht hierbei aus einem Sammelgel und einem Trenngel, welche eine unterschiedliche Zusammensetzung aufweisen und sich in der Polyacrylamid-Konzentration unterscheiden. Im Sammelgel werden die Proben aufgetragen, bevor sie nach Anlegen elektrischer Spannung durch das Trenngel wandern. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Molekülgröße ab.

Zunächst erfolgte die Reinigung der Glasplatten mit 70%igen Ethanol. Diese wurden anschließend in einem Rahmen eingespannt, welcher dann in einen Ständer eingebracht wurde. Es folgte die Herstellung des Trenn- und Sammelgels, wobei darauf zu achten war, dass TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen der Gele hinzugefügt wurden, da diese zur Polymerisation führen. Die Gieß-Vorrichtung wurde bis zur Markierung mit dem Trenngel befüllt. Danach folgte die Beschichtung mit 70%igem Ethanol, um einen gleichmäßigen und blasenfreien Gelrand zu erzeugen. Nach der Polymerisation wurde das überschichtete Ethanol abgegossen und Reste mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingebracht, um Aussparungen für die Lysate zu schaffen. Dieser wurde nach der Polymerisation vorsichtig entfernt. Die Gelplatten wurden aus der Vorrichtung entnommen und in einem Elektrodenrahmen fixiert, welcher dann in der Elektrophoresekammer eingebracht wurde. Die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt, sodass die Geldaschen bedeckt waren. Nachfolgend konnten die Taschen mit Hilfe der Hamilton-Microliter-Spritze® mit jeweils gleicher Menge Probenlysat befüllt werden. Abhängig von der Konzentration des Probenlysats wurde eine Menge zwischen 10-15 µl eingesetzt. In eine Tasche wurde mit 5 µL PageRuler Prestained Marker pipettiert, welcher bei der Auswertung zur Bestimmung des Molekulargewichts diente. Nach dem Verschluss der Kammer beginnt die Elektrophorese zunächst mit einer Spannung von 100 V für 10 min und wird dann mit 130 V (Angaben jeweils für 2 Gele) für weitere 60 min fortgesetzt. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

2.2.3.3.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Die aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurden in diesem Schritt auf eine PVDF-Membran übertragen. Dafür wurde die Membran zur Aktivierung für 10 s in Methanol geschwenkt und anschließend mit Aqua bidest abgespült. Der Biometra Fastblot™ wurde mit drei Filterpapieren bestückt, welche zuvor in Transferpuffer getränkt wurden.

Darauf wurde die Membran und anschließend das Gel überführt. Zuletzt wurden drei weitere in Transferpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt. Ein Tube wurde anschließend vorsichtig über das Filterpapier gerollt. Potenzielle Luftblasen wurden mit der Prozedur aus dem Sandwich entfernt.

Nachdem der Deckel aufgesetzt und der Biometra FastblotTM mit Strom verbunden wurde, startete der elektrophoretische Transfer auf die PVDF-Membran bei 60 mA pro Membran für eine Stunde.

2.2.3.3.3 Immunchemischer Nachweis der Proteine

Die Membranen wurden aus dem Biometra FastblotTM entnommen und in eine Western Blot Box überführt. Bei den nächsten Schritten fand die Inkubation jeweils auf einem Kippschüttler statt. Unspezifische freie Bindungen wurden zunächst für 1 h mit einer 5%igen Milchpulverlösung (2,5 g Milchpulver in 5 ml TBS-T-Puffer) geblockt. Anschließend erfolgte eine zweimalige Waschung der Membran mit TBS-T-Puffer. Die Primärantikörper wurden in 5%iger Milchpulverlösung verdünnt und auf die Membran gegeben (Antikörper und Verdünnung s. Tabelle 6). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaliger Waschung mit TBS-T-Puffer für jeweils 10 min wurden die Sekundärantikörper (Antikörper und Verdünnung s. Tabelle 7) auf die Membran gegeben und für 30 min inkubiert. Dabei war darauf zu achten, dass der Sekundärantikörper gegen die Spezies des jeweiligen Primärantikörpers gerichtet sein musste. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen, bevor sie anschließend entwickelt werden konnte. Dafür wurde die Membran für einige Sekunden in ECL-Lösung gegeben und anschließend in einer Klarsichtfolie positioniert. Danach erfolgte die Entwicklung im ChemoStar ECL & Fluorescence Imager®, welcher nach unterschiedlichen Belichtungszeiten (3 s - 20 s) Chemilumineszenzaufnahmen der Membranen erstellt. Zur gleichmäßigeren Darstellung wurden an den Western Blot-Bildern In silico-Helligkeits- und Kontrastveränderungen ohne Veränderung bzw. Manipulation der Aussagekraft und gleichermaßen zwischen Kontrolle und Versuchsgruppe vorgenommen.

Alternativ konnte die Entwicklung mittels Röntgenfilm stattfinden. Hierfür wurde die Membran in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm für 2 s - 30 min in eine Filmkassette gelegt und nachfolgend in der Entwicklungsmaschine automatisch entwickelt.

Nach der Detektion wurde die Membran zwischen Papiertüchern getrocknet und gelagert.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Immunhistochemie

2.2.4.1.1 Einbettung in Paraffin und Herstellung der Präparate

Die Paraffin-Einbettung von Gewebeproben des Kolons der Hamster wurde unmittelbar nach Tötung der Tiere vorgenommen. Die Präparate wurden im Anschluss kühl, trocken und dunkel gelagert. Am Mikrotom wurden im weiteren Verlauf Schnitte von ca. 3 µm angefertigt, in ein Wasserbad gegeben und anschließend jeweils 2 Schnitte auf einen Objektträger überführt. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Danach erfolgte die Lagerung der Proben bei Raumtemperatur.

2.2.4.1.2 Immunhistochemische Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst durch eine absteigende Reihe geführt, um Paraffin zu extrahieren. Dabei durchliefen die Proben die Lösungsmittel in folgender Reihenfolge: Dreimal Xylol (10 min, 10 min, 5 min), zweimal Ethanol 99,6% (je 5 min), Ethanol 96% (5 min) und Ethanol 70% (2 min). Danach wurden die Schnitte für 5 min unter fließendem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden dann in der Mikrowelle fünfmal für je 2 min bei 750 W in Citratpuffer erhitzt, um eine Antigendemaskierung zu erreichen. Nachdem die Proben 20-30 min bei Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie erneut für 5 min unter fließendem Wasser und dann dreimal für je 2 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Blockierung der Peroxidasen, indem 37%iges Wasserstoffperoxid mit PBS zu gleichen Teilen vermischt und die Proben damit für 15 min im Dunkeln inkubiert wurden. Nachfolgend wurden die Proben erneut zunächst für 5 min in Leitungswasser und anschließend dreimal je 2 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 60 min mit 2,5% Horse-Serum und 10% BSA-Lösung zu gleichen Teilen inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Wenn beide Antikörper murinen Ursprungs waren, wurde in diesem Schritt parallel ein „mouse-on-mouse“-Block durchgeführt. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit PBS dreimal für je 2 min. Danach wurden die Primärantikörper und die Isotypkontrolle (s. Tabelle 8) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dekantiert und viermalig für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Sekundärantikörper (s. Tabelle 9) aufgetragen und für 30 min in der Feuchtkammer inkubiert. Darauf folgten vier Waschschriffe mit PBS für 5 min. Nachfolgend wurde das Substrat (AP oder DAB, s. Tabelle 10) auf die Schnitte gegeben und die Färbung unter dem Mikroskop beobachtet.

Bei gewünschter Intensität wurde die Reaktion in Aqua bidest abgestoppt. Danach wurden die Proben für 5 min unter fließendem Wasser gewaschen, bevor die Kernfärbung durchgeführt wurde. Die Kernfärbung erfolgte entweder mit Methylgrün oder mit Hämalaun Sauer nach Mayer¹¹⁶. Methylgrün wurde auf die Schnitte gegeben und auf der Heizplatte für 2 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 1 min mit Aqua bidest gewaschen. Bei der Kerngegenfärbung mit Hämalaun Sauer nach Mayer erfolgte eine Inkubation für 10 min, ein anschließendes Abstoppen in Aqua bidest und eine 10-minütige Wässerung. Zuletzt durchliefen die Objektträger zur Dehydrierung eine aufsteigende Reihe von Lösungsmitteln: Ethanol 96% (2 min), zweimal Isopropanol (je 5 min), dreimal Xylol (je 5 min) und wurden anschließend mit Pertex® und Deckgläschen abgedeckt. Die fertigen Objektträger wurden abschließend bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.4.1.3 Isotypkontrolle

Bei jeder immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten wurde parallel eine Isotypkontrolle mitgeführt, welche unspezifische Bindungen der Primärantikörper detektieren sollte. Dabei wurden anstelle der Primärantikörper IgG-Antikörper der gleichen Spezies auf die Probe gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass Primärantikörper und Isotypkontrolle in der gleichen Konzentration verwendet wurden.

Anschließend durchliefen die Isotypkontrollen und die Proben mit dem Primärantikörper einen identischen Analyseweg. Alle Isotypkontrollen der durchgeführten Versuchsreihen waren negativ und eine unspezifische Bindung der Primärantikörper konnte somit ausgeschlossen werden.

2.2.4.1.4 Hämatoxylin-Eosin - und Masson-Goldner-Färbung

Zur Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte eine Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) bzw. Masson-Goldner-Färbung an 3µm Paraffinschnitten.

Bei der HE-Färbung werden basophile Strukturen (z.B. DNA) mittels Hämatoxylin und azidophile Strukturen (z.B. Zellplasmaproteine) mittels Eosin angefärbt.

Zuerst erfolgte eine Rehydratation der Gewebeproben in der absteigenden Reihe (s. 2.2.4.1.2).

Es folgte eine vierminütige Inkubation in Hämalaun. Anschließend wurden die Objektträger für 5 min gewaschen, um das überschüssige Hämalaun zu entfernen. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte für 30 s in Eosin getaucht. Die Gewebeproben

wurden im Anschluss für 5 min gewaschen. In der aufsteigenden Reihe (s. 2.2.4.1.2) wurden die Schnitte dehydriert und zuletzt mit Pertex® und einem Deckgläschen fixiert. Für die Masson-Goldner-Färbung wurden die Proben zunächst für 1 h im Wärmeschrank bei 60 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Rehydratation der Gewebeproben in der absteigenden Reihe (s. 2.2.4.1.2). Zur Kernfärbung wurden die Proben für 5 min in Weigert's Hämatoxylin Gebrauchslösung inkubiert. Danach wurden die Gewebeproben für 5 min gewaschen. Im Anschluss folgte eine Inkubation mit Ponceau de Xylidine für 5 min. Die Proben wurden dann zweimal mit 1%iger Essigsäure gespült. Zur Entfärbung des Bindegewebes erfolgte eine kurze Inkubation in Orange G für 15 sec. Danach wurden die Proben erneut zweimal mit 1%iger Essigsäure gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben für 5 min mit Lichtgrün, um eine Gegenfärbung des Bindegewebes zu erzielen, bevor sie wieder mit 1%iger Essigsäure gespült wurden. Die Gewebeschnitte wurden in der aufsteigenden Reihe (s. 2.2.4.1.2) dehydriert und zuletzt mit Pertex® und einen Deckgläschen fixiert.

2.2.4.1.5 Auszählung der Eier und pathologische Beurteilung der histologischen Schnitte in Hämatoxylin-Eosin- und Mason-Goldner-Färbung

Zunächst erfolgte eine Auszählung der im histologischen Schnitt befindlichen Eier, um eine Infektion des jeweiligen Versuchstiers und eine im Kolon stattgefunde Eiproduktion sicherzustellen. Die histopathologische Beurteilung der Kolonschnitte wurde durch AOR Dr. Kernt Köhler, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, durchgeführt. Die Schnitte wurden hinsichtlich epithelialer Schäden, Kryptenhyperplasie/ Kryptenveränderungen, Fibrose, Inflammation und der sichtbaren Entzündungszellen beschrieben.

2.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung erfolgte zunächst eine densitometrische Analyse der Western Blots mit Hilfe der Software ImageJ V.152e ® (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) zur Ermittlung der Farbdichte einzelner Proteinbanden. Die Daten wurden nachfolgend mit der Software Microsoft Excel (für Mac Version 16.46 (21021202)) zusammengeführt. Anschließend wurden die Werte für die Farbdichte der einzelnen Banden unter Verwendung der folgenden Formel auf die Membran normiert:

$$\text{Normierter Wert (Proteinbande)} = \frac{\text{Farbdichte (Proteinbande)}}{\text{Mittelwert Farbdichte aller Banden}}$$

Nachfolgend wurde das Verhältnis der normierten Farbdichte-Werte zum jeweiligen normierten Wert der dazugehörigen Ladekontrolle (z.B. GAPDH) gebildet. Diese Proteinverhältnisse wurden für die anschließende statistische Auswertung mit der Software SPSS V.22.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, NY) verwendet.

Bei der statistischen Auswertung konnte nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden, sodass ausschließlich nichtparametrische Testverfahren Verwendung fanden. Ursächlich für diese Entscheidung war einerseits die kleine Stichprobengröße ($n=4-11$), andererseits das optische Bild der Datenverteilung im Box-Whisker-Plot-Diagramm mit teilweiser Asymmetrie, Linksgipfligkeit und Abweichungen zwischen den Varianzen.

Mittels des Mann-Whitney-U-Tests wurde auf signifikante Unterschiede der Messwerte zwischen den einzelnen Gruppen getestet. Hiermit kann überprüft werden, ob sich die zentrale Tendenz in zwei unabhängigen Gruppen signifikant unterscheidet. Dabei lautet die Nullhypothese H_0 : Die Gruppen unterscheiden sich nicht. Die Alternativhypothese H_1 lautet: Die Gruppen unterscheiden sich. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Der p-Wert wurde durch SPSS auf die dritte Nachkommastelle gerundet und wird in dieser Arbeit dementsprechend angegeben. Hinsichtlich des Stichprobenumfangs ($n < 30$) wurden die Werte der exakten Signifikanzen von SPSS zur Auswertung verwendet.

Bei Analysen mit mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Mithilfe dieses nichtparametrischen Tests kann überprüft werden, ob die untersuchten unabhängigen Gruppen der gleichen Population entstammen oder sich die zentralen Tendenzen unterscheiden. Um zu bestimmen, welche Gruppen signifikante Unterschiede aufwiesen, wurden anschließend automatisch Post-hoc-Tests mit paarweisen Vergleichen durch SPSS durchgeführt. Durch den explorativen Charakter der Studie wurde auf eine Adjustierung des α -Fehler-Niveaus verzichtet.

Für die graphische Darstellung wurden die Ergebnisse mit einem Box-Whisker-Plot-Diagramm dargestellt, woraus man Median (durchgehender Strich in der Box), oberes Quartil (obere Begrenzung der Box), unteres Quartil (untere Begrenzung der Box), Maximum (oberer Whisker), Minimum (unterer Whisker), sowie Ausreißer (Punkte) ablesen kann.

Die statistische Beratung erfolgte durch Dr. Pons-Kühnemann aus dem Institut für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

3 Ergebnisse

3.1 *S. mansoni*-induzierte granulomatöse Entzündung im Kolon infizierter Hamster

Bei den histologischen Untersuchungen wurden die Kolonproben bisex (n=11) und monosex (n=4) infizierter Hamster analysiert. Eine Eiproduktion findet nur in den bisex infizierten Tieren statt, sodass der Vergleich der Kolongewebeprobe die Beurteilung der Auswirkung der Parasiteneier auf das Gewebe ermöglicht. Die Infektionsdauer der monosex infizierten Tiere betrug 67 Tage, die der bisex infizierten Tiere 46 Tage. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Tötung war 8 Wochen zuzüglich der jeweiligen Infektionsdauer. Unter 2.2.1 findet sich eine ausführliche Beschreibung des Tiermodells. Es wurden jeweils mehrere mit Masson Goldner- bzw. Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbte Gewebeschnitte der einzelnen Versuchstiere untersucht. In den Abbildungen 7 und 8 sind Kolongewebeschnitte exemplarisch dargestellt.

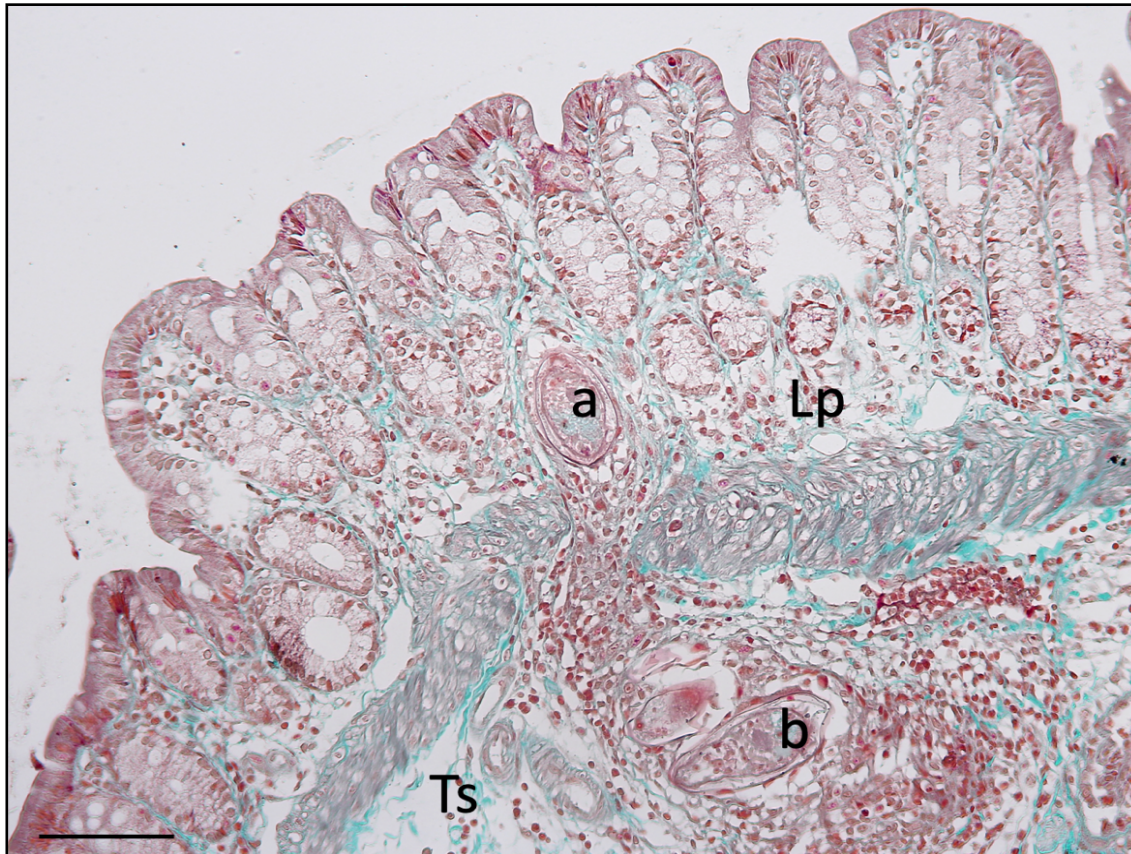


Abbildung 7: **Masson-Goldner-Färbung eines histologischen Paraffinschnitts des Kolons eines bisex infizierten Hamsters.** Es zeigen sich Eier in verschiedenen Darmwandschichten des Kolons bisex infizierter Hamster. Ei (a) im Bereich der Lamina propria (Lp), Gruppe von Eiern (b) in der Tela submucosa (Ts). Vergrößerung: 200x. Maßeinheit 100µm.

In allen histologischen Schnitten der Kolonproben bisex infizierter Hamster wurden Eier des Parasiten entdeckt und gezählt (s. Abbildung 7). Die Histologie zeigt eine granulomatöse Entzündung im Kolon bisex infizierter Hamster mit multipler Granulombildung, teilweise in allen Darmwandschichten. Mit Hilfe der Masson Goldner Färbung lässt sich kollagenes Bindegewebe, welches blau angefärbt ist, gut darstellen¹¹⁷. Bei der Hälfte der Schnitte bisex infizierter Hamster erscheinen die Granulome deutlich fibrosiert. Teilweise zeigt sich eine ausgeprägte Ödembildung und Hypertrophie im Bereich der enteralen Submukosa (s. Abbildung 8). Die Ergebnisse wurden durch AOR Dr. Kernt Köhler (Institut für Veterinär-Pathologie) validiert.

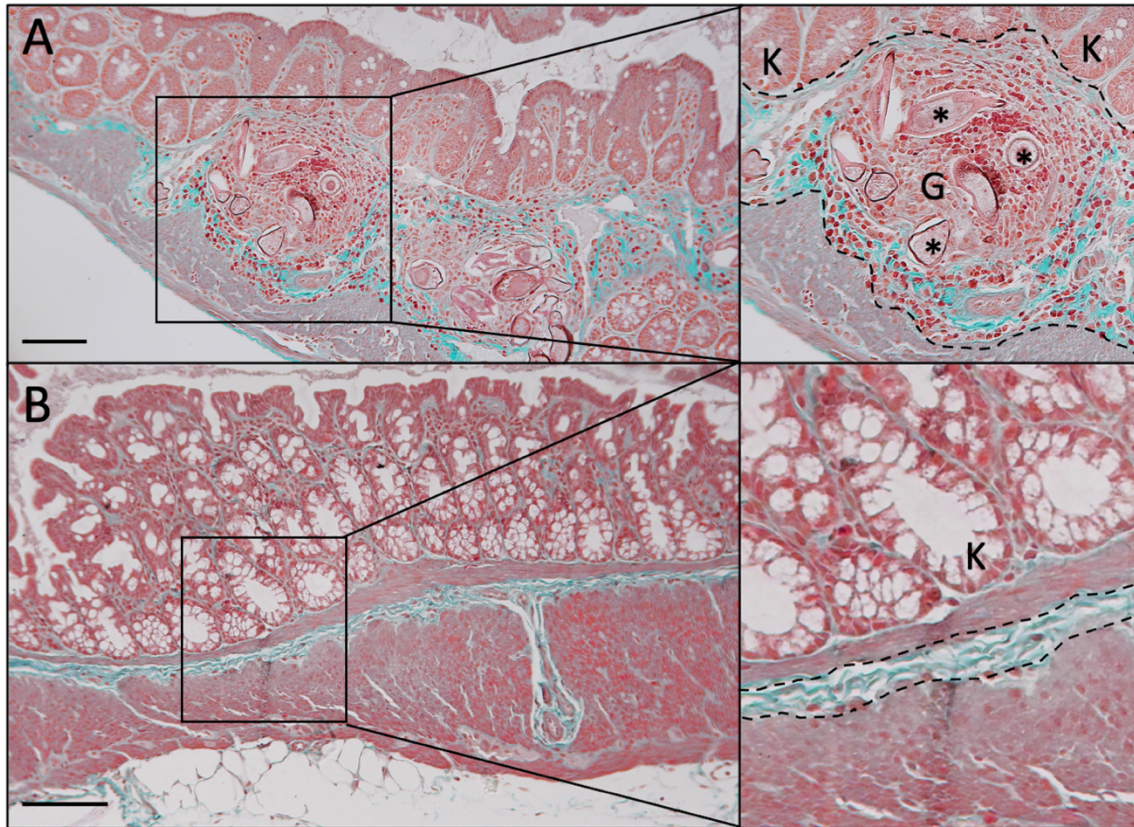


Abbildung 8: **Masson-Goldner-Färbungen histologischer Paraffinschnitte des Kolons eines bisex (A) und eines monosex (B) infizierten Hamsters.** Krypten mit Enterozyten (K). Granulomatöse Entzündung mit multipler Granulombildung (G), Ödembildung und Hypertrophie im Bereich der Tela submucosa (Ausdehnung Tela submucosa mit gestrichelten Linien dargestellt), sowie Fibrose des Gewebes (blau gefärbte fibrilläre Kollagene) bei bisex infiziertem Hamster (A). Im Vergleich physiologische Ausdehnung der Tela submucosa ohne Hypertrophie und Ödembildung (Ausdehnung Tela submucosa mit gestrichelten Linien dargestellt) bei monosex infizierter Kontrolle (B). Vergrößerte Bereiche mit Kästchen umrandet. Vergrößerung: 200x. Maßeinheit: 100µm (A und B).

3.2 Aktivierung des Protoonkogens c-Jun in Kolonzellen im Hamster-Modell

Aufbauend auf den vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob es, vergleichbar zu den Versuchen zur Leber, auch im Kolon zu einer Aktivierung Karzinogenese-assoziiertes Signalwege und insbesondere des Protoonkogens c-Jun kommt. Dafür erfolgten zunächst Proteinanalysen mittels Western Blot. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurde der Versuch dreimalig durchgeführt.

Für die Western Blot-Analysen wurden Lysate vom Gesamtkolongewebe der Hamster herangezogen. Die Gewebeproben lagen schockgefrostet vor. In den Analysen wurden monosex (n=4, Infektionsdauer: 67 Tage) und bisex (n=11, Infektionsdauer: 46 Tage) infizierte Tiere verglichen, um die Auswirkung der Parasiteneier auf die c-Jun-Expression und -Aktivierung im Kolongewebe zu untersuchen. Eine ausführliche Beschreibung des Tiermodells findet sich unter 2.2.1.

Die Western Blot-Analysen zeigen eine erhöhte Menge des Proteins c-Jun und seiner phosphorylierten Form p-c-Jun in den bisex infizierten Tieren (s. Abbildung 9). Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test verdeutlicht einen signifikanten Anstieg der Expression von c-Jun, der phosphorylierten und aktivierten Form p-c-Jun, sowie des p-c-Jun/c-Jun-Quotients (s. Abbildung 20 im Anhang). Damit lässt sich eine verstärkte kolorektale Expression und Aktivierung von c-Jun in der Gruppe bisex infizierter Hamster nachweisen. Nachfolgend ist ein repräsentativer Western Blot und ein Box-Blot-Diagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse dargestellt (s. Abbildung 9).

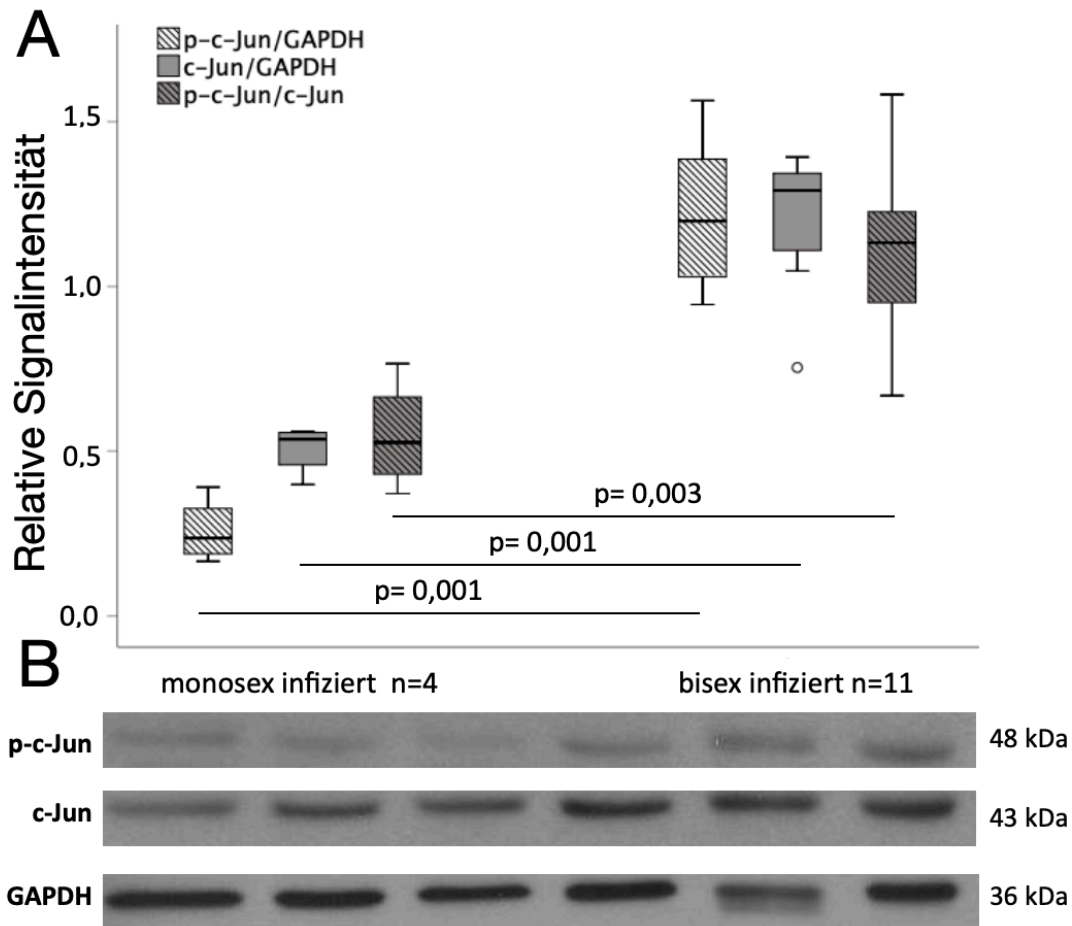


Abbildung 9: **Western Blot-Analyse der kolorektalen c-Jun-Aktivierung im Hamster-Modell.** Bei den Analysen wurde das Probenlysat jeweils mit der gleichen Proteinkonzentration aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Gruppegröße der monosex infizierten betrug n=4, die der bisexual infizierten n=11. Ein repräsentativer Western Blot wurde eingefügt. GAPDH stellt die Ladekontrolle dar (B). Die Farbdichte-Werte der Proteinbanden wurden zu der dazugehörigen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (relative Signalintensität). Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden durch ein Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt. In der Gruppe der bisexual infizierten Tiere kommt es zu einer gesteigerten c-Jun-Aktivierung (A und B). p-Werte wurden in der Grafik eingezeichnet.

3.3 Nukleäre Translokation von c-Jun in Kolonepithelzellen nahe der Parasiteneier

Da bei den Proteinanalysen mittels Western Blot eine signifikant gesteigerte Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun nachgewiesen werden konnte, sollte nun mit der Durchführung immunhistochemischer Färbungen bestätigt werden, dass diese Überexpression von c-Jun in den Enterozyten des Kolongewebes stattfindet. Das

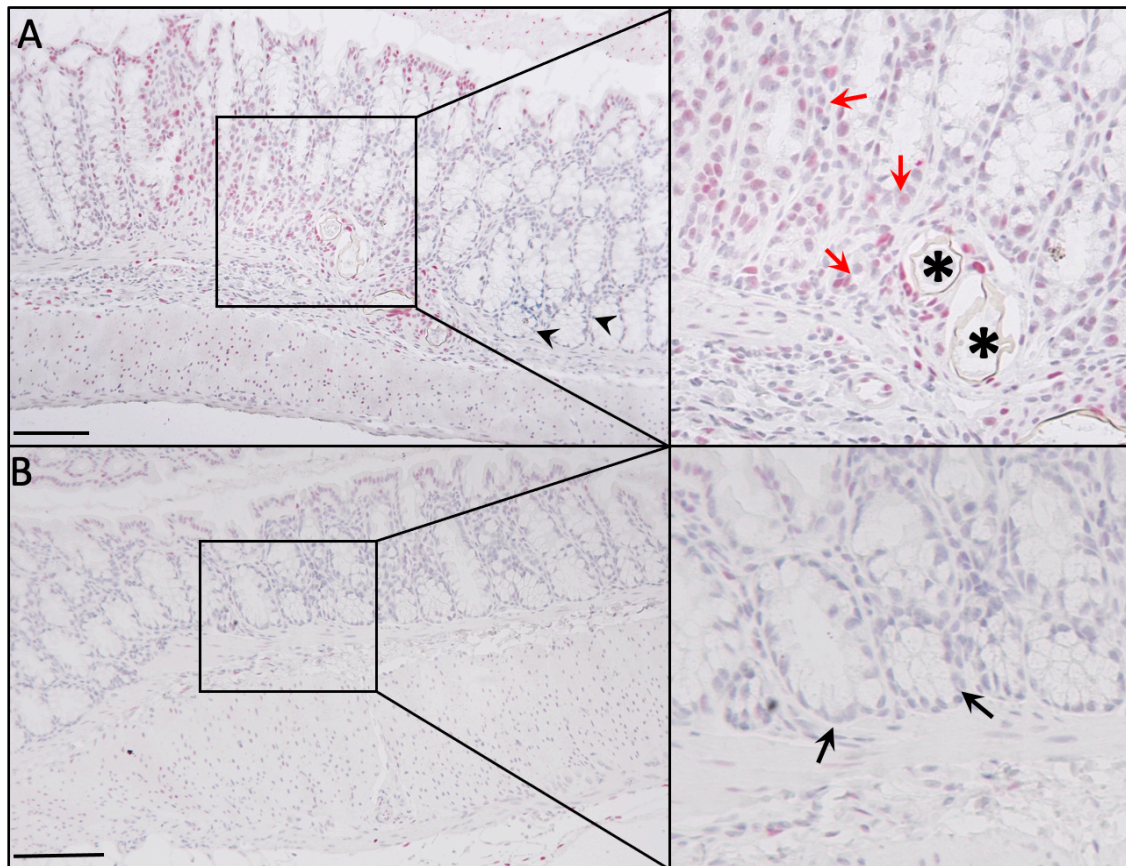


Abbildung 10: **Immunhistochemische Färbung von c-Jun mit AP und Kernfärbung durch Hämalan Sauer nach Meyer am Kolonschnitt bisex (A) und monosex (B) infizierter Hamster.** Die Färbung zeigt eine verstärkte Kernfärbung der Enterozytenkerne (rote Pfeile) nahe der Parasiteneier (Sterne), woraus sich eine Aktivierung und Translokation von c-Jun in diesen Zellen ergibt. Die Enterozyten mit weiterer Entfernung zum Ei weisen eine schwächere Kernfärbung (schwarze Pfeilspitzen) auf. Im Vergleich ist der Kolonschnitt eines monosex infizierten Tiers mit schwächerer Färbung der Enterozytenkerne dargestellt (schwarze Pfeile). Vergrößerte Bereiche mit Kästchen umrandet. Vergrößerung: x200. Maßeinheit: 100µm.

Kolongewebe ist aus mehreren Schichten mit verschiedenartigen Zellen aufgebaut⁴⁵. Bei der Karzinogenese des KRK sind vornehmlich Prozesse in den Epithelzellen des Kolons von Bedeutung⁶⁴, sodass bei dieser Arbeit der Nachweis des Protoonkogens c-Jun in den Enterozyten ausschlaggebend war. Bei der Aktivierung von c-Jun kommt es zu einer nukleären Translokation des Protoonkogens⁹⁷, daher sollte bei den immunhistochemischen Färbungen ein Nachweis von c-Jun in den Zellkernen der Enterozyten erfolgen.

Weiterhin sollte beurteilt werden, ob es insbesondere in den Epithelzellen nahe der Parasiteneier zu einer verstärkten c-Jun-Expression kommt, um eine Wirkung der Eier auf die umgebenen Zellen nachzuweisen.

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden Kolonschnitte bisex und monosex infizierter Hamster miteinander verglichen (Beschreibung des Tiermodells s. 2.2.1). Dabei wurde das Protein c-Jun mittels AP angefärbt (rote Färbung der Zellkerne) und anschließend eine Kernfärbung (lila Färbung der Zellkerne) durchgeführt. Dabei zeigt sich eine verstärkte rötliche Kernfärbung der Enterozytenkerne im Gewebeschnitt der bisex infizierten Tiere im Vergleich zu den monosex infizierten Tieren ohne Parasiteneier. Aber auch innerhalb des Gewebeschnitts der bisex infizierten Tiere lassen sich Unterschiede hinsichtlich der Kernfärbung erkennen. So zeigt sich eine verstärkte rötliche Kernfärbung der Enterozyten nahe der Parasiteneier im Gegensatz zu einer schwächeren Kernfärbung in den Enterozyten in weiterer Entfernung zu den Eiern (s. Abbildung 10).

Zusammenfassend lassen die Beobachtungen in den immunhistochemischen Färbungen auf eine nukleäre Translokation von c-Jun in den Enterozyten der bisex infizierten Proben, insbesondere in der Umgebung von Parasiteneiern, schließen (s. Abbildung 10).

3.4 Erhöhte Expression von Cyclin D1 in Kolonzellen im Hamster-Modell

c-Jun ist als Transkriptionsfaktor an verschiedenen mitogenen Signalwegen beteiligt und reguliert so z.B. die Progression des Zellzyklus über verschiedene Downstream-Faktoren. Dazu gehört auch Cyclin D1⁹⁴. Cyclin D1 hat eine Schlüsselrolle im Zellzyklus und ist für Proliferation und Differenzierung der Zellen von Bedeutung¹¹⁰.

Mit den nachfolgenden Analysen sollte untersucht werden, ob neben der erhöhten c-Jun-Expression auch eine verstärkte Expression des Downstreamfaktors Cyclin D1 im Kolongewebe der bisex infizierten Tiere zu erkennen ist.

Auch hier wurden zunächst Western Blot-Analysen durchgeführt, bei welchen Lysate vom Gesamtkolongewebe der Hamster untersucht wurden. Monosex (n=4) und bisex

(n=11) infizierte Tiere wurden verglichen. Eine detaillierte Beschreibung des Tiermodells ist unter 2.2.1 zu finden. Der Versuch erfolgte dreimal, um die Reproduzierbarkeit sicherzustellen.

Die Analysen mittels Western Blot ergeben eine verstärkte Expression von Cyclin D1 in der Gruppe bisex infizierter Hamster. Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test verdeutlicht einen signifikanten Anstieg der Cyclin D1-Expression (s. Abbildung 20 im Anhang). Nachfolgend ist ein repräsentativer Western Blot und ein Box-Whisker-Blot-Diagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse dargestellt (s. Abbildung 11).

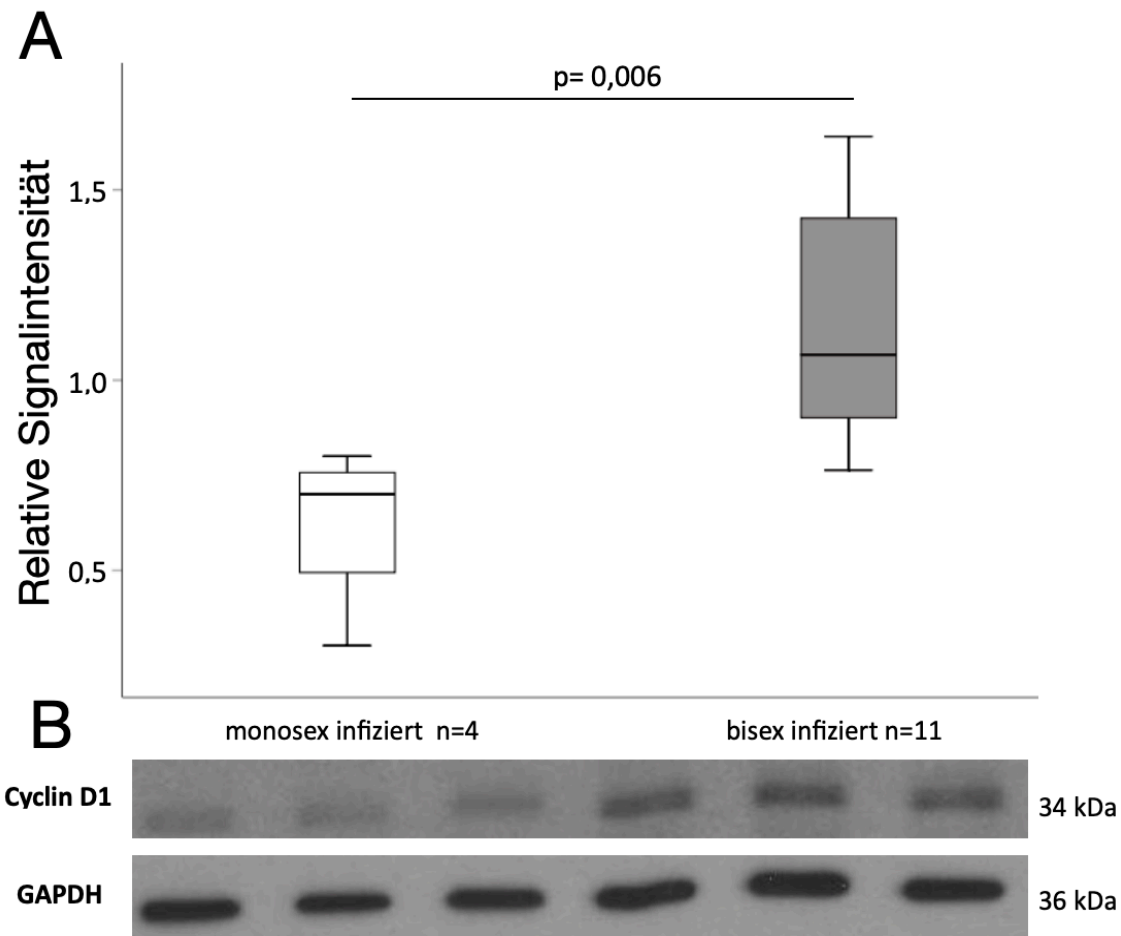


Abbildung 11: **Semiquantitative Western Blot-Analyse der Cyclin D1-Expression in Kolonzellen im Hamster-Modell.** Für die Analysen wurde Probenlysat mit der gleichen Proteinkonzentration aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Gruppengröße der monosex infizierten betrug n=4, die der bisex infizierten n=11. Ein repräsentativer Western Blot wurde eingefügt. GAPDH stellt die Ladekontrolle dar (B). Die Farbdichte-Werte der Proteinbanden wurden zu der dazugehörigen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (relative Signalintensität). Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden durch ein Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt (A). In der Gruppe der bisex infizierten Tiere kommt es zu einer gesteigerten Cyclin D1 Expression. Der p-Wert wurde in der Grafik eingezeichnet.

3.5 Erhöhte Expression von Cyclin D1 in Kolonepithelzellen nahe der Parasiteneier

Ähnlich wie bei den Analysen zum Transkriptionsfaktor c-Jun sollte auch bei Cyclin D1 der Nachweis in den Epithelzellen des Kolongewebes erfolgen, um zu beurteilen, ob es in den Enterozyten zu einer verstärkten Cyclin D1-Expression kommt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an Kolongewebeschnitten bisex und monosex infizierter Tiere durchgeführt (Beschreibung Tiermodell s. 2.2.1) Cyclin D1 wurde mittels DAB (braune Färbung der Zellkerne) angefärbt. Anschließend erfolgte eine Kernfärbung mit Methylgrün (grüne Färbung der Zellkerne).

Die immunhistochemische Färbung zeigt eine verstärkte Anfärbung von Cyclin D1 bei Enterozytenkernen der Kryptenbasis (braune Zellkerne) nahe der Parasiteneier. Bereiche in weiterer Entfernung zu den Parasiteneiern zeigen eine geringere Anfärbung. Bei den monosex infizierten Kontrollen zeigt sich eine physiologische, schwächere Cyclin D1-Färbung.

Diese Ergebnisse lassen in Zusammenschau mit den Western Blot-Analysen eine verstärkte Expression von Cyclin D1 in Enterozytenkernen in der Umgebung von Parasiteneiern erkennen (s. Abbildung 12).

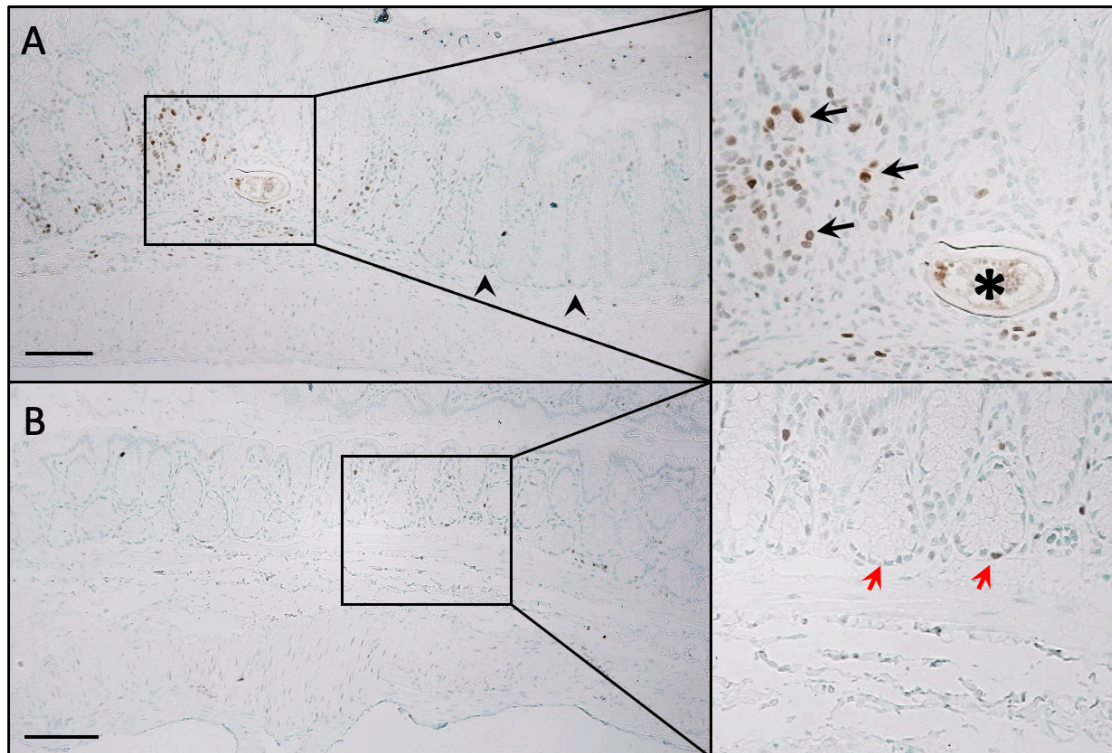


Abbildung 12: **Immunhistochemische Färbung von Cyclin D1 mit DAB und Kernfärbung durch Methylgrün am Kolonschnitt bisex (A) und monosex (B) infizierter Hamster.** Die Färbung der bisex infizierten Probe zeigt eine verstärkte Cyclin D1-Färbung von Enterozytenkernen der Kryptenbasis (schwarze Pfeile) nahe der Parasiteneier (Stern). Im Vergleich lässt sich eine geringere Färbung von zum Ei weiter entfernten Enterozytenkernen erkennen (schwarze Pfeilspitzen) (A). Bei der monosex infizierten Kontrolle findet sich eine physiologische Cyclin D1-Färbung von Enterozytenkernen der Kryptenbasis (rote Pfeile) (B). Vergrößerte Bereiche mit Kästchen umrandet. Vergrößerung: x200. Maßeinheit: 100µm (A und B).

3.6 Mechanistische Untersuchungen in Zellkultur (Colon 26-Zellen)

Nach den positiven Befunden der vorangegangenen Untersuchungen am Hamstermodell sollten anschließend Zellkulturversuche durchgeführt werden, um mögliche molekularbiologische Zusammenhänge zu untersuchen. Dabei wurden Stimulationsversuche von Kolonkarzinomzellen (Colon 26-Zellen) mit SEA durchgeführt. Die Protein-Expression der bereits in den vorangegangenen Analysen untersuchten Proteine p-c-Jun, c-Jun und Cyclin D1 wurde anschließend im Western Blot untersucht.

3.6.1 Konzentrations-/ und zeitabhängige c-Jun-Aktivierung nach Stimulation mit SEA

Um die ideale SEA-Konzentration und Stimulationszeit mit der stärksten c-Jun-Aktivierung für die Colon 26-Zellen zu ermitteln, wurde eine Konzentrations- und Zeitreihe durchgeführt. Dabei zeigte die nachfolgende Western Blot-Analyse bereits nach 30 min eine starke c-Jun-Aktivierung, welche bis zur Stimulationsdauer von 8 h wieder abnahm. Weiterhin konnte eine proportional zur SEA-Konzentration zunehmende c-Jun-Aktivierung beobachtet werden, welche bei einer SEA-Konzentration von 11,83 $\mu\text{g/ml}$ ihr Maximum erreichte (s. Abbildung 13). Für die nachfolgenden Zellkulturversuche wurde daher eine SEA-Konzentration von 11,83 $\mu\text{g/ml}$, sowie eine Stimulationszeit von 30 min festgelegt.

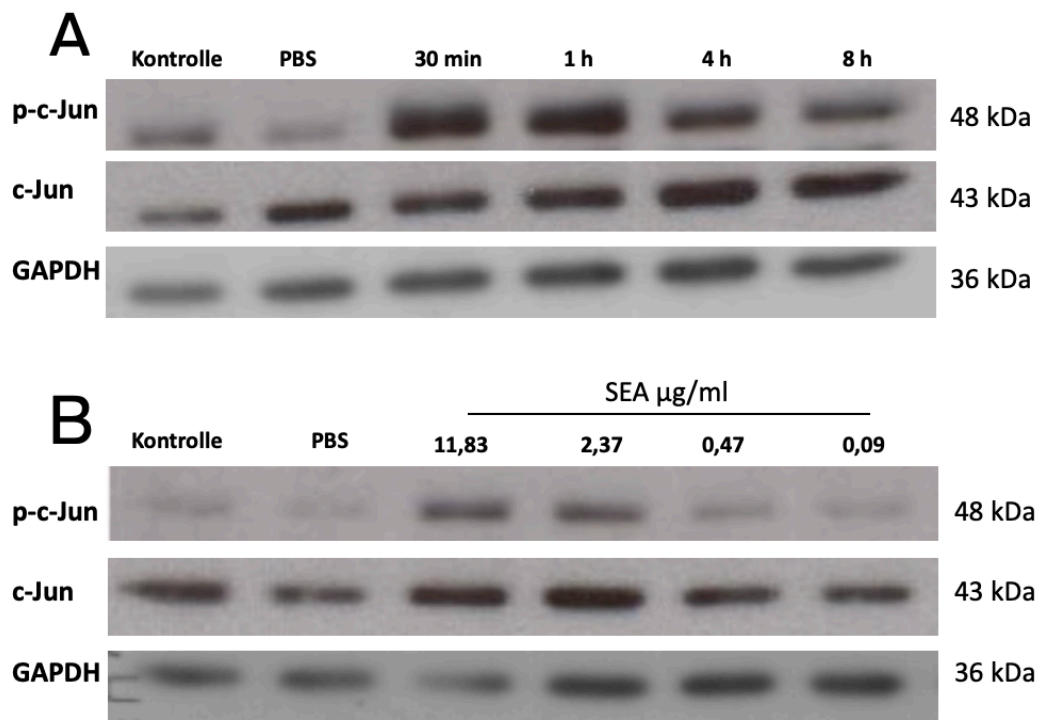


Abbildung 13: **Western Blot-Analyse der c-Jun-Aktivierung in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA.** Die Stimulation mit SEA wurde mit verschiedenen Stimulationszeiten durchgeführt (30 min, 1 h, 4 h, 8 h). Bei 30 min ist bereits eine starke c-Jun-Aktivierung zu erkennen war, welche bis zur Stimulationsdauer von 8 h wieder abnimmt (A). Weiterhin erfolgte die Stimulation mit verschiedenen SEA-Konzentrationen (0,09 $\mu\text{g/ml}$ bis 11,83 $\mu\text{g/ml}$) bei einer Stimulationsdauer von 4 h. Die c-Jun-Aktivierung nimmt mit steigender SEA-Konzentration zu (B). Ladekontrolle mit GAPDH (A und B).

3.6.2 Inhibitionsversuche mit JNK-/ und MEK-Inhibitoren an stimulierten Colon 26-Zellen

In der Zellkultur wurden anschließend Inhibitionsversuche an mit SEA stimulierten Colon 26-Zellen durchgeführt. Hierbei sollten mögliche Mechanismen der c-Jun-Aktivierung in den Zellen untersucht werden. Die Aktivierung und Phosphorylierung von c-Jun erfolgt über verschiedene Signalwege. Dazu zählt einerseits die MAP-Kinase ERK, welche zum Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg gehört und andererseits die MAP-Kinase JNK⁹⁷. Bei den Inhibitionsversuchen wurden diese beiden Signalwege durch den JNK-Inhibitor II (SP600125) bzw. den MEK-Inhibitor VI (U0126) inhibiert und anschließend die Expression und Aktivierung von c-Jun im Western Blot analysiert. Damit sollte geklärt werden, ob eine Inhibition des Signalwegs zu einer verminderten Expression und Aktivierung von c-Jun führt und die durch SEA gesteuerte c-Jun-Aktivierung folglich über den jeweiligen Signalweg verläuft. Außerdem wurde die Cyclin D1-Expression im Western Blot analysiert, um die Aktivierung von Downstream-Faktoren zu untersuchen.

Für die Stimulation wurde die zuvor ermittelte optimale SEA-Konzentration von 11,83 µg/ml und eine Stimulationszeit von 30 min verwendet. Ein Teil der Zellen wurde mit SEA stimuliert und ein anderer zusätzlich zur SEA-Stimulation mit einem Inhibitor versetzt. Weiterhin wurden zwei Kontrollen zusätzliche mitgeführt, wobei die erste aus Colon 26-Zellen mit Medium, PBS und DMSO und die zweite aus Colon 26-Zellen mit Medium, PBS und dem Inhibitor bestand.

Es folgte die Analyse der Proteine p-c-Jun, c-Jun und Cyclin D1 mittels Western Blot. Bei der statistischen Auswertung wurden die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH, c-Jun/GAPDH, p-c-Jun/c-Jun und Cyclin D1/β-Actin bzw. Cyclin D1/α-Tubulin zwischen den vier Gruppen (PBS, PBS+Inhibitor, SEA, SEA+Inhibitor) verglichen. Der durchgeführte Kruskal-Wallis-Test ergab bei den Inhibitionsversuchen mit dem JNK-Inhibitor und dem MEK-Inhibitor signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH, c-Jun/GAPDH und Cyclin D1/β-Actin zwischen den Gruppen (s. Abbildung 21 im Anhang). Folglich wurde die Nullhypothese, dass die Verteilung dieser Proteinverhältnisse zwischen den Gruppen identisch ist, verworfen. Im Anschluss an den Kruskal-Wallis-Test wurde durch SPSS automatisch eine Post-hoc-Analyse mit paarweisem Vergleichen zwischen den Gruppen durchgeführt. Dieser automatische Vergleich entfiel für den p-c-Jun/c-Jun-Quotienten, weil dieser Wert bei Stimulation und Inhibition relativ konstant blieb und keine signifikanten Veränderungen im Gesamtttest zu verzeichnen waren.

Die Ergebnisse dieser Analyse finden sich im Anhang in den Abbildungen 22-24 und werden im Folgenden näher erläutert.

3.6.2.1 Aktivierung von c-Jun und Expression von Cyclin D1 nach Stimulation mit SEA und JNK-Inhibition in Colon 26-Zellen

Zunächst wurden Inhibitionsversuche mit dem JNK-Inhibitor II (SP600125) durchgeführt, um den JNK-Signalweg zu untersuchen. Der Versuch erfolgte mit einer Stimulations- bzw. Inhibitionszeit von 30 min und wurde dreimalig durchgeführt. Im Western Blot ist eine erhöhte c-Jun-Aktivierung bei den mit SEA stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen (s. Abbildung 14). Hierbei ergab sich eine signifikante Steigerung für die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH ($p=0,000$) und c-Jun/GAPDH ($p=0,000$). Der p-c-Jun/c-Jun-Quotient blieb bei der Stimulation weitestgehend konstant. Bei den Zellen mit zusätzlicher JNK-Inhibition lässt sich im Vergleich zu den ausschließlich mit SEA stimulierten Zellen bei Betrachtung der Western Blots eine geringere c-Jun-Aktivierung erkennen (s. Abbildung 14). Die statistische Auswertung erbrachte für das Proteinverhältnis p-c-Jun/GAPDH signifikante Unterschiede ($p=0,019$) zwischen den Gruppen. Auch für c-Jun/GAPDH und p-c-Jun/c-Jun lässt sich bei Betrachtung des Box-Whisker-Blot-Diagramms eine leichte Erniedrigung der relativen Signalintensität erkennen, diese lag aber nicht im signifikanten Bereich.

Im Western Blot zeigt sich weiterhin eine in den mit SEA stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant gesteigerte Cyclin D1-Expression ($p=0,04$). Die JNK-Inhibition führte außerdem zu einer signifikanten Erniedrigung der Cyclin D1-Expression ($p=0,004$) im Vergleich zu den ausschließlich mit SEA stimulierten Zellen (s. Abbildung 15).

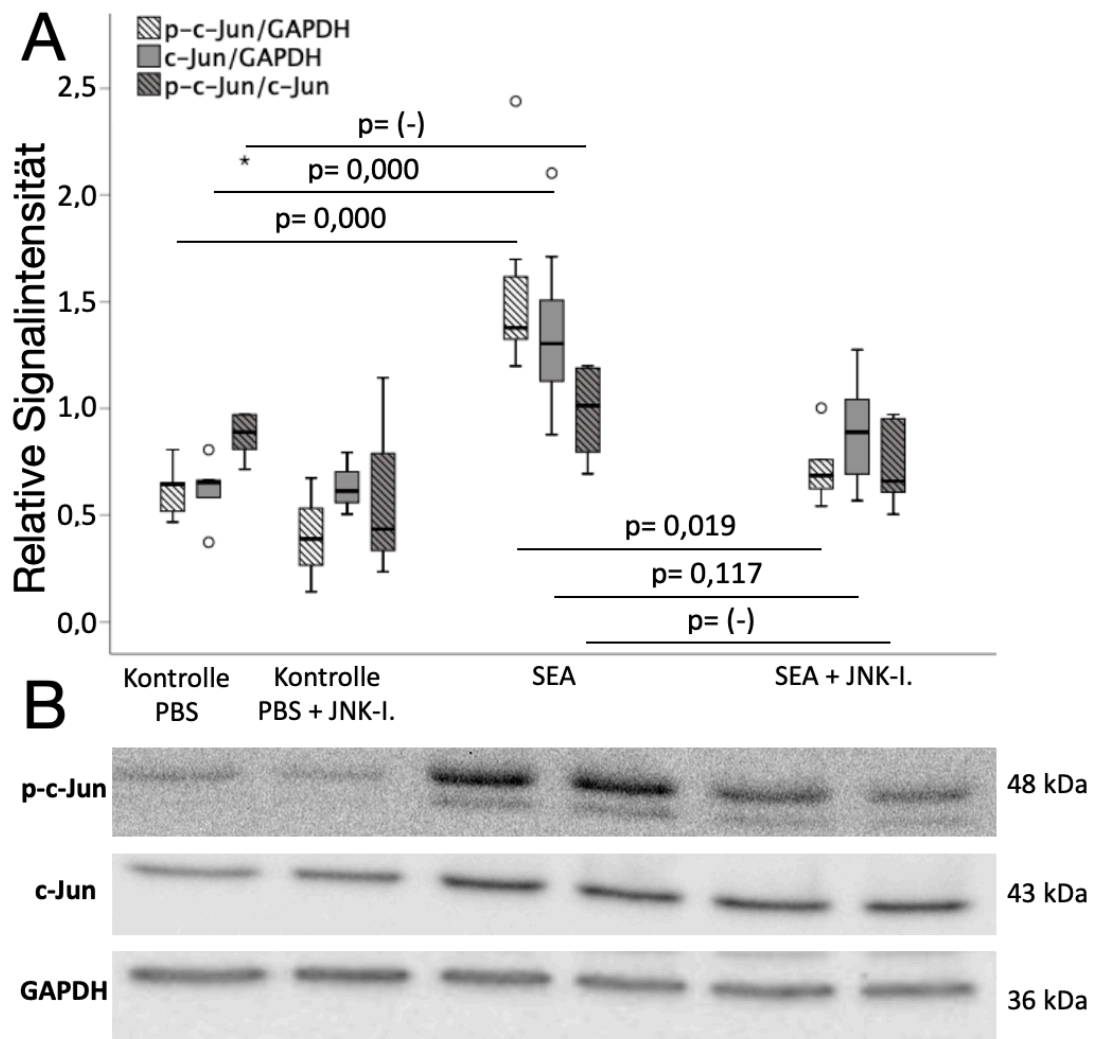


Abbildung 14: **Western Blot-Analyse der c-Jun-Aktivierung in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. JNK-Inhibition (SP600125).** Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. SEA wurde mit einer Konzentration von 11,83 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, die Stimulationsdauer betrug 30 min. Der JNK-Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Die Ladekontrolle erfolgte mit GAPDH (B). Die Farbdichte-Werte der Proteinbanden wurden zu der dazugehörigen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (relative Signalintensität). Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Analyse werden durch ein Box-Whisker-Blot-Diagramm dargestellt (A). Für die Variable p-c-Jun/c-Jun wurde kein Gruppenvergleich durch SPSS durchgeführt, da die Werte im Gesamtttest nicht im signifikanten Bereich lagen. Ein repräsentativer Western Blot wird gezeigt. Die Stimulation mit SEA führt zu einer signifikanten Steigerung der c-Jun-Expression und zu einer signifikanten Erhöhung von p-c-Jun. Der p-c-Jun/c-Jun-Quotient blieb weitestgehend konstant. Bei der Inhibition mit dem JNK-Inhibitor II lässt sich im Western Blot eine Reduktion der durch SEA induzierten c-Jun-Aktivierung erkennen. Die p-c-Jun-Expression wurde signifikant reduziert. Die c-Jun-Expression wurde, genau wie

der p-c-Jun/c-Jun-Quotient leicht, aber nicht im signifikanten Bereich, reduziert. Die jeweiligen p-Werte werden in der Grafik dargestellt.

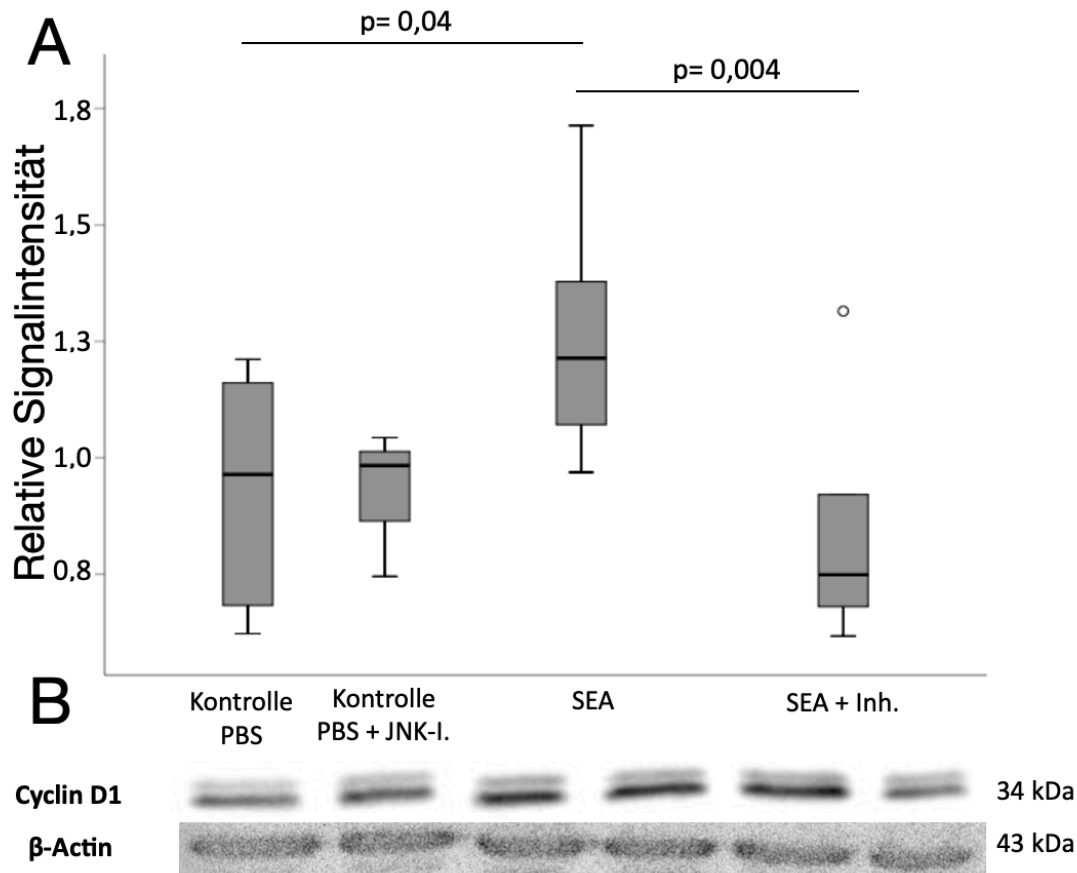


Abbildung 15: **Western Blot-Analyse Cyclin D1-Expression in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. JNK-Inhibition (SP600125).** Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. SEA wurde mit einer Konzentration von 11,83 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, die Stimulationsdauer betrug 30 min. Der JNK-Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Die Ladekontrolle wurde mit β -Actin durchgeführt (B). Die Farbdichte-Werte der Proteinbanden wurden zu der dazugehörigen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (relative Signalintensität). Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Box-Whisker-Plot-Diagramm dargestellt (A). Ein repräsentativer Western Blot wird gezeigt. Die Stimulation mit SEA führt zu einer signifikanten Steigerung der Cyclin D1-Expression. Die Inhibition mit dem JNK-Inhibitor II bewirkt eine signifikante Reduktion der Cyclin D1-Expression. Die jeweiligen p-Werte werden in der Grafik dargestellt.

3.6.2.2 Aktivierung von c-Jun und Expression von Cyclin D1 nach Stimulation mit SEA und MEK VI-Inhibition in Colon 26-Zellen

Anschließend folgten Inhibitionsversuche mit dem MEK-VI-Inhibitor, um den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg zu untersuchen. Der Versuch erfolgte mit einer Stimulations- bzw. Inhibitionszeit von 30 min und wurde zweimalig erfolgreich durchgeführt. Bei der Analyse mittels Western Blot zeigte sich eine erhöhte c-Jun-Aktivierung bei den mit SEA stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (s. Abbildung 16), wobei die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH und c-Jun/GAPDH signifikante Unterschiede ($p=0,000$) aufwiesen. Der Vergleich zwischen den Gruppen SEA und SEA+ MEK-Inhibitor ergibt eine geringere c-Jun-Aktivierung der inhibierten Zellen. Die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH und c-Jun/GAPDH zeigten hier signifikante Unterschiede ($p=0,021/p=0,004$). Das Proteinverhältnis p-c-Jun/c-Jun blieb während der Inhibition relativ konstant.

Im Western Blot besteht in den mit SEA stimulierten Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant gesteigerte Cyclin D1-Expression ($p=0,04$). Beim Vergleich der Gruppen SEA und SEA+MEK-Inhibitor lässt sich eine signifikante Erniedrigung ($p=0,045$) der Cyclin D1-Expression erkennen (s. Abbildung 17).

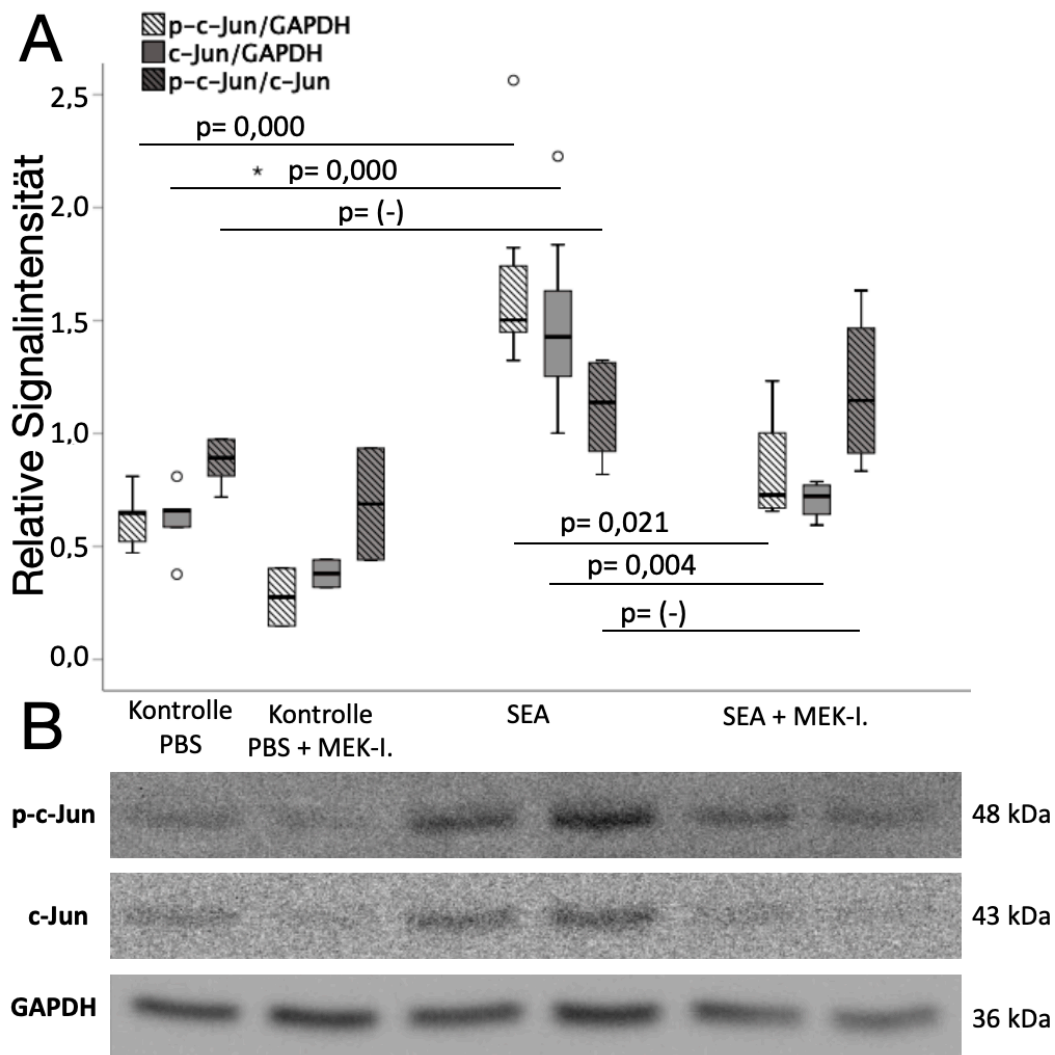


Abbildung 16: **Western Blot-Analyse der c-Jun-Aktivierung in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. MEK-VI-Inhibition.** Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. SEA wurde mit einer Konzentration von 11,83 µg/ml verwendet, die Stimulationsdauer betrug 30 min. Der MEK-Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Die Ladekontrolle wurde mit GAPDH durchgeführt (B). Die Farbdichte-Werte der Proteinbanden wurden zu der dazugehörigen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (relative Signalintensität). Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Box-Whisker-Plot-Diagramm dargestellt (A). Für die Variable p-c-Jun/c-un wurde kein Gruppenvergleich durch SPSS durchgeführt, da die Werte im Gesamtest nicht im signifikanten Bereich lagen. Ein repräsentativer Western Blot wurde eingefügt. Die Stimulation mit SEA führt zu einer signifikanten Steigerung der c-Jun-Expression und zu einer signifikanten Erhöhung von p-c-Jun. Der p-c-Jun/c-Jun-Quotient blieb weitestgehend konstant. Bei der Inhibition mit dem MEK-Inhibitor-VI lässt sich eine signifikante Reduktion der durch SEA induzierten c-Jun-Aktivierung, mit

Erniedrigung von c-Jun und p-c-Jun, erkennen. Die jeweiligen p-Werte werden in der Grafik dargestellt.

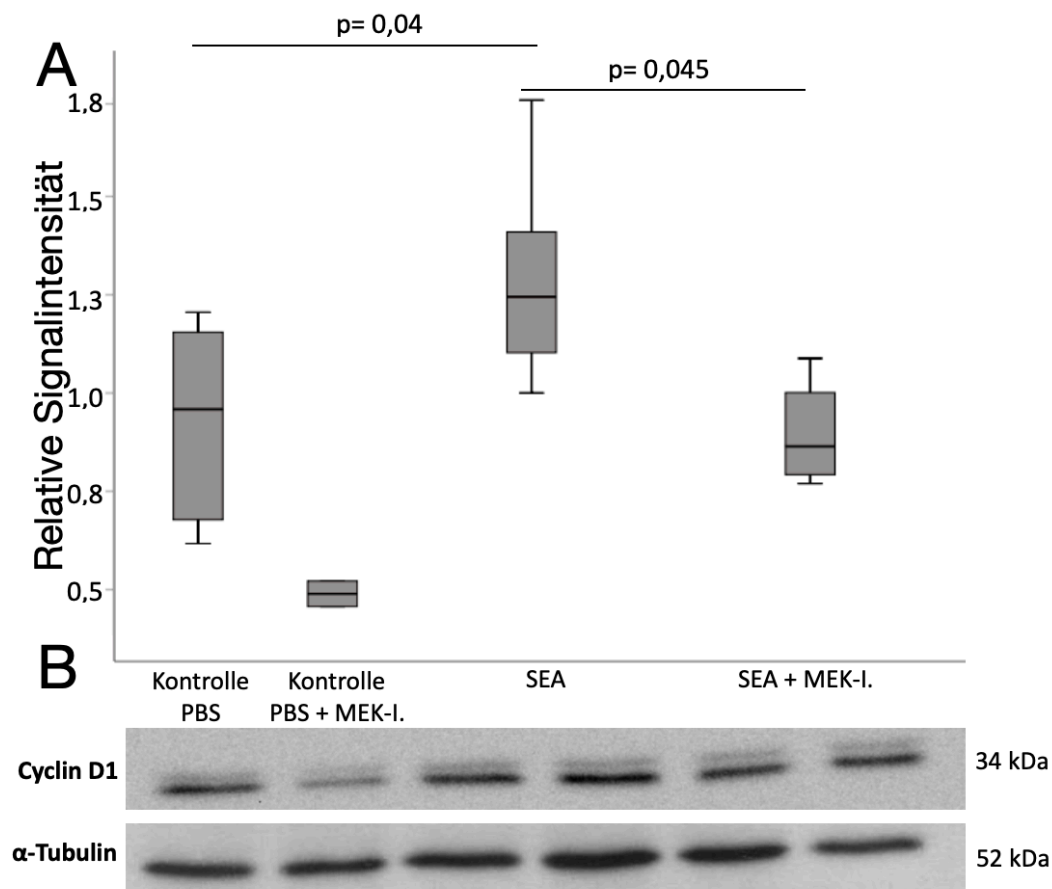


Abbildung 17: **Western Blot-Analyse Cyclin D1-Expression in Colon 26-Zellen nach Stimulation mit SEA, bzw. MEK-VI-Inhibition.** Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. SEA wurde mit einer Konzentration von 11,83 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, die Stimulationsdauer betrug 30 min. Der MEK-Inhibitor wurde mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Die Ladekontrolle erfolgte mit α -Tubulin (B). Die Farbdichte-Werte der Proteinbanden wurden zu der dazugehörigen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (relative Signalintensität). Diese Werte wurden für die statistische Auswertung verwendet. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden im Box-Whisker-Plot-Diagramm dargestellt (A). Ein repräsentativer Western Blot wurde eingefügt. Bei der Inhibition mit dem JNK-Inhibitor II lässt sich eine signifikante Steigerung der Cyclin D1-Expression erkennen. Die Inhibition führt zu einer signifikanten Erniedrigung der Cyclin D1-Expression. Die jeweiligen p-Werte werden in der Grafik dargestellt.

4 Diskussion

Schistosomiasis gehört zu den weltweit am meisten verbreiteten parasitären Infektionserkrankungen¹. Am häufigsten findet sich die Erkrankung in Afrika, Asien, Südamerika und der Karibik. Seit kurzem wird eine Ausbreitung der endemischen Gebiete durch Verbreitung des infizierten Zwischenwirtes beobachtet. Im Jahr 2013 kam es zu einem Ausbruch der urogenitalen Schistosomiasis auf der Insel Korsika, sodass eine Ausbreitung der Schistosomiasis auch in Europa beobachtet werden kann¹¹⁸. Durch diese zunehmende Ausbreitung¹¹⁸, aber ebenso durch Reiserückkehrer aus Schistosomiasis-Gebieten¹¹⁹, gewinnt die Erkrankung auch in unseren Breiten immer mehr an Bedeutung.

Neben den gesundheitlichen Folgen, die von einer Infektion ausgehen, wirkt sich die häufig entstehende chronische Anämie durch eine verminderte aerobe Kapazität negativ auf die körperliche Arbeitsleistung und Produktivität in Regionen aus, in denen Schistosomen endemisch sind⁵. Mit Schistosomiasis gehen auch reduzierte intellektuelle Fähigkeiten und akute, sowie chronische Unterernährung bei Kindern einher⁵.

Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer chronischen Schistosomen-Infektion und der Entstehung von Karzinomen. So wurde *S. haematobium* von der IARC in die Gruppe 1 (hohe Evidenz für karzinogene Wirkung) der Karzinogene eingeteilt und ist stark mit der Entstehung von Blasenkrebs assoziiert^{8,9}. *S. japonicum* wird als möglicherweise karzinogen betrachtet und mit der Entstehung von KRK in Verbindung gebracht¹⁰. Auch für *S. mansoni* liegen verschiedene Fallberichte und klinische Studien vor, die einen Zusammenhang mit Karzinomerkrankungen wie dem KRK, HCC, Prostatakarzinom und Blasenkrebs⁷⁶⁻⁸⁰ vermuten lassen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Tiermodell und an humanen Gewebeproben zeigen, dass sekretierte Ei-Antigene von *S. mansoni* zu einer permanenten Aktivierung der mit HCC assoziierten Transkriptionsfaktoren c-Jun und STAT3 in Leberzellen führen und so die Entwicklung von HCC bei Patienten mit *S. mansoni*-Infektion begünstigen könnten⁸⁸. Auch eine kürzlich veröffentlichte klinische Studie von Shousha *et al.* kam zu dem Ergebnis, dass die Infektion mit *S. mansoni* das Risiko der Entwicklung eines HCC erhöht und überdies das Outcome der Patienten verschlechtert. In der Studie wurden Patienten mit HCC bzw. Leberzirrhose mit und ohne *S. mansoni*-Infektion in der Vorgeschichte verglichen⁸³.

Neben der chronischen hepatischen Schistosomiasis führt die Infektion mit *S. mansoni* auch zu einer intestinalen Schistosomiasis¹⁵.

Fallberichte und klinische Studien weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der chronischen Infektion mit *S. mansoni* und der Entstehung des KRK bestehen könnte^{77,81,89}.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es, vergleichbar mit den Studien zur Leberkarzinogenese, auch im Bereich des Kolons zu einer Aktivierung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege und insbesondere des Protoonkogens c-Jun kommt. Hierfür wurden in Tierversuchen Kolonproben bisex und monosex *S. mansoni*-infizierter Hamster untersucht und zur Klärung molekularbiologischer Zusammenhänge Zellkulturversuche mit Kolonkarzinomzellen durchgeführt.

Wesentliche Teile der vorliegenden Dissertation wurden von der Autorin in Scientific Reports (*Nature Publishing Group*) mit der Studie von Weglage & **Wolters** *et al.* publiziert¹²⁰. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Ei-Antigene von *S. mansoni* zu einer Aktivierung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege und Protoonkogene führen. Es zeigte sich eine Aktivierung des KRK-assoziierten Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, des Protoonkogens c-Jun und assoziierter Downstream-Faktoren wie Cyclin D1 und MCM2. Diese Aktivierung konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, nach Stimulation der Kolonkarzinomzellen SW620 mit den Ei-Antigenen SEA und IPSE, beobachtet werden. Weiterhin konnten die DNA-Reparatur-Marker γ H2a.x und Parp-1 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden, was auf DNA-Schäden und genotoxischen Stress in Verbindung mit der *S. mansoni*-Infektion hinweist¹²⁰.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass *S. mansoni* eine wichtige Rolle bei der Aktivierung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege und bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms spielt¹²⁰.

4.1 *Schistosoma mansoni*-induzierte granulomatöse Kolitis in Hamstern

Die Infektion mit *S. mansoni* ist Auslöser einer hepatischen und intestinalen Schistosomiasis⁵. Die Parasiten befinden sich vornehmlich in den Mesenterialvenen des Kolons und Zäkums¹⁵. Da in Fallberichten über maligne Veränderungen des Kolons berichtet wurde⁷⁷ und die Eiablage vor allem im Kolon stattfindet, wurde dieser Darmabschnitt zur Analyse für unsere Tierversuche und Kolonkarzinomzellen für die Zellkulturanalysen ausgewählt.

Die chronische intestinale Schistosomiasis ist im humanen Wirt mit der Entstehung einer Schistosomiasis-assoziierten Kolitis verbunden³⁶. Ein Teil der abgelegten Eier passiert die Darmwand, um anschließend vom Wirt *via naturalis* mit der Faeces ausgeschieden zu werden. Ein Teil der Eier wird im Darmgewebe eingeschlossen¹⁸. Folglich kommt es

dort im Bereich der Parasiteneier zu einer granulomatösen Entzündungsreaktion und konsekutiven Veränderungen der Darmwand wie fokalen Schleimhauthyperplasien, Pseudopolypen, Polyposis⁵ und fibrotischen Läsionen²¹.

Die Kolonproben der bisex infizierten Hamster präsentierten sich in der histologischen Untersuchung mit einem den Literaturangaben vergleichbaren Phänotyp. Es zeigte sich eine chronische Entzündung mit multipler Granulombildung (s. Abbildung 8), teilweise in allen Darmwandschichten. In der Masson-Goldner-Färbung erschienen die Granulome deutlich fibrosiert. Zudem zeigte sich eine ausgeprägte Ödembildung und Hypertrophie im Bereich der Submukosa. In der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie konnten zudem humane Proben histologisch untersucht werden. Die Untersuchung dieser menschlichen Kolonbiopsien zeigte neben multiplen Parasiteneiern eine ausgeprägte multifokale granulomatöse Entzündung in der Tunica mucosa und Tela submucosa und somit ein ähnliches histopathologisches Bild¹²⁰ wie die in dieser Arbeit untersuchten Kolongewebeschnitte der Hamster. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in dieser Studie verwendete Hamster-Modell für die *S. mansoni*-induzierte Kolitis typische histologische Merkmale aufzeigt, welche mit denen beim Menschen vergleichbar sind. In Folgestudien wäre auch die nähere immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchung einer größeren Stichprobe humaner Proben von großem Interesse. Hierfür ist eine enge Zusammenarbeit mit lokalen Forschungsgruppen nötig, welche mit der durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten Studie¹²⁰ und der Kooperation mit dem Institut für Parasitologie der medizinischen Fakultät der Universität Kairo (Ägypten) und dem Institut für Parasitologie der Ribeirão Preto Medical School der Universität São Paulo (Brasilien) bereits begonnen wurde¹²⁰.

4.2 *S. mansoni*-Infektion und Karzinogenese

Ein möglicher Zusammenhang einer *S. mansoni*-assoziierten Kolitis und des KRK wurde bisher wenig untersucht. Lediglich einzelne epidemiologische Studien zum gemeinsamen Auftreten von KRK und *S. mansoni*-Infektion wurden durchgeführt. Eine Studie auf Bevölkerungsebene steht weiterhin aus^{76,84,85}.

Kleinere klinische Studien und Fallberichte geben Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen Schistosomiasis und der kolorektalen Karzinogenese besteht^{77,81,82,85,89}. Eine durch Madbouly et al. durchgeführte Studie konnte zeigen, dass eine *S. mansoni*-assoziierte Kolitis häufiger mit einem früheren Auftreten eines multizentrischen KRK, einem hohen Prozentsatz an muzinösen Adenokarzinomen sowie einem fortgeschrittenen Tumorstadium verbunden ist⁸¹.

Die Entstehung sporadischer Tumore im Darmtrakt hängt häufig mit Vorläuferläsionen wie kolorektalen Adenomen zusammen. Aus primär gutartigen Läsionen kann sich durch einen mehrstufigen Prozess, der sogenannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“, ein Karzinom entwickeln^{51,54,64,121}. Bei etwa 85% der sporadischen KRK ist Chromosomeninstabilität die Ursache für die Karzinomentstehung. Hierbei kommt es zu Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen wie APC, p53, KRAS und BRAF^{62,63}. Häufig betroffene Signalwege sind der Wnt- und MAPK (engl. mitogen-activating protein kinase) -Signalweg⁶⁶. Veränderungen in diesen Signalwegen führen zu einer unkontrollierten Proliferation und Veränderungen bei der Apoptoseregulation der Zelle⁶².

Zu molekularbiologischen Zusammenhängen und der Veränderung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege bei *S. mansoni*-Infektion gibt es bisher wenige Daten. Frühere Studien konnten eine geringere Apoptoseaktivität und eine Überexpression des Apoptose-Inhibitor-Proteins Bcl-2 im Tumorgewebe *S. mansoni*-infizierter Patienten nachweisen⁸⁹. In einer weiteren Studie wurde die regulatorische Wirkung von *S. mansoni*-Eiern auf verschiedene Epithelzelllinien untersucht. Es zeigte sich eine Hochregulation der Protoonkogene c-Myc, c-Jun, NF-κB1, Scr sowie Bcl-2 und eine Herunterregulation von p53⁸⁷. Neueste Studienergebnisse haben gezeigt, dass Bcl-2-Proteine und die Dysregulation der Apoptose eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung im Kolon spielen^{122,123}.

4.3 Aktivierung des Protoonkogens c-Jun und des Downstream-Faktors Cyclin D1 im Hamster-Modell

4.3.1 c-Jun

Die Aktivierung von c-Jun erfolgt durch verschiedene Mechanismen⁹⁵. Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Stimuli führen zur Aktivierung von MAP-Kinasen⁹² wie ERK⁹⁶ und JNK⁹², welche über unterschiedliche Signalwege in der Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun zu p-c-Jun münden⁹⁸. Um die Aktivierung von c-Jun in den Zellen zu analysieren, muss folglich auch die Messung der aktivierten Form, p-c-Jun, mittels Western Blot erfolgen^{88,124}. Darüber hinaus wurde in unseren Analysen der p-c-Jun/c-Jun-Quotient ausgewertet, um den Anteil des aktivierten, phosphorylierten c-Jun in der Zelle zu messen.

c-Jun ist als Mitglied der AP-1-Familie an verschiedenen mitogenen Signalwegen beteiligt und spielt daher bei der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle⁹¹. Zu den

Aufgaben von c-Jun zählt die Regulation der Zellproliferation und der Progression des Zellzyklus über die Inhibierung von p53, aber auch durch Stimulation von Cyclin D1⁹⁴.

Bei der Entstehung des HCC nimmt c-Jun über die antagonistische Wirkung zu p53 und der damit einhergehenden Unterbindung der Apoptose Einfluss auf die Karzinogenese⁹³. Daher ist die Untersuchung dieses HCC-assoziierten Protoonkogens auch im Zusammenhang mit der Karzinogenese bei begleitender *S. mansoni*-Infektion von Interesse. In der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie zur c-Jun-Aktivierung durch Ei-sekretierte Antigene in der Leber wurde eine permanente c-Jun-Aktivierung in Hepatozyten festgestellt⁸⁸. Es wurde gezeigt, dass c-Jun in Hepatozyten nahe der Parasiteneier und in der Nähe der Granulome aktiviert ist und die c-Jun-Aktivierung außerdem mit der Menge der Eier im Granulom korreliert⁸⁸.

Beim KRK ist neben dem Wnt-Signalweg der MAPK-Signalweg ein häufig involvierter Signalweg. Durch Mutationen beteiligter Signalmoleküle wie Ras oder RAF kommt es zu einer dauerhaften MAPK-Aktivierung^{49,62}. Die Regulation von c-Jun erfolgt über MAPK-Kinase-Wege, wobei c-Jun nach der Aktivierung von RAF durch Ras über MEK und ERK aktiviert werden kann⁹². Bei einer dauerhaften Aktivierung des MAPK-Signalwegs kann es folglich auch zu einer andauernden c-Jun-Aktivierung kommen⁹². Somit war für die vorliegende Arbeit die Analyse dieses Protoonkogens nicht nur im Hinblick auf die positiven Ergebnisse in der Studie zur Leber⁸⁸ von Interesse, sondern auch aufgrund des Zusammenhangs von c-Jun und der Karzinogenese des KRK. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die c-Jun-Expression unter Einfluss von *S. mansoni*-Eiern bereits in Zellkultur untersucht⁸⁷.

Für die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe eines Tiermodells Kolongewebe monosex und bisex infizierter Hamster mittels Western Blot und immunhistochemischer Färbung untersucht. Die Analysen der Kolongewebeproben *S. mansoni*-infizierter Hamster lassen darauf schließen, dass es auch im Darm zu vergleichbaren Prozessen wie in der Leber kommt.

Die Western Blot-Analysen zeigten eine signifikante Steigerung der c-Jun-Expression und -Aktivierung in den Gewebeproben der bisex infizierten Hamster im Vergleich zu den monosex infizierten Tieren. Außerdem konnte in immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass diese c-Jun-Aktivierung besonders stark in Enterozyten in direkter Umgebung zu den Parasiteneier zu finden ist. Im Kolongewebe der monosex infizierten Kontrollgruppe ohne Parasiteneier war die c-Jun-Färbung schwächer und gleichmäßiger verteilt als in der Versuchsgruppe.

Die Analysen mittels immunhistochemischer Färbung im Gewebeverband lassen im Gegensatz zu den Experimenten im Western Blot eine Lokalisation der gesteigerten c-

Jun-Expression und -Aktivierung auf die Enterozyten in der Ei-Umgebung zu. Im Western-Blot wurde das gesamte Kolongewebe untersucht. Hier zeigte sich eine globale Erhöhung der c-Jun-Expression im untersuchten Kolongewebe. Mittels Single-Cell-Analyse von Enterozyten aus der direkten Ei-Umgebung könnten in Folgestudien noch spezifischere Ergebnisse in der proteinbiochemischen Untersuchung erzielt werden. Hier wäre auch ein Vergleich von Zellen in direkter Ei-Umgebung zu Zellen in weiterer Entfernung zu den Parasiteneiern interessant. Die Zusammenschau der Ergebnisse aus Western Blot und immunhistochemischer Färbung zeigt, dass diese im Western Blot herausgestellte erhöhte Expression und Aktivierung von c-Jun vor allem in Enterozyten in der Ei-Umgebung stattfindet. Die Ergebnisse lassen auf eine dauerhafte Aktivierung des Karzinogenese-assoziierten Transkriptionsfaktors c-Jun schließen, welche bei der Entstehung des KRK im Rahmen einer *S. mansoni*-Infektion eine Rolle spielen könnte. In der durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten Studie konnte die erhöhte Aktivierung des Protoonkogens c-Jun neben dem Tiermodell auch in den immunhistochemischen Analysen von humanen Proben nachgewiesen werden¹²⁰.

Die vorliegenden Ergebnisse sind bedeutsam, da in bisherigen Studien insbesondere die hepatische Schistosomiasis und die damit in Verbindung stehende Entstehung eines HCC im Fokus stand^{79,83,88,125,126}.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind in die kürzlich veröffentlichte Studie von Weglage & **Wolters** et al. eingegangen, in welcher die Aktivierung des KRK-assoziierten Wnt/ β -Catenin-Signalwegs sowie des Protoonkogens c-Jun, welches eng mit dem KRK-assoziierten MAPK-Signalweg verbunden ist, gezeigt werden konnte¹²⁰.

4.3.2 Cyclin D1

Cyclin D1 spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus. Die Regulation erfolgt neben Wachstumsfaktoren und Hormonen auch über die Aktivierung onkogener Signalwege wie dem Ras-, Wnt- und NF- κ B-Signalweg^{110,113}. In gesunden Zellen ist die Expression, Aktivierung, der Abbau und die Lokalisation von Cyclin D1 stark kontrolliert¹⁰⁶. Eine Fehlregulation kann durch den Einfluss von Cyclin D1 auf Proliferation, DNA-Schadensantwort, DNA-Replikation und -stabilität, Seneszenz und Zellmigration die Tumorentstehung begünstigen¹¹³. So spielt Cyclin D1 bei der Karzinogenese verschiedener Karzinome wie dem Mamma-Karzinom, Melanom und Prostatakarzinom, aber auch dem Kolonkarzinom eine Rolle¹¹⁰.

Zu den Proteinen, welche Cyclin D1 regulieren, gehört der Transkriptionsfaktor c-Jun. Er reguliert die Zellzyklus-Progression über die Stimulation von Cyclin D1 und beschleunigt dadurch den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus⁹⁴.

Es liegt nahe, dass es durch die in den proteinbiochemischen und immunhistochemischen Analysen gezeigte erhöhte Aktivierung von c-Jun in den Zellen nahe der Parasiteneier auch zu einer erhöhten Expression von Cyclin D1 kommt. Die erhöhte Cyclin D1-Expression könnte die Karzinomentstehung bei gleichzeitiger *S. mansoni*-Infektion begünstigen. Aufgrund dessen wurde dieser Aspekt in der vorliegenden Studie näher untersucht.

In den Analysen mittels Western Blot konnte eine signifikante Steigerung der Cyclin D1-Expression im Kolongewebe bisex infizierter Hamster im Vergleich zu den monosex Infizierten ermittelt werden. In den immunhistochemischen Färbungen des Darmgewebes zeigte sich eine besonders starke Cyclin D1-Expression in Enterozyten nahe der Parasiteneier. Die Färbungen der monosex infizierten Tiere wiesen eine physiologische geringere Expression von Cyclin D1 auf, welche im Kolongewebe gleichmäßig auftrat. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es in den Enterozyten in direkter Ei-Umgebung auch zu einer verstärkten Expression vom Downstream-Faktor Cyclin D1 kommt. In der Studie Weglage und **Wolters et. al** konnte immunhistochemisch auch in humanen Kolongewebeproben nukleäres Cyclin D1 in Enterozyten nahe der Parasiteneier nachgewiesen werden. Eine Doppelfärbung mit Anfärbung von Cyclin D1 und c-Jun, welche das gleichzeitige Vorkommen beider Proteine in einer Zelle nachweist, wurde in der vorliegenden Studie noch nicht vorgenommen, sollte allerdings nach Verfeinerung der Färbetechniken in Folgestudien ergänzt werden.

In einer Studie von Zalata *et al.* wurde die Expression von Bcl-2 und die Apoptoseaktivität im Kolonkarzinomgewebe von Patienten mit und ohne *S. mansoni*-Infektion untersucht. Dabei konnte eine geringere Apoptoseaktivität und Überexpression von Bcl-2 bei Patienten mit Schistosomiasis gezeigt werden⁸⁹. Bcl-2 ist ein Apoptose-Inhibitor und ist ähnlich wie Cyclin D1 bei verschiedenen Karzinomkrankungen überexprimiert^{89,122}. In der Studie von Zalata *et al.* wurden immunhistochemische Färbungen für Bcl-2 durchgeführt. Die Analysen beschränkten sich hier allerdings darauf, ob Bcl-2 im untersuchten Gewebe angefärbt werden konnte oder nicht. Aussagen zur Lokalisation in Bezug auf die Parasiteneier wurden nicht getroffen⁸⁹. Auch die Untersuchung von Bcl-2 könnte Gegenstand von Untersuchungen in Folgestudien sein. Insbesondere wäre hier interessant, ob Bcl-2, vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, in Enterozyten in direkter Ei-Umgebung gesteigert exprimiert wird. Verschiedene Publikationen^{87,89,122} und die unter 4.3 erläuterten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Auswirkungen einer *S. mansoni*-Infektion auf die Expression von Cyclin D1, Bcl-2 und andere Proteine, die eng mit der Regulation von Proliferation und Apoptose verbunden

sind. Diese Veränderungen könnten Enterozyten für eine neoplastische Transformation prädisponieren und Malignität fördern. Im folgenden Schaubild (s. Abbildung 18) werden diese Zusammenhänge dargestellt.

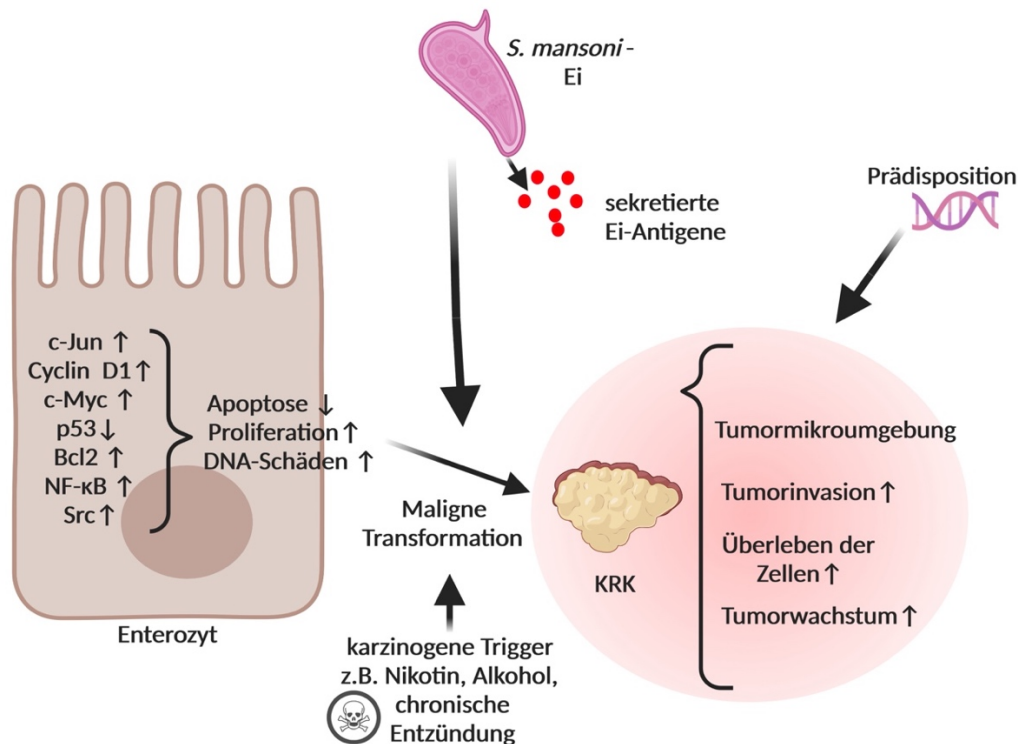


Abbildung 18: **Schematische Zusammenfassung der bisherigen Daten über *S. mansoni*-Ei-Antigene und Entstehung des KRK.** Die Parasiteneier sekretieren Antigene mit starken Auswirkungen auf die umgebenden Zellen. Die Ei-Antigene (rote Punkte) führen zu einer veränderten Expression von Proteinen wie z.B. c-Jun, Cyclin D1, p53 und c-Myc in Enterozyten des Wirtsgewebes. Diese Veränderungen können verschiedene Prozesse in den Zellen bedingen und z.B. Auswirkungen auf die Apoptoseaktivität und Proliferation in den Enterozyten haben. Dies könnte Enterozyten für eine neoplastische Transformation prädisponieren oder Malignität fördern. Erzeugt mit BioRender.com, Online-Link: <https://biorender.com/> (Zugriff am 10.09.2022).

4.4 Aktivierung von c-Jun und Expression von Cyclin D1 nach Stimulation mit SEA im Zellkulturmodell

Zu molekularbiologischen Mechanismen und der Wirkung einer *S. mansoni*-Infektion auf Darmepithelzellen gibt es bisher wenige Erkenntnisse. Die Ergebnisse der Versuche im Hamstermodell legen einen Mechanismus der c-Jun-Aktivierung nahe, der von aus den Parasiteneiern freigesetzten löslichen Substanzen abhängig ist. Dieser Mechanismus

wurde in Zellkulturversuchen näher untersucht. Colon 26-Zellen wurden mit SEA stimuliert und die Protein-Expression von c-Jun, p-c-Jun und Cyclin D1 anschließend im Western Blot ermittelt. Vorversuche zeigten eine gesteigerte c-Jun-Expression und -Aktivierung nach Stimulation mit SEA. Zunächst wurde in der Zellkultur eine Konzentrations- und Zeitreihe durchgeführt, um optimale Versuchsbedingungen zu ermitteln. Es zeigte sich, dass die Aktivierung bei der höchsten SEA-Konzentration am stärksten war und eine erhöhte c-Jun-Expression bereits ab einer Stimulationszeit von 30 min zu verzeichnen war, sodass diese Parameter als Versuchsbedingungen festgelegt wurden.

In den Stimulationsversuchen konnte eine Steigerung der c-Jun-Aktivierung und -Expression durch Stimulation mit SEA beobachtet werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH und c-Jun/GAPDH.

SEA stellt ein Extrakt aus *S. mansoni*-Eiern dar und besteht aus einer Vielzahl von Schistosomen-Antigenen. Zu den Hauptbestandteilen gehören die Glykoproteine IPSE/alpha-1 und omega-1²⁵. Diese Ei-Antigene sind die bisher am besten untersuchten Ei-Sekrete. Omega-1 kann durch Glykosylierung an den Mannose-Rezeptor von dendritischen Zellen binden und nimmt über Ribonukleaseaktivität Einfluss auf die Proteinsynthese²⁸. Weiterhin führt es über die Konditionierung von dendritischen Zellen zu einer Polarisation von TH2-Zellen^{27,28}. Alpha-1 hat die Eigenschaft, die Freisetzung von IL-4 aus basophilen Granulozyten zu induzieren³⁰. Weiterhin enthält das Protein eine Kernlokalisierungssequenz, welche ihm nukleäre Translokation und DNA-Bindung innerhalb der Wirtszelle ermöglicht³².

Diese molekularbiologischen Zusammenhänge zeigen, dass die Ei-Sekrete verschiedene Eigenschaften und Wirkungen besitzen und so auf unterschiedliche Weise mit dem Gewebe des Wirts interagieren können.

So ist es auch vorstellbar, dass die Ei-Sekrete Einfluss auf verschiedene intrazelluläre Signalwege in der Wirtszelle nehmen und die Expression und Aktivierung von Protoonkogenen wie c-Jun modulieren können. Anders als die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH und c-Jun/GAPDH blieb der p-c-Jun/c-Jun-Quotient während der Stimulationsversuche mit SEA weitestgehend auf einem Niveau. Dieser Quotient zeigt den Anteil von aktiviertem, phosphoryliertem c-Jun im Vergleich zur nicht aktivierten Form c-Jun in der Zelle an. Der Wert steigt beispielsweise an, wenn die Expression von c-Jun auf einem Niveau bleibt, aber eine Aktivierung und Phosphorylierung zu p-c-Jun stattfindet.

Bei den Stimulationsversuchen mit SEA stieg neben der c-Jun-Aktivierung allerdings auch die c-Jun-Expression. Das wäre eine mögliche Erklärung, weshalb der p-c-Jun/c-

Jun-Quotient, trotz erfolgter c-Jun-Aktivierung und gesteigerter Expression des Protoonkogens, nahezu unverändert blieb.

In der von der Autorin veröffentlichten Publikation (Weglage und **Wolters** *et al.*, 2020) konnte gezeigt werden, dass SEA und IPSE zu einer verstärkten Expression und Aktivierung von c-Jun in SW620-Zellen, einer humanen Kolonkarzinomzelllinie, führen¹²⁰. In der vorausgegangenen Studie zur Wirkung der *S. mansoni*-Infektion in der Leber wurden primäre Leberzellen (hiPS-Hep) und humane Leberzellkarzinomzellen mit SEA und IPSE stimuliert. Auch hier stellte sich eine erhöhte c-Jun-Expression und Aktivierung bei Stimulation dar⁸⁸. Die Ergebnisse aus den bereits durchgeführten Studien und aus den in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuchen legen nahe, dass die Ei-Sekrete von *S. mansoni* zu einer Aktivierung von c-Jun in Karzinomzellen führen können.

Weiterhin wurde in den Western Blot-Analysen die Cyclin D1-Expression untersucht. Dabei ergab sich eine signifikante Steigerung der Cyclin D1-Expression nach Stimulation der Colon 26-Zellen mit SEA. Neben der Hochregulation des Upstream-Faktors c-Jun konnte in den Zellkulturversuchen durch die Stimulation mit SEA demnach auch eine Erhöhung des Downstream-Faktors Cyclin D1-Expression beobachtet werden. Dieses Ergebnis war durch die molekularbiologischen Zusammenhänge von c-Jun und Cyclin D1 zu erwarten⁹⁴ und spiegelt zudem die Ergebnisse aus dem Tiermodell wider, bei welchem auch eine parallele Erhöhung von c-Jun und Cyclin D1 zu verzeichnen war.

Auch in der humanen Kolonkarzinomzelllinie SW620 konnte bei Stimulation mit SEA eine signifikant erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Cyclin D1 nachgewiesen werden¹²⁰. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine ähnliche Tendenz wie die der publizierten Studien^{88,120} und lassen darauf schließen, dass *S. mansoni* die untersuchten Karzinogenese-assoziierten Signalwege sowohl in murinen als auch in humanen Zellen¹²⁰ aktiviert.

Da SEA ein komplexes Gemisch verschiedener Ei-Antigene ist, wäre es sinnvoll, in nachfolgenden Experimenten die Wirkung einzelner Ei-Sekrete zu untersuchen. Auch die Untersuchung der Auswirkung einer SEA-Stimulation auf andere Proliferationsmarker wie MCM2¹²⁷ sowie auf Proteine, welche für die Apoptoseregulation von Bedeutung sind, z.B. p53⁹⁴ und Bcl-2⁸⁹, wäre ein weiterer zu untersuchender Aspekt.

4.5 JNK II/MEK VI-Inhibition in Colon 26-Zellen – Mögliche mechanistische Erklärungen der c-Jun-Aktivierung

Um zu ermitteln, über welchen Signalweg SEA in den Zellen zu einer c-Jun-Aktivierung führt, wurden, neben der Stimulation mit SEA, Inhibitionsversuche durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde mit SEA stimuliert und ein anderer Teil zusätzlich mit einem Inhibitor (JNK-Inhibitor II und MEK-Inhibitor VI) behandelt. Nachfolgend wurde die p-c-Jun-, c-Jun-, sowie Cyclin D1-Expression im Western Blot analysiert. Mit dem Vergleich von stimulierten Zellen und zusätzlich inhibierten Zellen sollte ermittelt werden, ob es durch die Zugabe des Inhibitors zu einer verringerten Proteinexpression kommt. In diesem Fall kann vermutet werden, dass das Signal zur Steigerung der Proteinexpression durch SEA über den entsprechenden Signalweg zum jeweiligen Protein gelangt.

Bei den Inhibitionsversuchen mit dem JNK-Inhibitor II (SP600125) ließ sich bei den Zellen mit zusätzlicher JNK-Inhibition im Vergleich zu den ausschließlich mit SEA stimulierten Zellen eine sichtbare Reduktion der c-Jun/ p-c-Jun- und Cyclin-D1-Expression im Western Blot erkennen. Die statistische Auswertung ergab signifikante Ergebnisse sowohl für das Proteinverhältnis p-c-Jun/GAPDH als auch für Cyclin D1/ β -Actin.

Bei den Inhibitionsversuchen mit dem MEK-Inhibitor VI (U0126) waren die Ergebnisse ähnlich zu denen bei der JNK-Inhibition. Die mit dem MEK-Inhibitor versetzten Zellen zeigten im Western Blot im Vergleich zu den ausschließlich stimulierten Zellen eine deutliche Reduktion der c-Jun-/ p-c-Jun-Expression. Auch eine deutliche Reduktion der Cyclin D1-Expression war erkennbar. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung waren für die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH, c-Jun/GAPDH und Cyclin D1/ α -Tubulin signifikant.

JNK und MEK sind MAP-Kinasen, welche an der Aktivierung von c-Jun beteiligt sind und wurden deshalb zur Untersuchung für die Inhibitionsversuche ausgewählt. JNK kann durch verschiedene Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone aktiviert werden. Über die Aktivierung von MKK 4/7 kommt es dabei zur JNK-Aktivierung, welches wiederum c-Jun durch Phosphorylierung aktiviert⁹⁷. MEK gehört zum Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg. Dieser wird über verschiedene extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren, aktiviert. MEK aktiviert dabei ERK, welches wiederum zur c-Jun-Aktivierung beiträgt^{92,96}.

SP600125 inhibiert JNK 1/2/3 reversibel und ist ein kompetitiver Anthrapyrazolon-Inhibitor. Dabei konkurriert er mit ATP (Adenosintri-phosphat) um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum von JNK. In der Zelle kommt es dadurch zu einer Hemmung der c-Jun-

Aktivierung^{128,129}. U0126 ist ein Inhibitor von MEK1/2. Durch die Inhibition des MAPK-Signalwegs hemmt er die c-Jun- und c-Fos-Expression¹³⁰.

Bei den JNK-Inhibitionsversuchen zeigte sich für das Proteinverhältnis c-Jun/GAPDH eine sichtbare Reduktion der relativen Signalintensität im Western Blot, welche bei der statistischen Auswertung jedoch nicht im Signifikanzbereich lag. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass SEA über den JNK-Signalweg zwar eine Aktivierung von c-Jun zu p-c-Jun induziert, sich diese Aktivierung jedoch nur leicht auf die c-Jun-Expression in der Zelle auswirkt. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass SEA verschiedene Signalwege beeinflusst. Bei einer JNK-Inhibition könnte das Signal über den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg in die Zelle gelangen und so trotz Hemmung des JNK-Signalwegs eine Steigerung der c-Jun-Expression bewirken. Auch die geringe Stichprobenzahl im Zellkulturversuch könnte eine Auswirkung auf die Signifikanz der Ergebnisse haben. In Folgestudien sollten trotz der eingeschränkten SEA-Verfügbarkeit größere Stichprobenzahlen gewählt werden, um diesen Faktor auszuschließen.

In der von der Autorin veröffentlichten Studie (Weglage und Wolters *et al.*) wurden ebenfalls Inhibitionsversuche in der Zellkultur durchgeführt. Dabei wurden humane SW620-Zellen neben der Stimulation mit SEA und IPSE ebenfalls mit den Inhibitoren JNK II und MEK VI behandelt. Bei der Untersuchung dieser humanen Kolonkarzinomzellen zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen mit den murinen Zellen der vorliegenden Arbeit durch die Inhibition eine ähnliche Reduktion der c-Jun-Expression und -Aktivierung und der Cyclin-D1-Expression¹²⁰.

Die vorliegende Studie führt zu dem Ergebnis, dass die c-Jun-Expression und -Aktivierung und die Cyclin D1-Expression, durch Inhibition mit dem JNK-Inhibitor II und dem MEK-Inhibitor VI, abnimmt. Eine Reduktion der c-Jun-Expression und -Aktivierung bei Zugabe des Inhibitors spricht, insbesondere in Zusammenschau mit den Ergebnissen, welche zur humanen Zelllinie SW620 vorliegen¹²⁰, für einen Verlauf des Signalwegs zur c-Jun-Aktivierung durch SEA über die MAP-Kinasen MEK und JNK und damit über den JNK- bzw. Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg.

In Folgestudien sollte ggf. ein größerer Stichprobenumfang gewählt werden, um Effekte noch besser nachweisen zu können. Bei der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund einer beschränkten Menge eines homogenen SEA eine geringere Stichprobengröße gewählt. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Inhibition zusätzlicher Kinasen der Signalwege im Zellkulturversuch, z.B. ERK, um weitere Informationen über die SEA-induzierte c-Jun-Aktivierung zu erhalten.

Die Western Blot-Analysen im Zellkulturversuch ergaben, dass die Inhibierung mit den Inhibitoren SP600125 und U0126 jeweils nur eine unvollständige Reduktion der c-Jun-Expression und Aktivierung zur Folge hat. Das spricht ebenfalls dafür, dass die SEA-induzierte c-Jun Aktivierung zumindest über zwei Signalwege verläuft. Dieser Aspekt wird nun in Folgestudien unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht. Im Zellkulturversuch werden Zellen zeitgleich mit mehreren Inhibitoren behandelt, mit dem Ziel, weitere Signalwege zu ermitteln, die die SEA-induzierte c-Jun-Aktivierung zur Folge haben.

4.6 Ausblick und Anwendung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von *S. mansoni* Ei-Antigenen auf das Protoonkogen c-Jun im Tiermodell und in vitro mittels Zellkulturversuch untersucht. Durch die Identifikation dieser molekularbiologischen Zusammenhänge lassen sich erste Hinweise auf die zellbiologischen Grundlagen der Entstehung des KRK bei Schistosomiasis erkennen. Auch für die zielgerichtete Therapie des KRK bei Schistosomiasis, wie z.B. die pharmakologische Antagonisierung der beteiligten Signalwege, bieten diese Erkenntnisse wichtige Hinweise.

In weiteren Studien könnte untersucht werden, ob Veränderungen in diesen Signalwegen auch bei der Infektion mit anderen Schistosomenarten, wie *S. japonicum*, auftreten. Um die Zusammenhänge zwischen der *S. mansoni*-Infektion und der Veränderung karzinogener Signalwege besser zu verstehen, ist eine genauere Untersuchung dieser betroffenen Signalwege in Folgestudien notwendig. Auch der Weg, wie das Signal in die Zelle gelangt, ist ein wichtiger Aspekt. Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Mechanismen sind Grundlage für derzeit laufende Analysen unserer Arbeitsgruppe zur Identifikation möglicher Rezeptoren, über die das Signal in die Zelle gelangt. Darüber hinaus sollte die Auswirkung auf Zellproliferation oder mögliche DNA-Schäden in den Zellen des Darms untersucht werden. Neben der Erforschung der molekularbiologischen Zusammenhänge stehen auch epidemiologische Studien zum gemeinsamen Auftreten von *S. mansoni*-Infektion und dem KRK aus.

4.7 Limitationen der Arbeit

Für die in vivo Versuche am Tiermodell wurden maximal 15 Hamster verwendet. Durch die kleine Anzahl von Tieren kann in der Zusammenschau mit dem optischen Bild der Datenverteilung im Box-Whisker-Plot-Diagramm nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Trotzdem sind die Versuche mit Hilfe nichtparametrischer statistischer Tests statistisch auswertbar und es konnten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden. Zudem wurden in den in vivo

Versuchen ausschließlich weibliche Hamster verwendet. Für nachfolgende Studien wäre es interessant, Tiere beider Geschlechter einzubeziehen und so geschlechtsspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu analysieren. Die Versuche in vivo wurden ausschließlich am Hamstermodell und die in vitro Versuche mit murinen Kolonkarzinomzellen durchgeführt. Um die Ergebnisse der Studie besser auf den Menschen übertragen zu können, wäre die Analyse einer größeren Stichprobe humaner Proben wichtig. Weiterhin erfolgte der Vergleich bei den Versuchen am Hamstermodell zwischen bisex und monosex infizierten Tieren, da diese Studie insbesondere auf die Auswirkung der Schistosomeneier in bisex infizierten Tieren abzielte. Ein Vergleich mit einer dritten, nicht infizierten Gruppe, könnte ebenfalls weitere relevante Ergebnisse liefern und Rückschlüsse auf Auswirkungen der Würmer im Organismus des Wirts geben.

5 Zusammenfassung

Schistosomiasis ist eine parasitäre Infektionserkrankung und wird zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten (engl. neglected tropical diseases) gezählt. Weltweit erhielten im Jahr 2019 ca. 236 Mio. Menschen eine prophylaktische Therapie, was die starke Verbreitung dieser Erkrankung zeigt². Ursächlich für die mit Schistosomiasis verbundene Morbidität ist hauptsächlich die chronische Infektion⁶. Neben der Schistosomiasis-assoziierten Kolitis und der hepatischen Schistosomiasis verursacht die Infektion als Folge von anhaltender Entzündung unspezifische, systemische Symptome wie Anämie, aber auch Unterernährung und eine Beeinträchtigung der kindlichen Entwicklung⁵. Verschiedene Fallberichte und Studien legen zudem den Zusammenhang einer *S. mansoni*-Infektion mit dem Auftreten des kolorektalen Karzinoms nahe^{77,81,120}. Dabei gibt es verschiedene Ansatzpunkte über die Mechanismen der karzinogenen Wirkung einer Schistosomiasis-Infektion. Eine Erklärung stellt die durch chronische Inflammation verursachte Mutation von Onkogenen dar¹⁰. Eine andere Theorie ist die Beeinflussung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege durch die von Parasiteneiern sezernierten Antigene.^{88,120}

So konnte unsere Arbeitsgruppe in einer kürzlich veröffentlichten Studie, in welche die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eingeflossen sind, zeigen, dass Ei-Antigene von *S. mansoni* zu einer Aktivierung Karzinogenese-assoziiierter Signalwege und Protoonkogene führen. Eine Aktivierung des KRK-assoziierten Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, des Protoonkogens c-Jun und assoziierter Downstream-Faktoren wie Cyclin D1 und MCM2 konnte sowohl in vivo als auch in vitro nach Stimulation mit den

Ei-Antigenen SEA und IPSE beobachtet werden¹²⁰. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivierung Karzinogenese-assoziiertes Signalwege und insbesondere des Protoonkogens c-Jun bei Infektion mit *S. mansoni* zu untersuchen. In Tierversuchen wurden Kolonproben *S. mansoni*-infizierter Hamster untersucht. Zur Klärung molekularbiologischer Zusammenhänge wurden außerdem Zellkulturversuche mit Kolonkarzinomzellen durchgeführt. Die in vivo-Versuche zeigten eine Aktivierung des Protoonkogens c-Jun und des Downstream-Faktors Cyclin D1 bei *S. mansoni*-Infektion. In Western Blot-Analysen konnte eine Überexpression dieser Proteine im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Immunhistochemische Färbungen zeigten eine verstärkte c-Jun- und Cyclin D1-Expression in Enterozyten nahe der Parasiteneier. Die Ergebnisse legen nahe, dass von den Eiern sezernierte Faktoren zur erhöhten Expression der Signalkomponenten in Enterozyten führen. In Zellkulturversuchen wurden Kolonkarzinomzellen mit SEA, einem *S. mansoni*-Ei-Antigen, stimuliert. Hier zeigte sich eine verstärkte c-Jun-Expression bei Stimulation der Zellen. Weiterhin wurden Inhibitionsversuche mit einem JNK-Inhibitor sowie MEK-Inhibitor durchgeführt, um beteiligte Signalwege zu ermitteln. Die c-Jun-Aktivierung und die Cyclin D1-Expression nach SEA-Stimulation wurden durch die Inhibition des JNK-Signalwegs und des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs durch MEK-Inhibition signifikant reduziert. Die Zusammenschau mit vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, welche eine Beteiligung des JNK- und Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg bei der Ei-Antigen-vermittelten c-Jun-Aktivierung zeigen konnten, legt nahe, dass Ei-Antigene über diese Signalwege die Expression und Aktivierung des Protoonkogens c-Jun fördern und auch eine vermehrte Expression von Downstream-Faktoren wie Cyclin D1 bewirken.

Insgesamt lassen die Ergebnisse aus den Analysen des Tiermodells und die Untersuchungen in der Zellkultur darauf schließen, dass *S. mansoni* Ei-Antigene zu einer Aktivierung des Karzinogenese-assoziierten Protoonkogens c-Jun und nachgeschalteter Proteine führen. Diese Erkenntnisse können zu einem besseren Verständnis der Ätiologie des Kolonkarzinoms im Zusammenhang mit *S. mansoni* beitragen. Erkenntnisse über die Beeinflussung dieser Signalwege bei einer *S. mansoni*-Infektion können als Ansatz für therapeutische Eingriffe dienen. In zukünftigen Studien sollten weitere beteiligte Signalwege untersucht und die Wirkung der einzelnen SEA-Komponenten spezifisch herausgearbeitet werden

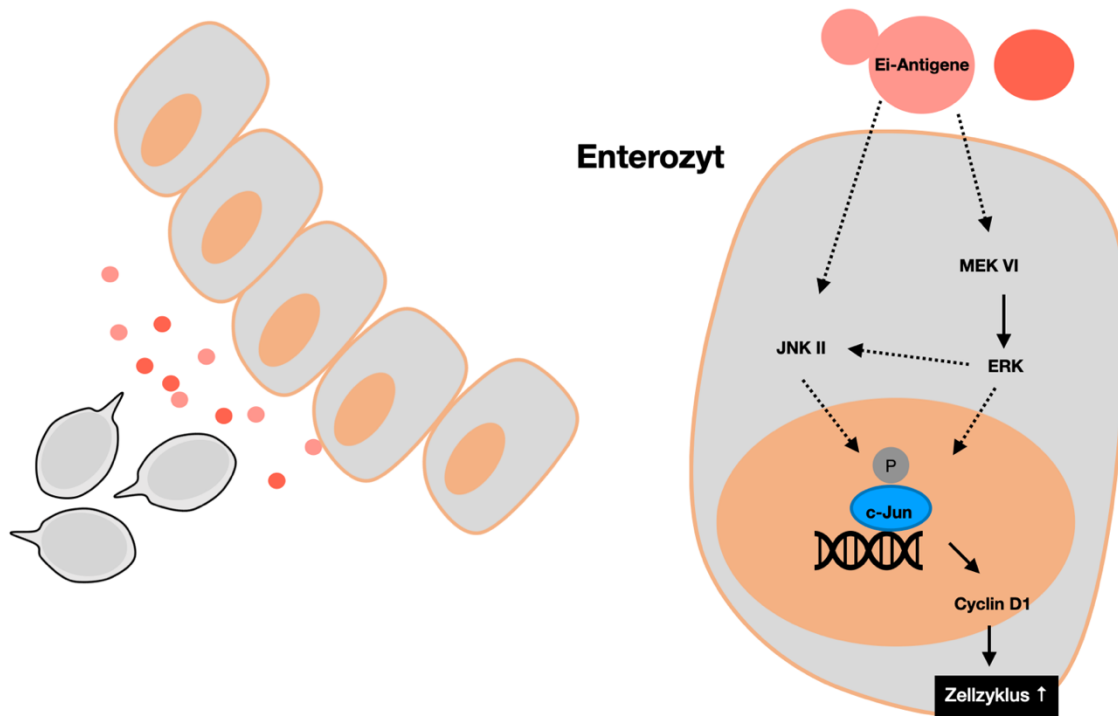


Abbildung 19: **Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit.** Die Parasiteneier sind metabolisch aktiv und haben eine starke Antigen-Wirkung. Sekretierte Ei-Antigene (rote Punkte) führen über verschiedene Signalwege wie JNK oder MEK/ERK zur Aktivierung des Protoonkogens c-Jun. Die Aktivierung führt zur Translokation von p-c-Jun in den Zellkern und schließlich durch die vermehrte Expression nachgeschalteter Downstream-Faktoren wie Cyclin D1 zur gesteigerten Proliferation. Diese molekularbiologischen Prozesse könnten Mechanismen darstellen, welche ein erhöhtes Risiko der Entstehung eines Kolorektalen Karzinoms bei Schistosomiasis-Infektion bedingen.

6 Summary

The parasitic disease schistosomiasis infects approximately 230 million people worldwide⁵. The main cause of the morbidity associated with schistosomiasis is the chronic schistosomiasis infection⁶. In addition to schistosomiasis-associated colitis and hepatic schistosomiasis, the infection causes non-specific, systemic symptoms due to persistent inflammatory activity such as anemia, malnutrition and impaired child development⁵. Various case reports and studies also suggest that *S. mansoni* infection is associated with the occurrence of colorectal carcinoma^{77,81,120}. There are different theories about the mechanisms of the carcinogenic effect of schistosomiasis infection. One explanation is the mutation of oncogenes caused by chronic inflammation¹⁰. Another

theory is that the antigens secreted by parasite eggs influence carcinogenesis-associated signaling pathways. Our group was able to show that egg antigens from *S. mansoni* lead to an activation of carcinogenesis-associated signaling pathways and proto-oncogenes. Activation of the CRC-associated Wnt/ β -catenin signaling pathway, the proto-oncogene c-Jun and associated downstream factors such as cyclin D1 and MCM2 could be shown in vivo and in vitro after stimulation with the egg antigens SEA and IPSE¹²⁰. The aim of this work is to investigate the activation of carcinogenesis-associated signaling pathways and in particular the proto-oncogene c-Jun after infection with *S. mansoni*. Colon samples from *S. mansoni*-infected hamsters were examined in animal studies. Cell line experiments with colon carcinoma cells were carried out to clarify biomolecular relationships. The in vivo experiments showed activation of the proto-oncogene c-Jun and the downstream factor cyclin D1 during *S. mansoni* infection. In Western blot analysis an overexpression of these proteins compared to the control group could be observed. Immunohistochemical staining demonstrated increased c-Jun and cyclin D1 expression in enterocytes localized near the parasite's eggs. The results suggest that components secreted by the eggs lead to increased expression of these proteins in those enterocytes. In cell line experiments colon carcinoma cells were stimulated with SEA, a *S. mansoni* egg antigen. After stimulation an increased c-Jun expression could be shown. Furthermore, inhibition trials were carried out with a JNK inhibitor and MEK inhibitor to specify the involved signaling pathways. The c-Jun activation after SEA stimulation was reduced during inhibition of the JNK signaling pathway. Inhibition of the Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway by MEK inhibition also showed a reduction in c-Jun activation. The combination with previous results of our group, which could show an involvement of the JNK and Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway in egg antigen-mediated c-Jun activation, suggests that these signaling pathways regulate the expression and activation of the proto-oncogene c-Jun. Overall, these results suggest that *S. mansoni* egg antigens lead to activation of the carcinogenesis-associated proto-oncogene c-Jun and downstream proteins. These findings may contribute to a better understanding of the etiology of colon carcinoma associated with *S. mansoni*. Findings about the influence of these signaling pathways in *S. mansoni* infection can serve as a starting point for therapeutic agents. The signaling pathways involved should be examined in more detail in future studies as well as the effects of the individual components of SEA is also an important pointer for further research.

7 Literaturverzeichnis

1. Nelwan ML. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2019;91:5-9. doi:10.1016/j.curtheres.2019.06.001
2. WHO. Key facts Schistosomiasis. WHO. Published 2022. Accessed September 12, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.
3. Schuchart S. *Theodor Bilharz Sah Etwas Wunderbares Unter Dem Mikroskop*. 37th ed. Deutsches Ärzteblatt; 2017. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/193410/Beruehmte-Entdecker-von-Krankheiten-Theodor-Bilharz-sah-etwas-Wunderbares-unter-dem-Mikroskop>.
4. Berry A, Moné H, Iriart X, et al. Schistosomiasis Haematobium, Corsica, France. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(9):1595-1597. doi:10.3201/eid2009.140928
5. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet Lond Engl*. 2014;383(9936):2253-2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2
6. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):383-397. doi:10.1016/j.idc.2012.03.004
7. Bamgbola OF. Urinary schistosomiasis. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2014;29(11):2113-2120. doi:10.1007/s00467-013-2723-1
8. IARC. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100(Pt B):1-441.
9. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020;8(2):e180-e190. doi:10.1016/S2214-109X(19)30488-7
10. Brindley PJ, Meyer CG, Velavan TP, Van Tong H. Parasite Infection, Carcinogenesis and Human Malignancy. *EBioMedicine*. 2017;15:12-23. doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.034
11. von Bülow V, Lichtenberger J, Grevelding CG, Falcone FH, Roeb E, Roderfeld M. Does *Schistosoma mansoni* Facilitate Carcinogenesis? *Cells*. 2021;10(8):1982. doi:10.3390/cells10081982
12. Stothard JR, Sousa-Figueiredo JC, Betson M, et al. Closing the praziquantel treatment gap: new steps in epidemiological monitoring and control of schistosomiasis in African infants and preschool-aged children. *Parasitology*. 2011;138(12):1593-1606. doi:10.1017/S0031182011001235
13. Collins JJ, King RS, Cogswell A, Williams DL, Newmark PA. An Atlas for *Schistosoma mansoni* Organs and Life-Cycle Stages Using Cell Type-Specific Markers and Confocal Microscopy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e1009. doi:10.1371/journal.pntd.0001009

14. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet Lond Engl.* 2006;368(9541):1106-1118. doi:10.1016/S0140-6736(06)69440-3
15. Schwartz C, Fallon PG. Schistosoma “Eggs-Iting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front Immunol.* 2018;9:2492. doi:10.3389/fimmu.2018.02492
16. Skelly PJ, Da'dara AA, Li XH, Castro-Borges W, Wilson RA. Schistosome Feeding and Regurgitation. *PLoS Pathog.* 2014;10(8):e1004246. doi:10.1371/journal.ppat.1004246
17. Cheever AW, Macedonia JG, Mosimann JE, Cheever EA. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;50(3):281-295. doi:10.4269/ajtmh.1994.50.281
18. Costain AH, MacDonald AS, Smits HH. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Front Immunol.* 2018;9:3042. doi:10.3389/fimmu.2018.03042
19. Vella AT, Hulsebosch MD, Pearce EJ. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen-responsive CD44^{hi} T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44^{lo} cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1992;149(5):1714-1722.
20. Weinstock JV, Boros DL. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1983;130(1):418-422.
21. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol.* 2013;4:89. doi:10.3389/fimmu.2013.00089
22. Doenhoff MJ, Pearson S, Dunne DW, et al. Immunological control of hepatotoxicity and parasite egg excretion in *Schistosoma mansoni* infections: stage specificity of the reactivity of immune serum in T-cell deprived mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(1):41-53. doi:10.1016/0035-9203(81)90012-2
23. Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology.* 2001;122(Pt 3):329-338. doi:10.1017/s0031182001007351
24. Cass CL, Johnson JR, Califf LL, et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;155(2):84-93. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.06.002
25. Haeberlein S, Obieglo K, Ozir-Fazalalikhani A, et al. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. *PLoS Pathog.* 2017;13(7):e1006539. doi:10.1371/journal.ppat.1006539

26. Everts B, Perona-Wright G, Smits HH, et al. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med*. 2009;206(8):1673-1680. doi:10.1084/jem.20082460
27. Steinfelder S, Andersen JF, Cannons JL, et al. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J Exp Med*. 2009;206(8):1681-1690. doi:10.1084/jem.20082462
28. Everts B, Hussaarts L, Driessen NN, et al. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *J Exp Med*. 2012;209(10):1753-1767. doi:10.1084/jem.20111381
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. doi:10.1017/s0031182000059503
30. Schramm G, Mohrs K, Wodrich M, et al. Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178(10):6023-6027. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6023
31. Fahel JS, Macedo GC, Pinheiro CS, Caliari MV, Oliveira SC. IPSE/alpha-1 of *Schistosoma mansoni* egg induces enlargement of granuloma but does not alter Th2 balance after infection. *Parasite Immunol*. 2010;32(5):345-353. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01192.x
32. Kaur I, Schramm G, Everts B, et al. 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. *Infect Immun*. 2011;79(4):1779-1788. doi:10.1128/IAI.01048-10
33. Smith P, Fallon RE, Mangan NE, et al. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med*. 2005;202(10):1319-1325. doi:10.1084/jem.20050955
34. Appleton CC. Schistosome dermatitis--an unrecognized problem in South Africa? *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk*. 1984;65(12):467-469.
35. Bottieau E, Clerinx J, de Vega MR, et al. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect*. 2006;52(5):339-345. doi:10.1016/j.jinf.2005.07.022
36. Elbaz T, Esmat G. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *J Adv Res*. 2013;4(5):445-452. doi:10.1016/j.jare.2012.12.001
37. Cao J, Liu WJ, Xu XY, Zou XP. Endoscopic findings and clinicopathologic

characteristics of colonic schistosomiasis: a report of 46 cases. *World J Gastroenterol*. 2010;16(6):723-727. doi:10.3748/wjg.v16.i6.723

38. Cheever AW. A quantitative post-mortem study of Schistosomiasis mansoni in man. *Am J Trop Med Hyg*. 1968;17(1):38-64. doi:10.4269/ajtmh.1968.17.38

39. Richter J, Correia Dacal AR, Vergetti Siqueira JG, et al. Sonographic prediction of variceal bleeding in patients with liver fibrosis due to Schistosoma mansoni. *Trop Med Int Health TM IH*. 1998;3(9):728-735. doi:10.1046/j.1365-3156.1998.00285.x

40. Gryseels B. Morbidity due to infection with Schistosoma mansoni: an update. *Trop Geogr Med*. 1992;44(3):189-200.

41. Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop*. 2003;86(2-3):141-159. doi:10.1016/s0001-706x(03)00031-7

42. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M. *Prometheus-Innere Organe Lernatlas Der Anatomie*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2012. Accessed September 12, 2022. <https://hds.hebis.de/ubgi/Record/HEB309574188>

43. Fried M, Manns MP, Rogler G. *Magen-Darm-Trakt*. (Luescher T, Steffel J, eds.). Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-29434-1

44. Ulfig N. *Kurzlehrbuch Histologie*. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2015. Accessed September 13, 2022. https://eref-thieme-de.ezproxy.uni-giessen.de/ebooks/1143653#/ebook_1143653_SL48146167

45. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenlehrbuch Histologie*. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2019. Accessed September 12, 2022. https://eref-thieme-de.ezproxy.uni-giessen.de/ebooks/2444813#/ebook_2444813_SL91304781

46. Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2019. Accessed September 12, 2022. https://eref-thieme-de.ezproxy.uni-giessen.de/ebooks/cs_10278468#/ebook_cs_10278468_cs106

47. Bischoff SC. 2 Aufbau und Funktion des Darmimmunsystems. In: *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika*. 1. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2009. doi:10.1055/b-0034-29485

48. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2016;25(1):16-27. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0578

49. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016;469:125-134. doi:10.1007/s00428-016-1956-3

50. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. 2016;11:967-976. doi:10.2147/CIA.S109285

51. Aust D, Baretton G, eds. In: *Pathologie- Sporadische Tumoren des Kolorektums*. Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-02322-4
52. Sinn P. Kolorektales Adenom. Universität Heidelberg, Lehrtexte Spezielle Pathologie. Published 2014. Accessed February 3, 2021. https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/705/kolorektale-adenome
53. Aaltonen LA, Hamilton SR. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press ; Oxford University Press; 2000.
<https://patologi.com/who%20mage.pdf>
54. Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. The Origins of Colorectal Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(43):760-766. doi:10.3238/arztebl.2010.0760
55. Messmann H, Barnert J, Bittinger M, et al. *Lehratlas der Koloskopie*. Thieme Verlag; 2004. doi:10.1055/b-002-21511
56. Vatn MH, Stalsberg H. The prevalence of polyps of the large intestine in Oslo: an autopsy study. *Cancer*. 1982;49(4):819-825. doi:10.1002/1097-0142(19820215)49:4<819::aid-cnrcr2820490435>3.0.co;2-d
57. Kretschmann J, El Mahi C, Lichtner F, Hagen B. *Früherkennungskoloskopie Jahresbericht 2018*. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland; 2020. https://www.zi.de/fileadmin/pdf/Koloskopie_Jahresbericht_2018.pdf
58. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(1):65-81. doi:10.1097/00000478-200301000-00008
59. Kim KM, Lee EJ, Kim YH, Chang DK, Odze RD. KRAS mutations in traditional serrated adenomas from Korea herald an aggressive phenotype. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(5):667-675. doi:10.1097/PAS.0b013e3181d40cb2
60. Carr NJ, Mahajan H, Tan KL, Hawkins NJ, Ward RL. Serrated and non-serrated polyps of the colorectum: their prevalence in an unselected case series and correlation of BRAF mutation analysis with the diagnosis of sessile serrated adenoma. *J Clin Pathol*. 2009;62(6):516-518. doi:10.1136/jcp.2008.061960
61. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50(1):113-130. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x
62. Harada S, Morlote D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol*. 2020;27(1):20-26. doi:10.1097/PAP.0000000000000247
63. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-2460. doi:10.1056/NEJMra0804588
64. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*.

- 1990;61(5):759-767. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-i
65. Pellman D. Cancer. A CINtillating new job for the APC tumor suppressor. *Science*. 2001;291(5513):2555-2556. doi:10.1126/science.1057337
66. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-337. doi:10.1038/nature11252
67. Zylka-Menhorn V. *Mikrosatelliteninstabilität Im Tumorgewebe: Direkter Nachweis Mittels Bildverarbeitung*. Deutsches Ärzteblatt; 2019. Accessed September 12, 2022. <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=209383>
68. Gian L de'Angelis, Lorena B, Cinzia A, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2018;89(Suppl 9):97-101. doi:10.23750/abm.v89i9-S.7960
69. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681-8686. doi:10.1073/pnas.96.15.8681
70. Rhee YY, Kim KJ, Kang GH. CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver*. 2017;11(1):38-46. doi:10.5009/gnl15535
71. Bhagwande SB. Schistosomiasis and carcinoma of the bladder in Zambia. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneesk*. 1976;50(41):1616-1620.
72. Czerniak B, Deitch D, Simmons H, Etkind P, Herz F, Koss LG. Ha-ras gene codon 12 mutation and DNA ploidy in urinary bladder carcinoma. *Br J Cancer*. 1990;62(5):762-763. doi:10.1038/bjc.1990.374
73. Botelho MC, Veiga I, Oliveira PA, et al. Carcinogenic ability of *Schistosoma haematobium* possibly through oncogenic mutation of KRAS gene. *Adv Cancer Res Treat*. 2013;2013:876585.
74. Chaudhary KS, Lu QL, Abel PD, et al. Expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in schistosomiasis-associated transitional and squamous cell carcinoma of urinary bladder. *Br J Urol*. 1997;79(1):78-84. doi:10.1046/j.1464-410x.1997.30717.x
75. Xu Z, Su DL. *Schistosoma japonicum* and colorectal cancer: an epidemiological study in the People's Republic of China. *Int J Cancer*. 1984;34(3):315-318. doi:10.1002/ijc.2910340305
76. Salim OE, Hamid HKS, Mekki SO, Suleiman SH, Ibrahim SZ. Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: a possible causal relationship. *World J Surg Oncol*. 2010;8:68. doi:10.1186/1477-7819-8-68
77. Herman AM, Kische A, Babu H, et al. Colorectal cancer in a patient with intestinal schistosomiasis: a case report from Kilimanjaro Christian Medical Center Northern Zone

- Tanzania. *World J Surg Oncol*. 2017;15:146. doi:10.1186/s12957-017-1217-1
78. Basílio-de-Oliveira CA, Aquino A, Simon EF, Eyer-Silva WA. Concomitant prostatic schistosomiasis and adenocarcinoma: case report and review. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2002;6(1):45-49. doi:10.1590/s1413-86702002000100007
79. El-Tonsy MM, Hussein HM, Helal TES, Tawfik RA, Koriem KM, Hussein HM. Schistosoma mansoni infection: is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? *Acta Trop*. 2013;128(3):542-547. doi:10.1016/j.actatropica.2013.07.024
80. Kiremit MC, Cakir A, Arslan F, Ormeci T, Erkurt B, Albayrak S. The bladder carcinoma secondary to schistosoma mansoni infection: A case report with review of the literature. *Int J Surg Case Rep*. 2015;13:76-78. doi:10.1016/j.ijscr.2015.05.038
81. Madbouly KM, Senagore AJ, Mukerjee A, et al. Colorectal cancer in a population with endemic Schistosoma mansoni: is this an at-risk population? *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(2):175-181. doi:10.1007/s00384-006-0144-3
82. Almeida GFG, Sarinho FW, Carvalho de Abreu E Lima P, et al. DNA Repair Defect and RAS Mutation in Two Patients With Schistosoma mansoni-Associated Colorectal Cancer: Carcinogenesis Steps or Mere Coincidence? *J Glob Oncol*. 2017;3(4):423-426. doi:10.1200/JGO.2016.006254
83. Shousha HI, Abdelaziz AO, Nabeel MM, et al. Schistosoma mansoni infection and the occurrence, characteristics, and survival of patients with hepatocellular carcinoma: an observational study over a decade. *Pathog Glob Health*. 2022;116(2):119-127. doi:10.1080/20477724.2021.1975081
84. Parkin D, Arslan A, Bieber A, et al. Cancer Occurrence in Developing Countries. *Int Agency Res Cancer Lyon Frankreich*. 1986;(75).
85. Waku M, Napolitano L, Clementini E, et al. Risk of cancer onset in sub-Saharan Africans affected with chronic gastrointestinal parasitic diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18(3):503-511. doi:10.1177/039463200501800310
86. Vennervald BJ, Polman K. Helminths and malignancy. *Parasite Immunol*. 2009;31(11):686-696. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01163.x
87. Nacif-Pimenta R, da Silva Orfanó A, Mosley IA, et al. Differential responses of epithelial cells from urinary and biliary tract to eggs of Schistosoma haematobium and S. mansoni. *Sci Rep*. 2019;9(1):10731. doi:10.1038/s41598-019-46917-y
88. Roderfeld M, Padem S, Lichtenberger J, et al. Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. *Hepatology Baltim Md*. 2020;72(2):626-641. doi:10.1002/hep.30192
89. Zalata KR, Nasif WA, Ming SC, et al. p53, Bcl-2 and C-Myc expressions in colorectal carcinoma associated with schistosomiasis in Egypt. *Cell Oncol Off J Int Soc*

Cell Oncol. 2005;27(4):245-253. doi:10.1155/2005/547010

90. Calvisi DF. Schistosoma mansoni and Hepatocellular Carcinoma: Is It All About c-Jun and Signal Transducer and Activator of Transcription 3? *Hepatology Baltim Md.* 2020;72(2):375-378. doi:10.1002/hep.31392
91. Garces de Los Fayos Alonso I, Liang HC, Turner SD, Lagger S, Merkel O, Kenner L. The Role of Activator Protein-1 (AP-1) Family Members in CD30-Positive Lymphomas. *Cancers.* 2018;10(4):E93. doi:10.3390/cancers10040093
92. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):E131-136. doi:10.1038/ncb0502-e131
93. Eferl R, Ricci R, Kenner L, et al. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell.* 2003;112(2):181-192. doi:10.1016/s0092-8674(03)00042-4
94. Johnston IM, Spence HJ, Winnie JN, et al. Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion. *Oncogene.* 2000;19(47):5348-5358. doi:10.1038/sj.onc.1203927
95. Xia Y, Yang W, Bu W, et al. Differential Regulation of c-Jun Protein Plays an Instrumental Role in Chemoresistance of Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2013;288(27):19321-19329. doi:10.1074/jbc.M113.475442
96. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(6824):37-40. doi:10.1038/35065000
97. Zeke A, Misheva M, Reményi A, Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2016;80(3):793-835. doi:10.1128/MMBR.00043-14
98. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell.* 2004;15(5):713-725. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.028
99. Stepniak E, Ricci R, Eferl R, et al. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev.* 2006;20(16):2306-2314. doi:10.1101/gad.390506
100. Min L, Ji Y, Bakiri L, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat Cell Biol.* 2012;14(11):1203-1211. doi:10.1038/ncb2590
101. Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol.* 2014;93(1-2):76-81. doi:10.1016/j.ejcb.2013.10.003
102. Britton E, Rogerson C, Mehta S, et al. Open chromatin profiling identifies AP1

- as a transcriptional regulator in oesophageal adenocarcinoma. *PLoS Genet.* 2017;13(8):e1006879. doi:10.1371/journal.pgen.1006879
103. Wang H, Birkenbach M, Hart J. Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2000;21(7):1313-1317.
 104. Magrisso IJ, Richmond RE, Carter JH, Pross CB, Gilfillen RA, Carter HW. Immunohistochemical detection of RAS, JUN, FOS, and p53 oncoprotein expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 1993;69(6):674-681.
 105. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-166. doi:10.1038/nrc2602
 106. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med Berl Ger.* 2016;94(12):1313-1326. doi:10.1007/s00109-016-1475-3
 107. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov.* 2016;6(4):353-367. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0894
 108. Oki T, Nishimura K, Kitaura J, et al. A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0-G1 transition. *Sci Rep.* 2014;4:4012. doi:10.1038/srep04012
 109. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):792-804. doi:10.1038/nrm1493
 110. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004;145(12):5439-5447. doi:10.1210/en.2004-0959
 111. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993;7(5):812-821. doi:10.1101/gad.7.5.812
 112. Reutens AT, Fu M, Wang C, et al. Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner. *Mol Endocrinol Baltim Md.* 2001;15(5):797-811. doi:10.1210/mend.15.5.0641
 113. Tchakarska G, Sola B. The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle.* 2019;19(2):163-178. doi:10.1080/15384101.2019.1706903
 114. Casimiro MC, Crosariol M, Loro E, Li Z, Pestell RG. Cyclins and Cell Cycle Control in Cancer and Disease. *Genes Cancer.* 2012;3(11-12):649-657. doi:10.1177/1947601913479022
 115. Lu Z, Sessler F, Holroyd N, et al. Schistosome sex matters: a deep view into gonad-specific and pairing-dependent transcriptomes reveals a complex gender

- interplay. *Sci Rep*. 2016;6:31150. doi:10.1038/srep31150
116. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1180:31-43. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3
117. Morphisto. Gebrauchsanweisung Färbekit: Masson Goldner Trichrom. Published online 2012.
https://www.morphisto.de/uploads/tx_aimeos/gebrauchsanweisungen/Gebrauchsanweisung_MASSON_GOLDNER_12043.pdf
118. Boissier J, Grech-Angelini S, Webster BL, et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(8):971-979. doi:10.1016/S1473-3099(16)00175-4
119. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG). S1-Leitlinie 042-005: Diagnostik und Therapie der Schistosomiasis (Bilharziose). Published online 2017.
120. Weglage J, Wolters F, Hehr L, et al. *Schistosoma mansoni* eggs induce Wnt/ β -catenin signaling and activate the protooncogene c-Jun in human and hamster colon. *Sci Rep*. 2020;10(1):22373. doi:10.1038/s41598-020-79450-4
121. Wernicke AK, Churin Y, Sheridan D, et al. Matrix metalloproteinase-13 refines pathological staging of precancerous colorectal lesions. *Oncotarget*. 2016;7(45):73552-73557. doi:10.18632/oncotarget.12429
122. Ramesh P, Medema JP. BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. *Apoptosis*. 2020;25(5):305-320. doi:10.1007/s10495-020-01601-9
123. Kunac N, Filipović N, Kostić S, Vukojević K. The Expression Pattern of Bcl-2 and Bax in the Tumor and Stromal Cells in Colorectal Carcinoma. *Med Kaunas Lith*. 2022;58(8):1135. doi:10.3390/medicina58081135
124. Miao ZH, Ding J. Transcription factor c-Jun activation represses mdr-1 gene expression. *Cancer Res*. 2003;63(15):4527-4532.
125. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16. doi:10.1053/j.gastro.2004.09.011
126. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-2576. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061
127. Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001;27(4):305-313. doi:10.1046/j.0305-1846.2001.00333.x

128. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13681-13686. doi:10.1073/pnas.251194298
129. Shvedova M, Anfinogenova Y, Atochina-Vasserman EN, Schepetkin IA, Atochin DN. c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in Myocardial and Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Pharmacol*. 2018;9:715. doi:10.3389/fphar.2018.00715
130. Ye H, Zhang Y, Wang Y, Xia J, Mao X, Yu X. The restraining effect of baicalein and U0126 on human cervical cancer cell line HeLa. *Mol Med Rep*. 2017;16(1):957-963. doi:10.3892/mmr.2017.6648

8 Publikationen und Kongressbeiträge

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

Wolters F, Wulz C, Hehr L, Lichtenberger J, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Aktivierung des Protoonkogens c-Jun durch sekretierte Faktoren von *Schistosoma mansoni*-Eiern in Kolonepithelzellen infizierter Hamster und in Zellkultur. Kongressvortrag. DGVS 2019.

Wolters F, Wulz C, Hehr L, Lichtenberger J, Schramm G, Quack T, Grevelding CG, Roderfeld M, Roeb E. Aktivierung des Protoonkogens c-Jun durch sekretierte Faktoren von *Schistosoma mansoni*-Eiern in Kolonepithelzellen infizierter Hamster und in Zellkultur. Vortrag. Science Day 2019 Justus-Liebig-Universität Gießen.

Roderfeld M, Lichtenberger J, **Wolters F**, Quack T, Grevelding CG, Roeb E. Hepatozelluläre Aktivierung von β -Catenin und Survivin durch *Schistosoma mansoni* Infektion im Hamster-Modell. *Z Gastroenterol* 2019; 57(01): e69. Abstract, Vortrag. GASL 2019.

9 Anhang

Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
p-c-Jun/GAPDH	ss	4	2,50	10,00
	bs	11	10,00	110,00
	Gesamt	15		
c-Jun/GAPDH	ss	4	2,50	10,00
	bs	11	10,00	110,00
	Gesamt	15		
p-c-Jun/c-Jun	ss	4	2,75	11,00
	bs	11	9,91	109,00
	Gesamt	15		
CyclinD1/GAPDH	ss	4	3,00	12,00
	bs	11	9,82	108,00
	Gesamt	15		

Statistik für Test^a

	p-c- Jun/GAPDH	c-Jun/GAPDH	p-c-Jun/c-Jun	CyclinD1/GAP DH
Mann-Whitney-U	,000	,000	1,000	2,000
Wilcoxon-W	10,000	10,000	11,000	12,000
Z	-2,872	-2,872	-2,742	-2,611
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,004	,004	,006	,009
Exakte Signifikanz [2*(1- seitige Sig.)]	,001 ^b	,001 ^b	,003 ^b	,006 ^b
Korrigierte Signifikanz	,004 ^c	,004 ^c	,012 ^c	,024 ^c

a. Gruppenvariable: Gruppe

b. Nicht für Bindungen korrigiert.

c. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Abbildung 20: **Vergleich der ss (singesex) und der bs (bisex) Gruppe mittels Mann-Whitney-U-Test.** Bei den Quotienten p-c-Jun/GAPDH, c-Jun/GAPDH, p-c-Jun/c-Jun und Cyclin D1/GAPDH liegen signifikante Unterschiede vor ($p < 0,05$).

Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von p-c-Jun/GAPDH ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen
2	Die Verteilung von c-Jun/GAPDH ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen
3	Die Verteilung von p-c-Jun/c-Jun ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,097	Nullhypothese beibehalten
4	Die Verteilung von Cyclin D1/alpha-Tubulin ist über die Kategorien von Gruppe identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,006	Nullhypothese ablehnen

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Abbildung 21: **Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Test der Inhibitionsversuche.** Die Ergebnisse für die Proteinverhältnisse p-c-Jun/GAPDH, c-Jun/GAPDH und Cyclin D1/alpha-Tubulin zeigen signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$), sodass hier die Nullhypothese abgelehnt werden kann. Die Proteinverhältnisse von p-c-Jun/c-Jun unterscheiden sich zwischen den Gruppen nicht ($p=0,097$). Die Nullhypothese wird beibehalten.

Paarweise Vergleiche von Gruppen

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. ^a
PBS+MEK-PBS+JNK	5,333	8,036	,664	,507	1,000
PBS+MEK-PBS	6,200	7,365	,842	,400	1,000
PBS+MEK-SEA+MEK	-11,500	7,624	-1,508	,131	1,000
PBS+MEK-SEA+JNK	12,833	7,188	1,785	,074	1,000
PBS+MEK-SEA	23,500	6,819	3,446	,001	,009
PBS+JNK-PBS	,867	6,429	,135	,893	1,000
PBS+JNK-SEA+MEK	-6,167	6,724	-,917	,359	1,000
PBS+JNK-SEA+JNK	-7,500	6,225	-1,205	,228	1,000
PBS+JNK-SEA	-18,167	5,795	-3,135	,002	,026

PBS-SEA+MEK	-5,300	5,906	-,897	,369	1,000
PBS-SEA+JNK	-6,633	5,331	-1,244	,213	1,000
PBS-SEA	-17,300	4,822	-3,588	,000	,005
SEA+MEK-SEA+JNK	1,333	5,683	,235	,814	1,000
SEA+MEK-SEA	12,000	5,208	2,304	,021	,318
SEA+JNK-SEA	10,667	4,546	2,346	,019	,284

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Abbildung 22: Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen mit Kruskal-Wallis-Test für das Proteinverhältnis p-c-Jun/GAPDH. Die Gruppen PBS+MEK und SEA, PBS+JNK und SEA und PBS und SEA zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Paarweise Vergleiche von Gruppen

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. ^a
PBS+MEK-PBS	5,000	7,365	,679	,497	1,000
PBS+MEK-SEA+MEK	-7,750	7,624	-1,017	,309	1,000
PBS+MEK-PBS+JNK	9,000	8,036	1,120	,263	1,000
PBS+MEK-SEA+JNK	15,667	7,188	2,180	,029	,439
PBS+MEK-SEA	22,800	6,819	3,344	,001	,012
PBS-SEA+MEK	-2,750	5,906	-,466	,641	1,000
PBS-PBS+JNK	-4,000	6,429	-,622	,534	1,000
PBS-SEA+JNK	-10,667	5,331	-2,001	,045	,681
PBS-SEA	-17,800	4,822	-3,692	,000	,003
SEA+MEK-PBS+JNK	1,250	6,724	,186	,853	1,000
SEA+MEK-SEA+JNK	7,917	5,683	1,393	,164	1,000
SEA+MEK-SEA	15,050	5,208	2,890	,004	,058
PBS+JNK-SEA+JNK	-6,667	6,225	-1,071	,284	1,000
PBS+JNK-SEA	-13,800	5,795	-2,381	,017	,259
SEA+JNK-SEA	7,133	4,546	1,569	,117	1,000

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Abbildung 23: **Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen mit Kruskal-Wallis-Test für das Proteinverhältnis c-Jun/GAPDH.** Die Gruppen PBS+MEK und SEA, sowie PBS und SEA zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Paarweise Vergleiche von Gruppen

Sample 1-Sample 2	Teststatistik	Std.-Fehler	Standardteststatistik	Sig.	Korr. Sig. ^a
PBS+MEK-SEA+JNK	9,000	7,188	1,252	,211	1,000
PBS+MEK-SEA+MEK	-11,750	7,624	-1,541	,123	1,000
PBS+MEK-PBS+JNK	11,833	8,036	1,472	,141	1,000
PBS+MEK-PBS	12,300	7,365	1,670	,095	1,000
PBS+MEK-SEA	22,200	6,819	3,256	,001	,017
SEA+JNK-SEA+MEK	-2,750	5,683	-,484	,628	1,000
SEA+JNK-PBS+JNK	2,833	6,225	,455	,649	1,000
SEA+JNK-PBS	3,300	5,331	,619	,536	1,000
SEA+JNK-SEA	13,200	4,546	2,904	,004	,055
SEA+MEK-PBS+JNK	,083	6,724	,012	,990	1,000
SEA+MEK-PBS	,550	5,906	,093	,926	1,000
SEA+MEK-SEA	10,450	5,208	2,006	,045	,672
PBS+JNK-PBS	,467	6,429	,073	,942	1,000
PBS+JNK-SEA	-10,367	5,795	-1,789	,074	1,000
PBS-SEA	-9,900	4,822	-2,053	,040	,601

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,05.

a. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Abbildung 24: **Paarweise Vergleiche zwischen den Gruppen mit Kruskal-Wallis-Test für das Proteinverhältnis Cyclin D1/GAPDH.** Die Gruppe PBS+MEK und SEA zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

10 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Promotionsarbeit unterstützt und mir zur Seite gestanden haben.

Zuallererst danke ich Frau Univ.-Prof. Dr. Elke Roeb für die freundliche fachliche Betreuung und die Möglichkeit, ein so interessantes Thema als Dissertation bearbeiten zu dürfen.

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld, welcher meine Arbeit im Labor betreute, für jede Frage stets ein offenes Ohr hatte und mir immer neue Anregungen für weitere Experimente gab.

Ich danke der gesamten AG Roeb, insbesondere Annette Tschuschner, Heike Müller, Karuna Irungbam, Dr. Yuri Curin, Jakob Lichtenberger, Felix Hempel und Celina Wulz für die gute Zusammenarbeit, zahlreiche Ratschläge und die schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Laura Hehr, welche mich bei der Durchführung vieler Experimente in der Zellkultur unterstützte. Ohne sie wäre meine Arbeit so nicht möglich gewesen. Die Zeit mit ihr im Labor war eine große Freude, die ich immer in meiner Erinnerung behalten werde.

Ich bedanke mich beim JLU TRAINEE-Programm des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, welches mir durch finanzielle Unterstützung und ein begleitendes Curriculum ermöglichte, mich vollkommen auf das wissenschaftliche Arbeiten zu konzentrieren. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Pons-Kühnemann aus dem Institut für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen für die fachkundige Beratung zur statistischen Aufarbeitung der Daten bedanken.

Darüber hinaus richte ich ein Dankeschön an AOR Dr. Kernt Köhler aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, welcher mir für die pathologische Beurteilung der Gewebeschnitte zur Seite stand.

Auch bei Dr. med. Jörg Halwe aus der Klinik für Gastroenterologie des Klinikums Helse Fonna in Leirvik, Stord, Norwegen möchte ich mich für die freundliche und unkomplizierte Zurverfügungstellung endoskopischen Bildmaterials bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben. Ich danke meinen Eltern Gerda und Manfred Wolters, meinen Schwestern Marie-Louise und Katharina, meinem Bruder David und meinem Freund Manuel, die mir immer den Rücken stärken.